

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina

Gabriela Gryninger

*Influência do Vírus da hepatite B na Infecção
Crônica pelo Vírus da Hepatite C: Perfil das
Citocinas Séricas e Histopatologia Hepática*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Jussara Marcondes Machado

Botucatu - SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Gryninger, Gabriela.

Influência do Vírus da hepatite B na infecção crônica pelo vírus da hepatite C: perfil das citocinas séricas e histopatologia hepática / Gabriela Gryninger. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Orientadora: Jussara Marcondes-Machado

Assunto CAPES: 40105008

1. Hepatite C 2. Fígado – Infecção

CDD 616.3623

Palavras-chave: Citocinas; Fibrose; Hepatite B oculta; Hepatite C

*Aos Meus Queridos Pais, e a
todos que tornaram possível a realização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Denise e Germano que sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos e a não desistir dos meus sonhos. Ao carinho dos meus irmãos Ana e Wagner sempre presentes na minha vida e ao meu namorado Marcos por estar ao meu lado e me apoiar em momentos difíceis.

Agradeço a minha orientadora Dra. Jussara Marcondes-Machado pela oportunidade de trabalho, pela paciência, apoio e dedicação em todos os momentos cruciais e importantes para a conclusão deste trabalho.

Agradeço o laboratório de doenças tropicais que realizou os exames coletados pelos meus pacientes, especialmente a Mariele e a Dra. Sueli, que foram fundamentais para o desenvolvimento do estudo.

Especial agradecimento aos pacientes sem os quais este trabalho não seria realizado.

Resumo

O vírus da hepatite C é uma das principais causas de doença hepática no mundo inteiro. O estudo histopatológico é de grande importância no prognóstico e indicação de tratamento. A coinfeção com o vírus da hepatite B oculta pode agravar a lesão hepática e diminuir a resposta ao tratamento. As citocinas IL-2, γ INF, TNF- α induzem lesão hepática e fibrose. A IL-10 apresenta atividade antiinflamatória e o TGF- β induz o desenvolvimento e depósito de matriz extracelular causando fibrose. Este estudo avaliou, em pacientes com HCC, a presença da hepatite B oculta, a dosagem das citocinas IL-2, γ INF, TNF α , TGF β e IL-10, correlacionando com o estágio de fibrose em pacientes tratados e não tratados com interferon, comparando também com indivíduos saudáveis.

Foram estudados 55 pacientes com HCC crônica, atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu, excluindo-se pacientes imunossuprimidos e gestantes. O grupo controle foi constituído de 20 indivíduos doadores de sangue. O vírus da hepatite B oculto foi pesquisado por de PCR *in house*, segundo técnica de Kaneno, com limite de detecção menor que 100 cópias/ml. A dosagem de citocinas foi determinada por método de Elisa. A avaliação da fibrose hepática seguiu aquela proposta pela Sociedade Brasileira de Patologia. Os resultados mostraram predominância do gênero masculino, adulto jovem, 36,4% foram usuários de drogas endovenosas e 41,8% haviam sido hemotransfundidos. Nenhum paciente apresentou coinfeção pelo vírus da hepatite B oculto. Na biópsia hepática predominou fibrose leve ou ausência de fibrose (47,2%).

As citocinas analisadas não discriminaram o grau de fibrose nos indivíduos com HCC crônica, mesmo quando separados em pacientes que foram submetidos ao tratamento e pacientes que não receberam o tratamento. Não houve também discriminação das citocinas dosadas, quando os portadores de VHC foram separados em grupo que recebeu tratamento e grupo não tratado com interferon α . Em todos os casos, no entanto, as citocinas estiveram significativamente aumentadas em relação ao grupo controle.

Summary:

The Hepatitis C virus is one of the major causes of hepatic diseases worldwide. Histopathological analyses play a leading role in determining disease outcome and treatment. Co-infection with occult Hepatitis B can aggravate liver injury and diminish treatment response. Cytokines such as IL-2, γ INF and TNF- α induce liver injury and fibrosis. IL-10 has an antiinflammatory action and TGF- β induces extracellular matrix development and deposition causing fibrosis. In this study, the presence of occult Hepatitis B and the expression of IL-2, γ INF, TNF α , TGF β and IL-10 were assessed in HCC patients and correlated with fibrosis stage in patients treated and non-treated with interferon, as well as healthy individuals.

A total of 55 patients with chronic HCC seen at Botucatu Medical School were included. Immunosuppressed or pregnant patients were excluded. The control group consisted of 20 blood donors. The occult Hepatitis B virus was detected by in-house PCR according to the technique of Kaneno with a detection limit < 100 clones/ml. Cytokine levels were determined by the Elisa method. Hepatic fibrosis was assessed as proposed by the Brazilian Society of Pathology. The results showed a predominance of male young adults of whom 36.4% had used endovenous drugs and 41.8% had been hemotransfused. No patient showed occult Hepatitis B co-infection. Hepatic biopsy revealed that fibrosis was either absent or mild in most cases (47.2%).

The cytokines under study did not correlate with fibrosis stage in individuals with chronic HCC no matter whether they had or not received treatment. In addition, no correlations with cytokine levels were observed when VHC patients were separated into groups of individuals treated and non-treated with interferon α . However, cytokine expressions were significantly increased in all cases in comparison with the control group.

Sumário

I)	Introdução.....	08
	Vírus da Hepatite C.....	10
	Vírus da Hepatite B.....	11
	Anti HBc isoladamente positivo.....	13
	Coinfecção VHC e VHB.....	14
	Anatomia Patológica.....	16
	Imunologia.....	18
	Fibrose Hepática e Citocinas.....	20
	Tratamento.....	21
	Justificativa do estudo.....	22
II)	Objetivos.....	24
III)	Casuística e Métodos	
	Casuística.....	25
	Métodos.....	26
IV)	Resultados.....	31
V)	Discussão.....	46
VI)	Conclusões.....	53
VII)	Referências Bibliográficas.....	54
VIII)	Anexos.....	61

Introdução

Os vírus das hepatites B e C são os agentes que mais frequentemente causam doença hepática crônica no mundo inteiro ⁽¹⁾. Após infecção aguda por esses agentes, pode haver evolução para a forma crônica, para cirrose que, ainda, se complica com carcinoma hepatocelular. Pacientes que tenham infecção concomitante por esses agentes apresentam risco elevado de doença hepática mais grave, e maior probabilidade de evolução para cirrose e hepatocarcinoma. Tais pacientes constituem um grupo diverso, com replicação viral e perfil imune variáveis ⁽¹⁾.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente dois bilhões de pessoas adquirem, em algum momento da vida, o vírus da hepatite B (VHB), sendo que mais de 350 milhões apresentam a forma crônica da infecção ⁽²⁾. Aproximadamente 75% dos portadores crônicos vivem na Ásia e no Oeste do Pacífico ⁽³⁾. O Ministério da Saúde estima que, no Brasil, pelo menos 15% da população já esteve em contato com o VHB e que 1% da população apresenta doença crônica relacionada a este vírus ^(4,5).

A prevalência da infecção crônica pelo VHB varia nas diferentes partes do mundo, podendo ser classificada como alta, intermediária e baixa ⁽⁶⁾.

Prevalência baixa é encontrada na América do Norte, Europa Ocidental e Austrália. Nessas regiões, a infecção por VHB ocorre em 5% a 7% da população e somente meio por cento a 2% são portadores crônicos. A infecção ocorre geralmente em adolescentes, adultos jovens e pacientes com comportamento de risco, incluindo usuários de drogas, homossexuais masculinos, profissionais da saúde, pessoas que necessitam de transfusão sanguínea e transplante de órgãos e hemodiálise ⁽⁶⁾.

Em países da Europa Ocidental e Meridional, Japão, em parte da América do Sul e no Oriente Médio, têm-se a prevalência intermediária, em que a evidência de infecção pelo VHB corresponde a 10%- 60% da população e, os portadores crônicos, a 2%-7%. A população afetada é representada por adolescentes e adultos, sendo que o alto risco de infecção crônica é mantido principalmente por infecções na infância ⁽⁷⁾.

Prevalência alta é o que se tem no Sudeste Asiático, na China, África e Bacia Amazônica. Nessas regiões, 70%-95% da população têm evidência sorológica de infecção pregressa pelo VHB e no mínimo 8% da população são portadores crônicos. Grande parte das infecções ocorre na infância e na pré-adolescência, a maioria das

crianças é assintomática. A ocorrência de doença aguda é baixa, contudo, o risco de hepatite crônica e hepatocarcinoma é alto nos adultos ⁽⁸⁾.

A incidência mundial de hepatite C não é tão bem estabelecida, uma vez que a infecção aguda é geralmente assintomática. Calcula-se que aproximadamente 3% da população mundial têm infecção pelo vírus da hepatite C (VHC), o que corresponde a cerca de 200 milhões de pessoas ⁽⁹⁾. As maiores taxas são encontradas no Egito e nos Estados Unidos, 1,8% da população apresentam anticorpos para VHC ⁽³⁾. Na Europa, essa taxa passa a ser de cinco a 10 milhões de pessoas e, na Índia, 12 milhões de pessoas, sendo que a maioria delas desconhece ter a infecção. Cerca de 150 mil casos novos de infecção ocorrem anualmente nos EUA e na Europa e, no Japão, são 350 mil. Desses, 25 % são assintomáticos, 60%-80% podem progredir para hepatopatia crônica e 20% podem desenvolver cirrose. Aproximadamente 5% a 7% podem morrer em consequência da infecção ⁽⁹⁾. No Brasil, com base em dados da rede de hemocentros de pré-doadores de sangue, em 2002, a distribuição do vírus variou entre as regiões brasileiras: 0,62% no Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul ⁽⁵⁾. Um dos poucos estudos de base populacional realizados no País revelou 1,42% de portadores de anticorpos VHC na cidade de São Paulo ⁽¹⁰⁾.

A taxa de coinfeção por VHB e VHC é desconhecida ⁽¹⁾. Nos pacientes com infecção crônica pelo VHC, estima-se que o risco de coinfeção com VHB pode variar de 9% a 30%, dependendo da região geográfica ⁽¹⁾. Esses números podem estar subestimados, primeiramente porque não há estudos feitos em larga escala com este objetivo; outro motivo seria a existência da hepatite B oculta, isto é, pacientes com antígeno de superfície do VHB (AgHBs) ausente, porém, carga viral detectável ⁽¹⁾.

Os vírus B e C são transmitidos por vias comuns, o que facilita a coinfeção, principalmente em áreas endêmicas e entre pessoas com risco aumentado de adquirir infecções parenterais, por exemplo, usuários de drogas. Este estudo realizado em Baltimore, Estados Unidos, com usuários de drogas injetáveis, sabidamente portadores crônicos do VHC, mostrou que a maioria (96%) apresentava marcador anti-HBc positivo, e apenas 4 % tinham AgHbs presente ⁽¹¹⁾.

Vírus da Hepatite C

O VHC é um vírus pequeno, de aproximadamente 50nm, com envelope, que pertence à família Flaviviridae, assim como os vírus da hepatite G, da Febre Amarela e da Dengue. Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA que contém aproximadamente 9.500 nucleotídeos. O VHC apresenta helicase vírus específica, protease e polimerases, que mantêm o ciclo viral, e são alvos para a terapia antiviral⁽³⁾.

Há seis genótipos distintos do VHC relatados e múltiplos subtipos têm sido identificados por bases moleculares. Nos EUA e na Europa Ocidental, os genótipos 1a e 1b são os mais comuns. O genótipo 4 é encontrado no Egito, o genótipo 5 na África do Sul e o 6 no Sudeste Asiático. O conhecimento do genótipo é importante para o prognóstico e a escolha do tratamento a ser instituído.⁽³⁾

A transmissão do VHC ocorre principalmente por via parenteral, como nos usuários de drogas injetáveis e transfundidos até 1990, quando foi possível realizar triagem sorológica nos bancos de sangue. Em um percentual significativo de casos, não é possível identificar a via de infecção, mas a transmissão sexual é menos freqüente e ocorre principalmente em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco, como, por exemplo, sem usar de preservativo. A transmissão vertical é rara, quando comparada à de hepatite B, mas gestantes com carga elevada do VHC ou co-infectadas pelo HIV apresentam maior risco de transmissão da infecção para os recém-nascidos. Em adultos, a cronificação da doença, isto é, a hepatite C crônica ocorre em 80% a 85% dos casos, sendo que um terço deles evolui para formas graves em período de 20 anos. O restante evolui de forma mais lenta e talvez nunca desenvolva hepatopatia grave⁽³⁾.

A infecção aguda é raramente diagnosticada. As manifestações clínicas podem ocorrer cerca de oito semanas após a exposição ao vírus, no entanto, com freqüência não há sintomas. A infecção, que se torna crônica na maioria dos casos, evolui por um período longo, geralmente assintomático. A viremia é persistente em 74% a 86% das pessoas, sendo que complicações e morte ocorrem entre 15% a 20% de todos os infectados⁽³⁾.

A presença de linfócitos dentro do parênquima hepático parece indicar que a lesão é imunomediada. A eliminação viral está associada com o desenvolvimento de imunidade específica T dependente forte e persistente. Resposta mediada por linfócitos

T citotóxicos, insuficiente para conter a viremia pode, ainda, ter outros efeitos, pela liberação de citocinas inflamatórias no fígado ⁽¹²⁾.

O diagnóstico de infecção pelo VHC se faz com testes sorológicos, para detecção de anticorpos, e testes moleculares, para pesquisa de partículas virais ⁽¹²⁾. O rastreamento inicial é feito pelo teste imunoenzimático, de segunda e terceira gerações, que contêm proteína do *core* e proteínas não estruturais 3 e 4 (o de terceira geração apresenta também proteína não estrutural 5), e podem detectar anticorpos dentro de quatro semanas a 10 semanas após a exposição ao vírus. O método do *imunoblot* recombinante pode confirmar o teste imunoenzimático, contudo, pode ser substituído pela demonstração de antígenos por métodos moleculares ⁽³⁾.

Os testes de detecção molecular do RNA-VHC classificam-se como qualitativos e quantitativos. Testes qualitativos são baseados em técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase), apresentando limite baixo de detecção, geralmente menor que 100 cópias/ml). São métodos de escolha para confirmação da viremia e avaliação do tratamento ⁽³⁾.

A genotipagem viral ajuda a prever a evolução e a terapêutica a ser utilizada. A genotipagem é realizada por diferentes métodos, a maioria dos quais se baseia em amplificação com método PCR ^(3,12).

Vírus da Hepatite B

O vírus da hepatite B é um vírus DNA da família Hepadnaviridae que infectam, preferencialmente, células hepáticas. O VHB pode ser classificado em sete genótipos (A-G) que variam geograficamente. O genótipo H foi recentemente identificado na América Central. Na China, há prevalência do genótipo B ao norte (85,1%) e C ao sul do país (55%). Os genótipos A e D são encontrados em outras regiões da China ⁽⁶⁾.

A infecção primária pelo VHB pode ser assintomática, a apresentação mais comum, ou sintomática. A maioria das infecções, assintomáticas ou não, são autolimitadas, havendo eliminação viral do sangue e do fígado e desenvolvimento de imunidade contra reinfecção ⁽¹³⁾. Contudo, cerca de 5% das infecções em adultos não se resolvem, desenvolvendo-se a infecção persistente, crônica. Nesses casos, há manutenção da replicação viral no fígado e viremia contínua, embora os títulos da carga viral no tecido hepático e no soro sejam variáveis ⁽¹²⁾. Caso a infecção ocorra durante a

gestação, parto ou amamentação, o risco de cronificação é de cerca de 85% e a manifestação da hepatopatia crônica bem mais precoce. Metade dos casos crônicos evolui para doença hepática avançada cirrose e carcinoma hepatocelular⁽¹³⁾.

Na infecção primária, o AgHBs torna-se detectável no sangue depois do período de incubação de quatro semanas a 10 semanas, seguido do aparecimento do anticorpo contra o antígeno *core* VHB (anti-HBc), que na infecção inicial é representado principalmente pela IgM⁽¹³⁾. A viremia está bem estabelecida no momento em que o AgHBs é detectável e a carga viral frequentemente é alta, de 10^9 - 10^{10} vírus/ mL. Nessa fase há alto risco de transmissão vertical e horizontal⁽¹³⁾.

Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) somente aumentam quando a infecção viral está bem estabelecida. Isso se dá quando a resposta imune mediada por células T já está estabelecida e se inicia a lesão hepática. Uma vez a resposta montada, a quantidade de vírus no sangue começa a declinar, ocorrendo eliminação viral virtualmente de todos hepatócitos, sem destruição exagerada do tecido. Com a eliminação viral, os antígenos do VHB, AgHBs e antígeno *e* (AgHBe) desaparecem da circulação e os anticorpos anti-HBs se tornam detectáveis, definindo a infecção auto-limitada⁽¹³⁾.

O estado de portador crônico do VHB se caracteriza pela manutenção do AgHBs por período superior a seis meses, e ocorre em aproximadamente 5 % dos pacientes adultos infectados pelo vírus⁽⁴⁾. Durante a infecção crônica e aguda do VHB, anticorpos contra o antígeno *core* (anti-HBc), da classe IgG, são encontrados ao mesmo tempo que o AgHBs, contudo, na resolução da infecção o anti-HBc é encontrado juntamente com o anti-HBs⁽¹³⁾. Aproximadamente 10% a 20% de todos os indivíduos com hepatite B têm apenas o anti-HBc positivo, como marcador da infecção pelo VHB⁽¹⁴⁾. Em aproximadamente 10% desses indivíduos, o DNA-VHB pode ser detectado pela PCR⁽¹⁴⁾. A infecção pelo VHB pode também ocorrer em pacientes com AgHBs ausente, que têm somente marcadores de infecção pregressa (anti-HBc)⁽¹³⁾. A ocorrência de infecção pelo VHB em pacientes que não apresentam AgHBs é chamada de infecção oculta pelo vírus B, e os níveis séricos de DNA-VHB são geralmente menores que 10^4 cópias/ ml⁽¹⁵⁾.

A hepatite crônica pelo VHB está associada a altos níveis séricos de DNA-VHB; de grandes concentrações de AgHBe, antígeno que indica replicação viral, no sangue periférico, exceto nos casos de vírus mutantes, que perderam a expressão deste

antígeno; alto risco de transmissão; elevação de enzimas hepáticas; inflamação hepática e aumento do risco de cirrose e hepatocarcinoma. ^(13,15).

Por outro lado, o portador assintomático do VHB apresenta AgHBs detectável, mas baixos níveis séricos de DNA-VHB, o anti-AgHBe presente, o AgHBe ausente e as enzimas hepáticas normais ⁽¹³⁾.

O anti-HBc isoladamente positivo

O “anti-HBc isolado”, ou seja, anti-HBc presente na ausência do AgHBs e do anti-HBs, é compatível com infecção aguda e resolvida, mas pode, também, indicar infecção crônica pelo VHB.

Em áreas de baixa prevalência do VHB, como em países da Europa e nos Estados Unidos, o “anti-HBc isolado” é encontrado em 10% a 20% de todos os indivíduos com marcadores do VHB, isto é, em 1 % a 4% da população. Em 10% desses indivíduos, o DNA-VHB é detectado pela PCR. É possível que a prevalência do “anti-HBc isolado” e a proporção dos indivíduos com DNA VHB detectado pela PCR seja maior em áreas de média e alta endemicidade ⁽¹⁶⁾. Há grande variação da presença de DNA-VHB: 34,6% China, 0% China, 9,6% Holanda, 60% Japão e 8,3% Brasil ^(9, 10, 17,18, 19, 20).

No Brasil, a prevalência do “anti-HBc isolado” varia de acordo com a região estudada; 50% na Amazônia, 1% em Campinas, 16,4% no Rio de Janeiro ^(21,22,23).

Desde 1978, observa-se que a transfusão de sangue com presença de anti-HBc, mas sem o Ag-HBs e anti-HBs, pode levar à infecção pelo VHB nos receptores ⁽¹⁵⁾. Posteriormente descobriu-se que o DNA- VHB também pode ser detectado em pacientes com resultado negativo para AgHBs, mas com anti-HBs presente ⁽¹⁵⁾. Percebeu-se, enfim, que os perfis sorológicos de rotina não são sempre confiáveis para se determinar o estágio da infecção pelo VHB, e que a infecção oculta pelo vírus é uma verdadeira entidade clínica ⁽¹⁵⁾.

Os indivíduos com esse perfil sorológico podem ser classificados em três categorias: fase de janela, observada em infecção aguda em resolução, quando o AgHBs desaparece, surgindo o anti-HBs semanas após; imunidade tardia, em infecções ocorridas há muitos anos, que podem ter concentrações do anti-HBs indetectáveis. Os indivíduos assim classificados possuem proteção contra reinfecção, em virtude de mecanismos celulares imunológicos, com acentuada memória; infecção crônica, em que

a presença de “anti-HBc isolado” pode indicar infecção crônica de baixa atividade, confirmada pela PCR, devido à carga viral baixa, raramente superior a 10^4 cópias/ml⁽¹²⁾.

A infecção oculta pelo VHB tem sido frequentemente relatada nas seguintes situações: em pacientes com anti-HBc como único marcador sorológico; em pacientes sem nenhum marcador viral; em pacientes na fase de convalescença de uma hepatite aguda benigna; em pacientes com carcinoma hepático primário; em pacientes com hepatite crônica pelo VHC⁽¹⁵⁾.

Os motivos para o desaparecimento do AgHBs, ou de todos os marcadores do VHB, são, ainda, desconhecidos, mas há hipóteses de que o rearranjo do genoma viral, particularmente do gene S, poderia ser responsável pela não detecção do antígeno de superfície do vírus⁽²⁴⁾. A PCR demonstra DNA viral no fígado, no soro e em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AgHBs ausente, muito tempo após recuperação clínica^(15,25). No soro, o nível viral é em torno de 10^4 cópias/ml, o que é significativamente mais baixo do que nos pacientes com AgHBs detectável⁽¹⁵⁾. Além disso, observa-se que a viremia tende a flutuar, durante o seguimento de indivíduos com infecção oculta pelo VHB⁽¹⁵⁾. O método preferencial para o diagnóstico deste perfil sorológico é o “in house PCR”, cujo limite de detecção viral está entre 10 cópias e 100 cópias/ml, pois os testes automatizados detectam carga viral acima de 400 cópias/ml⁽¹⁵⁾.

Co-infecção HBV e VHC

A co-infecção por VHB e VHC pode ocorrer e se associar a diferentes manifestações clínicas, como hepatite fulminante, hepatite aguda e crônica e carcinoma hepatocelular^(24,25). A atividade histológica e os níveis de alanina-aminotransferase (ALT) também parecem maiores nos co-infectados⁽¹⁵⁾. Outra característica encontrada nesses pacientes, incluindo aqueles em que a infecção por VHB é oculta, é a tendência em não responder ao tratamento com Interferon⁽¹⁵⁾.

A co-infecção VHB e VHC pode levar a várias situações: hepatite aguda pelos dois agentes, infecção oculta pelo VHB em pacientes com HCC, superinfecção por um desses vírus em indivíduos com hepatite crônica pré-existente⁽¹⁾.

Existem, hoje, poucos estudos sobre hepatite aguda por infecção simultânea pelo VHB e VHC, mas parece que esses agentes interagem nas infecções agudas da

mesma forma que na infecção crônica ⁽¹⁾. Mimms et al ⁽²⁶⁾ estudaram pacientes com infecção aguda pelo VHB e VHC e, comparando-os com pacientes com VHB somente, notaram diminuição nos níveis de ALT e retardo no aparecimento e menor duração do AgHBs nos pacientes coinfetados, comparados aos monoinfetados, sugerindo que o VHC suprime a atividade do VHB.

Em áreas de alta prevalência da infecção pelo VHB, como países asiáticos, o fenômeno de superinfecção pelo VHC é bem discutido ⁽¹⁾. A superinfecção com VHC pode resultar em supressão da replicação VHB e também finalizar o estado de portador (AgHBs presente) ^(1,26). Após a superinfecção e a soroconversão do AgHBs, a infecção por VHC pode persistir e resultar em hepatite crônica permanente ⁽¹⁾. Por outro lado, a interação entre os vírus VHB e VHC também pode resultar em doença hepática mais grave e aumentar o risco de hepatite fulminante. O risco de mortalidade na superinfecção pelo VHC, em pacientes com VHB crônica pode ser maior que 10% ⁽¹⁾.

A superinfecção com VHB em pacientes com HCC é menos comum, mas o risco de desenvolver hepatite fulminante pode aumentar. A eliminação viral, em alguns casos estudados, sugere que o VHB pode ter um papel dominante na supressão do VHC ⁽¹⁾.

Vários estudos mostram que o VHB e o VHC interagem entre si e alteram a resposta imune. Pacientes com hepatite B crônica, co-infetados com VHC, têm supressão da atividade da DNA polimerase do VHB, o que demonstra supressão deste vírus pelo VHC. Além disso, a superinfecção do VHC em paciente com hepatite B crônica pode levar à soroconversão do AgHBe e AgHBs ⁽²⁸⁾.

Sheen et al ⁽²⁹⁾ conduziram estudo longitudinal com um grande número de pacientes com hepatite crônica pelo VHB e encontraram incidência anual de soroconversão do AgHBs de 2,08% nos pacientes coinfetados pelo VHC, comparados com 0,43% nos pacientes monoinfetados.

Vários mecanismos de interferência na replicação do VHB pelo VHC têm sido propostos; Shih et al ⁽³⁰⁾ relataram que a proteína *core* do VHC suprime o VHB. Estudo posterior mostrou que essa proteína suprime a atividade do VHB, afetando a transcrição, inibição que parece ser mais pronunciada com o genótipo 1 do VHC in vivo e in vitro. ⁽³¹⁾ A replicação do VHB é inibida mais eficientemente pelo genótipo 1 do VHC do que pelo genótipo 2, enquanto que a carga viral do genótipo 2 é usualmente mais sensível à interferência do VHB ⁽³¹⁾.

O oposto também pode ocorrer, isto é, o VHB pode inibir a replicação do VHC⁽¹⁾. Nos pacientes co-infectados, há diminuição do RNA do VHC na presença de replicação ativa do DNA VHB⁽²⁸⁾. Pontisso et. al⁽³²⁾ mostraram que 71% dos pacientes co-infectados com VHB/VHC eliminaram o VHC, comparados com 14% dos pacientes infectados apenas com VHC. Pacientes coinfectados têm demonstrado menores níveis de DNA-HBV e RNA-HCV que os controles mono-infectados, indicando que a supressão de ambos os vírus também pode ocorrer⁽¹⁾. A cronologia da infecção tem papel na determinação do vírus com efeito dominante, contudo, esse efeito parece ser da supressão do VHC sobre o VHB^(33, 34).

Anatomia Patológica

O estudo histopatológico do fígado é de grande importância para o prognóstico e para a indicação e controle da terapia medicamentosa. Na HCC, assim como nas outras hepatites por vírus, encontram-se vários tipos de lesão, desde infiltrados inflamatórios, lesões de áreas portais, lesões ductais, até necrose e fibrose em vários estágios⁽³⁵⁾.

O depósito de tecido fibroso ocorre de maneira variável e depende de cada paciente. A fibrose é um componente progressivo na doença, que deforma a arquitetura hepática. Ela é determinada pela deposição de colágeno e “capilarização” dos sinusóides, que sobressaem com aumento da inflamação e da necrose. A contração dos septos fibrosos, junto com a regeneração na forma de nódulos, produz uma distorção da arquitetura hepática e, quando esses nódulos, regenerativos, estão completamente formados, rodeados por septos fibrosos, diz-se que há cirrose⁽³⁶⁾.

O ritmo de progressão para fibrose varia bastante de indivíduo para indivíduo. Em alguns pacientes, a progressão é rápida para cirrose, em outros, a fibrose não acontece ou progride muito lentamente, ao longo de décadas de infecção. Uma vez estabelecida a cirrose, o risco de carcinoma hepatocelular é de aproximadamente 25% ao ano⁽³⁾.

Alguns fatores têm sido estudados como marcadores de progressão da fibrose. Entre eles, os mais importantes são: gênero masculino, a idade em que se adquire a infecção, o abuso de bebidas alcoólicas por período prolongado, maior tempo de infecção viral, imunossupressão de longa data, por HIV ou transplantes de órgãos e a

co-infecção VHB/VHC ⁽³⁾. Esteatose hepática, obesidade e diabetes são outras condições que contribuem para progressão mais acelerada da doença hepática ^(37,38).

A fibrose encontrada na HCC inicialmente é peri-portal e se estende aos espaços vizinhos e até a veia centro lobular pela formação de septos e pontes fibróticas. O estágio final da fibrose é a cirrose, caracterizada pela presença de tecido fibrótico que permeia a maior parte das estruturas mesenquimais portais e centrolobulares, e nódulos isolados de células hepáticas ⁽³⁹⁾.

Alguns estudos observam que a inflamação parece ser a chave para a fibrogênese. Nesses estudos, os fatores que induzem a atração de células inflamatórias e a lesão celular são os responsáveis pela fibrose. Essas substâncias indutoras seriam citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias e superóxidos, modulados por leucócitos infiltrados, células estreladas e células de Kupffer ⁽⁴⁰⁾.

Alguns estudos mostram que pacientes co-infectados apresentam maior risco de cirrose com descompensação clínica ⁽¹⁾. Fong et al ⁽⁴¹⁾ encontraram maiores taxas de cirrose, 44% versus 21%, em paciente co-infectados e infectados cronicamente apenas pelo VHB, respectivamente.

Na Arábia Saudita, pacientes co-infectados, comparados aos pacientes infectados somente pelo VHC, tiveram mais freqüentemente doença hepática descompensada, com alta progressão para cirrose (95% x 48,5%) e classificação *Child C* (37% x 0%) ⁽⁴²⁾.

Considerando a presença do VHB oculto em pacientes com HCC, os estudos são conflitantes. Alguns correlacionam o desenvolvimento de cirrose à presença de níveis baixos de DNA-VHB em pacientes com HCC, como o estudo de Cacciola et al ⁽²⁴⁾, na Itália, que mostraram pacientes com HCC e AgHBs ausente, 46% com DNA-VHB detectável. Nesse mesmo estudo, a cirrose hepática foi diagnosticada em 33 % dos pacientes com HCC e presença de DNA-VHB e em 19% dos pacientes com VHC presente e DNA-VHB ausente.

Estudo brasileiro, realizado em Campinas, encontrou cirrose em 20% dos pacientes com HCC e VHB oculto e em 12% nos pacientes somente com HCC, diferença que não foi significativa. No mesmo estudo, demonstrou-se que as lesões histopatológicas hepáticas não foram mais intensas nos pacientes co-infectados ⁽²⁷⁾.

Estudo realizado em Taiwan, igualmente, não mostrou relação da infecção oculta pelo VHB, em pacientes portadores de HCC, gravidade da doença hepática e com o tempo de desenvolvimento de hepatocarcinoma ⁽⁴³⁾. A discrepância desse estudo

com os demais ocorre pela exposição da população de Taiwan, desde a infância, ao VHB. Essa exposição, tão precoce, pode induzir tolerância ao VHB e, como consequência, arrefece seu papel na indução da lesão hepática.⁽⁴³⁾

Imunologia

O fígado é um órgão vital que é enriquecido por células da resposta imune inata, como as *natural killer* (NK), células *natural killer* T (NKT) e uma população especial de macrófagos, as células de Kupffer. Essas células são capazes de rapidamente secretar um conjunto de citocinas pró-inflamatórias, que exibem efeito antiviral direto, ativam e mantêm a resposta imune inata, iniciam a resposta imune antígeno-específica e recrutam e ativam células linfomononucleares antígeno-específicas das proximidades⁽⁴⁴⁾.

Em qualquer infecção viral, a primeira linha de defesa é mediada pelas próprias células infectadas. A maioria das células rapidamente reconhece a presença do agente e responde com a produção de interferon (α/β). O interferon (α/β) inibe a replicação de muitos vírus, incluindo o VHB e VHC, pela inibição da síntese protéica viral. Para ajudar nesses efeitos antivirais, o interferon (α/β) recruta e ativa macrófagos que, ativados, secretam citocinas e quimiocinas⁽⁴⁴⁾.

A resposta imune celular resulta da atividade de linfócitos T CD4 *helper* (Th) ou T auxiliares, e linfócitos T CD8 ou T citotóxicos (Tc). Células de Kupffer ativadas por linfócitos T CD4 podem ativar células NK, levando à lise inespecífica de células infectadas do hospedeiro. Elas também produzem citocinas que regulam linfócitos B, produtores de anticorpos, e aumentam a atividade de células⁽⁴⁴⁾. As células CD4 *helper* reconhecem peptídeos virais por moléculas MHC II e células apresentadoras de antígenos.

Estudos demonstram que uma resposta forte e sustentada de células Th está correlacionada com a eliminação viral. Outra evidência é de que a atividade de células Tc pode ser inversamente proporcional à carga viral. Esses achados sugerem que a função das células citotóxicas seja a de controlar a infecção viral no estágio agudo e precoce da doença.⁽⁴⁴⁾

A resposta imune envolve, além da proliferação celular, a produção de fatores solúveis, as citocinas, as quais regulam o funcionamento do sistema imune. De acordo

com o padrão das citocinas produzidas por linfócitos Th, a resposta imune pode ser dividida em Th0, Th1 e Th2. As células Th1 produzem interferon – gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL2). As células Th2 produzem as interleucinas 5 (IL-5), 10 (IL-10) e 4 (IL-4). As células Th0 são precursoras das células Th1 e Th2, por isso produzem um padrão misto de citocinas Th1 e Th2⁽⁴⁵⁾.

O IFN e a IL-2 são citocinas relacionadas com funções editoras da resposta imune, responsáveis por ativação e proliferação celular. A IL-2 é uma das principais citocinas relacionadas com a indução da proliferação de linfócitos T, Tc e B e células NK. Também é o principal fator de crescimento para células T CD4, com fenótipo Th1. O INF- γ tem a função de ativar as células NK; os macrófagos, para exercer função microbicida, por meio da produção de óxido nítrico (NO), e de modular a resposta imune, suprimindo a atividade das células Th2. Em associação com o fator de necrose tumoral (TNF- α), o γ IFN induz ativação de macrófagos e granulócitos para destruir células infectadas⁽⁴⁶⁾.

A IL-10 relaciona-se com a desativação de células envolvidas na resposta imune, estando ligada a funções das células Th2. Apresenta propriedade antiinflamatória e supressora da resposta imune, induz a produção de anticorpos, ao mesmo tempo em que inibe a função dos macrófagos para destruir patógenos e a síntese de várias citocinas, tais como IL-1, IL-8, IL-6, TNF- α e IL-12⁽⁴⁶⁾.

Durante a infecção aguda, a maioria das células que infiltram o fígado tem atividade Th1, com função de destruir o patógeno. Essas células liberam IL-2 e γ IFN, que podem ativar efeitos antivirais, mas também causam inflamação e necrose. Citocinas do perfil Th2, como a IL-10, inibem a atividade Th1 logo após a infecção aguda, e quando a infecção é persistente, seu papel pode ser de proteger contra os potenciais efeitos danosos da células Th1^(45,47).

Tem sido demonstrado que na HCC, pacientes que apresentam diminuição da viremia têm uma potente resposta tipo Th1, com moderada atividade Th2. Os doentes que têm resposta Th1 mais vigorosa mostram-se capazes de eliminar o vírus e se recuperam na fase aguda. Por outro lado, a infecção persiste na maioria dos pacientes com resposta Th1 fraca, porque o alto nível de mutação do vírus permite o escape viral^(48,49).

Fibrose Hepática e Citocinas

A fibrose hepática resulta de uma resposta biológica frente ao dano hepático crônico e subsequente remodelação hepática. Inicialmente, a fibrogênese é um processo dinâmico, que visa reparar uma agressão ao tecido, e se caracteriza pela síntese de moléculas da matriz extracelular, proteínas (colágeno, elastina), glicoproteínas (fibronectina e laminina) e proteoglicanos organizados e interconectados numa estrutura tridimensional. Essa síntese é compensada por mecanismos de fibrinólise, que visam limitar uma agressão externa exacerbada. No entanto, isso geralmente resulta num equilíbrio entre fibrogênese e fibrinólise, em favor da fibrogênese, e conseqüente acúmulo de matriz extracelular, que leva à desorganização da arquitetura hepática. Vários fatores têm sido envolvidos na fibrogênese hepática, entre eles citocinas, receptores da matriz extracelular, moléculas de adesão, endotelinas, norepinefrina, metaloproteinases, inibidores das metaloproteinases, fatores de crescimento, entre outros ⁽³⁹⁾.

Na presença de produção excessiva de citocinas Th1 e pró-inflamatórias, como IL-2, IFN- γ e TNF- α , predominam os efeitos pró-inflamatórios, havendo maior lesão hepática, com grande quantidade de necrose celular e fibrose ⁽³⁹⁾. A IL-10, inibindo a expressão de IL-2, IFN- γ e TNF- α , também modula os efeitos indutores de fibrose daquelas citocinas. A IL-10, pela sua proeminente atividade anti-fibrótica, pode levar à diminuição de expressão do colágeno tipo I, enquanto induz aumento do colágeno intersticial. Pacientes com formas moderadas da HCC têm alta expressão de IL-10, enquanto aqueles com doença hepática progressiva têm menor quantidade de IL-10 ⁽⁵⁰⁾.

O TGF- β é a citocina responsável pela reparação e regeneração dos tecidos, depois da lesão, promovendo quimiotaxia de monócitos e linfócitos, induzindo angiogênese e controlando a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios para o tecido lesado ^(51,52). Nesse sentido, estimula a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno e proteoglicanas, aumenta a expressão de integrinas sobre a superfície das células o que facilita a adesão para a matriz extracelular ^(53,54). Entretanto, a produção excessiva de TGF - β pode ser responsável pela cicatrização de feridas, caracterizada pela exuberante formação e deposição da matriz, podendo levar à fibrose.

Tratamento

Pacientes com HCC, sem tratamento prévio, com RNA de VHC detectável pela PCR, são candidatos a 24 semanas ou 48 semanas de terapêutica, dependendo do genótipo vira⁽¹⁾. Dois grandes estudos demonstraram que a combinação de interferon α com ribavirina aumenta a porcentagem de resposta virológica sustentada (RVS), definida como RNA de VHC indetectável pela PCR após seis meses do término do tratamento, de 16% com interferon α somente, para 40%, na associação com ribavirina^{55,56}. Ambos os estudos também demonstraram que infecções com genótipo 2 e 3, a duração do tratamento de 24 semanas é suficiente, enquanto que para o genótipo 1 o tempo ideal de tratamento é de 48 semanas.

Quando a carga viral, medida pelo RNA-VHC, passa a ser indetectável, a inflamação hepática diminui, prolongando a evolução da doença hepática⁽⁵⁷⁾. Arif et. al.⁽⁵⁸⁾ avaliaram 56 pacientes submetidos à biópsia hepática, antes do tratamento e após seis meses de tratamento com interferon e ribavirina. Desses pacientes, 27 obtiveram RVS e 29 não conseguiram. Significante melhora na atividade inflamatória foi observada nos pacientes que apresentaram RVS, o que não ocorreu nos pacientes sem RVS. Por outro lado, ambos os grupos tiveram melhora na fibrose hepática, o que permite concluir que a fibrose, que se julgava irreversível, pode sofrer mudanças dinâmicas em resposta ao tratamento combinado.

Outro estudo realizado por Heathcote et al.⁽⁵⁷⁾ comparou o tratamento em pacientes que já apresentavam na biópsia hepática cirrose e pontes de fibrose. Obtiveram melhora histopatológica 31% dos pacientes tratados com interferon alfa/2 a, 44% dos tratados com Peginterferon alfa 2 (80 μ g) e 54% dos pacientes tratados com Peginterferon alfa -2b (180 μ g). Nesse estudo, um terço dos pacientes que não conseguiram a resposta virológica sustentada obteve melhora histopatológica, sugerindo que tais pacientes podem se beneficiar com o tratamento.

O interferon é uma medicação imunomoduladora com efeitos antiviral e antiproliferativo. O interferon α (IFN α) é aprovado para o tratamento de ambas hepatites B e C⁽¹⁾. A adição de polietilenoglicol no interferon α (peginterferon) estende a meia vida e a duração da atividade terapêutica. O tratamento com peginterferon aumenta a resposta terapêutica⁽³⁾.

Resposta reduzida ao tratamento com interferon tem sido descrita em indivíduos com HCC e marcadores sorológicos de infecção pelo VHB resolvida (AgHBs

ausente/Anti-Hbc presente), talvez pela infecção inaparente pelo VHB⁽⁵⁹⁾. Mais recentemente, alguns autores têm observado que a infecção oculta pelo VHB pode levar à pior resposta ao tratamento nos indivíduos com HCC ^(24,59,60). Cacciola et al.⁽²⁴⁾ detectaram resposta virológica em 21% e 42% nos pacientes com HCC que tinham ou não infecção oculta pelo VHB, respectivamente. Estudo brasileiro não encontrou diferenças significativas quanto à resposta ao tratamento em pacientes com HCC com ou sem infecção oculta pelo VHB (37,5% e 20,5%) respectivamente, quando esses pacientes foram tratados com interferon, sozinho ou combinado com ribavirina ⁽²⁷⁾. O mesmo foi observado em um estudo em Taiwan, com 110 pacientes com hepatite C crônica. A prevalência da infecção oculta pelo VHB não influenciou a gravidade da doença hepática e nem a resposta ao tratamento⁽⁴³⁾.

Justificativa do Estudo

A perspectiva de lesão hepática importante no portador crônico do VHC pode, pode ser portador oculto do VHB. A presença de co-infecção VHB-VHC pode, ainda, influir na resposta ao tratamento com interferon α/β , sendo um fator complicador. A atividade de células T helper e T citotóxica nos tecidos hepáticos tem, a par de seus efeitos protetores, papel importante na lesão celular. Isso se dá principalmente pela secreção de substâncias como γ IFN, TNF- α , TNF- β . Na presença da co-infecção VHB-VHC, esses eventos podem ocorrer com ainda ser agravada pela presença de co-infecção com VHB. No entanto, essa co-infecção só se caracteriza claramente quando é detectado o AgHBs do VHB. Por outro lado, sabe-se que o indivíduo que tem outros marcadores do VHB, como anti-HBc com anti-HBs, e até o anti-HBc isolado maior intensidade.

No ambulatório de Hepatites Virais Crônicas, da Disciplina de Moléstias Infecciosas, pacientes com VHC crônica, com e sem tratamento com interferon α/β e ribavirina, são atendidos sem que se saiba ao certo se têm co-infecção com VHB, a menos que tenham o AgHBs detectado juntamente com o anti-VHC. A descoberta de infecção oculta pelo VHB, por meio da procura do DNA viral, por técnica sensível, como a *in house* PCR poderia ser de grande valia, permitindo que se tentasse posteriormente promover a eliminação do VHB, por meio da vacinação específica. Esse

fato seria importante, tanto para remover um outro fator de indução da inflamação, que é o VHB, como para garantir melhor resposta ao tratamento pelos pacientes com doença crônica pelo VHC.

Objetivos

Geral

1) Avaliar a relação dos níveis das citocinas γ IFN, TNF- α , IL-10, IL-12 e TGF- β com as alterações inflamatórias hepáticas, em portadores crônicos com VHC;

2) Avaliar a influência do tratamento com Interferon α/β e ribavirina e da co-infecção do VHB nessa relação.

Específicos

1) Determinar a presença do VHB oculto em portadores crônicos do VHC, pela utilização da técnica da *in house* PCR.

2) Determinar os níveis séricos das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12 e TGF- β em indivíduos saudáveis do grupo controle e em doentes com infecção pelo VHC, com e sem co-infecção pelo VHB oculto, ainda não tratados com interferon α/β e ribavirina e em pacientes após seis meses de tratamento.

Casuística e Métodos

Casuística

Neste trabalho, foram estudados 55 pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, no período de Janeiro de 2006 a março de 2007. A maioria desses pacientes foi encaminhada para o ambulatório, principalmente pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu, após triagem sorológica de doadores de sangue.

Todos os pacientes apresentavam HCC, confirmada por sorologia (presença de anti-VHC) por método imunofluorimétrico em micropartículas (MEIA) e RNA de VHC detectável pela PCR, com genotipagem e biópsia hepática realizadas antes do tratamento e após seis meses deste. Todos os pacientes apresentavam resultado de pesquisa do marcador para hepatite B, AgHBs, negativo.

Dos 55 pacientes com HCC, 38 nunca haviam sido submetidos ao tratamento para hepatite e 17 pacientes já haviam sido tratados com Interferon e ribavirina, tendo finalizado o tratamento seis meses antes da coleta de dados deste estudo.

Além dos pacientes, também foram estudados 20 doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, que não eram portadores do VHC, e foram usados como grupo controle, representando indivíduos saudáveis.

As dosagens de citocinas e a pesquisa de DNA do VHB pela PCR foram realizadas no Laboratório de Pesquisa na Área de Doenças Tropicais, da Faculdade de Botucatu, Unesp.

Os pacientes eram acompanhados no Ambulatório de Hepatites Virais, e todos os tratados apresentavam genótipo tipo 1 e foram submetidos a 48 semanas de associação de interferon peguilado e ribavirina.

Todos os indivíduos da casuística concordaram em participar do estudo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Métodos

1) Formação dos Grupos

A partir dos 55 doentes e dos 20 doadores de sangue, foram formados três grupos, a saber:

Grupo 1 (G1): 38 pacientes HCC, que ainda não haviam sido tratados com interferon α e ribavirina.

Grupo 2 (G2): 17 pacientes HCC, no momento da realização da biópsia hepática de controle, seis meses após o término do tratamento com interferon α e ribavirina.

Grupo 3 (G3): Grupo controle, constituído de 20 indivíduos, provenientes do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-Unesp, doadores de sangue, considerados sadios, que apresentavam sorologias negativas para HIV, VHC, VHB, *Treponema pallidum* e *Trypanossoma cruzi*. O grupo controle teve a finalidade de definir os valores considerados normais para as citocinas IL-2, IL-10, TGF- β , γ -IFN e TNF α .

Os critérios de inclusão para os G1 e G2 foram:

- Apresentar sorologia com resultado positivo para VHC e pesquisa de RNA do VHC positiva.
- Apresentar pesquisa de AgHBs com resultado negativo, para excluir pacientes com hepatite crônica ou aguda pelo VHB.
- Ter idade maior ou igual a 18 anos, de ambos os sexos.
- Ter critérios clínicos e laboratoriais para realização da biópsia hepática
- Não ser gestante ou puérpera
- Apresentar sorologia com resultado negativo para HIV, HTLV, doença de Chagas e sífilis.
- Não apresentar imunossupressão clinicamente diagnosticada e não usar drogas imunossupressoras.
- Consentir em participar do estudo

2) Caracterização da Infecção pelo VHC

Os pacientes caracterizados como portadores de infecção pelo VHC tinham anticorpos contra o VHC identificados pelo método imunofluorimétrico em partículas e tinham também pesquisa de RNA do VHC pela PCR positiva e Genotipagem para VHC realizada.

3) Coleta de sangue

Foram coletados 4,0 ml de sangue de veia periférica de cada paciente para a realização do PCR *in house* para pesquisa do vírus oculto em todos os pacientes. Simultaneamente, foram coletados 7,0 ml de sangue de veia periférica para dosagem de citocinas séricas IL-2, TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL10. O soro foi estocado em alíquotas que permaneceram sob refrigeração a -80°C até a determinação dos níveis das citocinas e realização da PCR.

4) Realização da *in house* PCR, segundo a técnica de Kaneno modificada (HBV-Vírus oculto, Região Core).

Extração de DNA:

A extração do DNA do VHB foi realizada por desnaturação inicial com 2,5 NaOH 0,5M adicionados a 10 μl de soro e incubação a 37°C por 60 minutos, seguida por neutralização com 2,5 μl de HCL 0,5M.

PCR Qualitativa

Foram utilizados *primers* descritos por Kaneno et al ^(35,36), que amplificam 270 pares de bases (pb) de comprimento.

Cada tubo da reação de 0,2 ml recebeu 10 μl de tampão de PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3), 4,0 μl de MgCl₂ (50mM), 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs (6,0 μl), 1 $\mu\text{mol/L}$ do primer 2032-R (5`-CTGACTACTAATTCCCTGGATGCTGGGTCT – 3`) e 1 $\mu\text{mol/L}$ do primer 1763 (5`-GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCCGTA TAA -3`), 2,5U de taq-polimerase (0,5 μl), 25,0 μl do produto de extração do DNA da amostra testada e 62,5 μl de água ultra-pura. A reação foi amplificada em termociclador conforme as seguintes condições: 25 ciclos, sendo 94°C por 1 minuto (desnaturação das moléculas de cadeias duplas do DNA alvo), 42°C por 1 minuto (anelamento do *primer*

com sua respectiva cadeia de DNA) e 72°C por 3 minutos (extensão da cadeia de DNA), e para a extensão final, 1 ciclo a 72°C por 3 minutos

Ao final da primeira reação da PCR, 10,0µl do produto amplificado foram submetidos a um novo ciclo de amplificação, de acordo com a técnica descrita acima (*nested-PCR*), substituindo-se apenas os *primers* anteriores pelos *primers* 1778-E (5'-GACGAATTCCATTGACCCGTATAAAGAATT-3') e 2017-RB.

Eletroforese em gel de agarose

Foram retirados 7,0µl do produto final de cada amostra, corados com 2,0µl de azul de bromofenol e submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,8% corado pelo brometo de etídio. Após a corrida eletroforética, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta.

Amostras de 5,0µl de 100pb DNA foram utilizadas como padrão de peso molecular. Uma alíquota de água foi utilizada como controle negativo da reação e o soro de um indivíduo reagente para VHB pela reação de ELISA foi utilizado como controle positivo, garantindo o resultado da PCR.

5 – Determinações das citocinas séricas

Os níveis séricos de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-2, IL10 foram determinados por método ELISA, utilizando Kits comerciais (R & D Systems), de acordo com as especificações do fabricante.

Para aplicação do método, inicialmente, microplacas de 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada (IL-12, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL10). A seguir, foram adicionados soros dos doentes (diluição 1:2) e soros controles positivos e negativos, com posterior incubação em temperatura ambiente, por diferentes períodos que variaram de 2 a 3 horas, na dependência da citocina dosada. Depois, foram feitas quatro lavagens com solução detergente contendo 2- cloroacetamida (0,1%). Esse processo foi repetido até a fase anterior à adição do substrato. Posteriormente, as placas foram incubadas em temperatura ambiente com anticorpo policlonal anticitocina humana dosada, marcada com biotina, sendo colocada, a seguir, estreptovidina ligada à peroxidase. Após o período de incubação, foi adicionado, aos orifícios das placas, o substrato formado por peróxido de hidrogênio (0,02%) e tetrametilbenzina (2%). A interrupção da reação foi realizada em temperatura

ambiente, utilizando-se ácido sulfúrico 1M. Os resultados foram avaliados por leitura óptica (DO) em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan), em comprimento de onda de 450nm. As concentrações das citocinas, medidas em pg/ml, presentes no soro foram calculadas a partir dos resultados obtidos na curva padrão, realizada com a citocina recombinante humana dosada no ensaio.

A determinação dos níveis das citocinas foi realizada no Laboratório de Pesquisa da Área de Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu- Unesp

6 – Biópsia Hepática.

A biópsia hepática foi realizada por profissional médico da Seção de Radiodiagnóstico do Hospital das Clínicas. Com o paciente colocado no divã clínico, em posição de decúbito dorsal horizontal, foi marcado o ponto de introdução da agulha de biópsia entre os arcos costais, à direita, realizando-se antissepsia do local com Clorhexidina alcoólica. Anestesia foi feita com cerca de 10 ml de Lidocaína a 2% sem vaso constritor, no ponto marcado para a biópsia. A agulha da biópsia foi introduzida até atravessar a musculatura intercostal. Em seguida, foi disparado o dispositivo de biópsia, tipo “revólver”, que extraiu o fragmento hepático. Esse fragmento foi armazenado em frasco contendo formol.

As amostras de tecido hepático foram processadas na rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas. As amostras foram classificadas e estadiadas de acordo com a classificação da Sociedade Brasileira de Patologia (SBH). Os pacientes submetidos à biópsia foram internados e mantidos em observação por período de 12 a 24 horas, na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Durante a internação, realizaram-se medidas de pulso periférico, pressão arterial e exame físico de abdômen, a cada hora. O paciente recebeu alta quando, após todos estes cuidados, não foi verificado nenhum sintoma ou alteração do exame físico.

Métodos de Classificação das Alterações Histológicas Hepáticas

Nas hepatites virais crônicas, a classificação das alterações histopatológicas do fígado mais adotada no país é aquela proposta pela Sociedade Brasileira de Patologia (SBH) e observa os seguintes parâmetros:

Alterações estruturais- fibrose: estadiamento de 0 a 4(zero a quatro).

Atividade Necro-Inflamatória

Portal: de zero a 4.

Peri-portal: de zero a 4.

Lobular: de zero a 4.

7) Análise Estatística

Os dados foram analisados seguindo a seguinte estratégia:

Etapa 1) Análise exploratória para estudar a forma da distribuição probabilística dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os grupos em comparação. Com base no teste de Shapiro-Wilk, não houve evidências para concluir que a forma da distribuição dos níveis séricos das citocinas era, ao menos, simétrica para permitir o emprego de técnicas paramétricas que comparassem grupos e estimassem efeitos em relação a média dos grupos.

Etapa 2) Comparação entre grupos por meio dos testes não paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para amostras independentes.

8) Aprovação no Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, em maio de 2006.

Resultados

1) Distribuição dos 55 doentes com HCC de acordo com gênero, faixa etária e cor da pele.

Neste estudo de 55 pacientes com HCC, predominou o sexo masculino, com 34 (62%); participaram da pesquisa 21(38%) mulheres participantes (Figura 1). Quanto à distribuição etária, 15 pacientes estavam entre 18 e 30 anos, 11 entre 31 e 40 anos, 10 entre 51 e 60 anos, quatro entre 61 e 70 anos e apenas um paciente tinha idade superior a 70 anos (Figura 2). Em relação aos fatores de risco avaliados, 20 eram usuários de drogas (36,4%) e 23 receberam transfusão de sangue (42%) (Figuras 3 e 4).

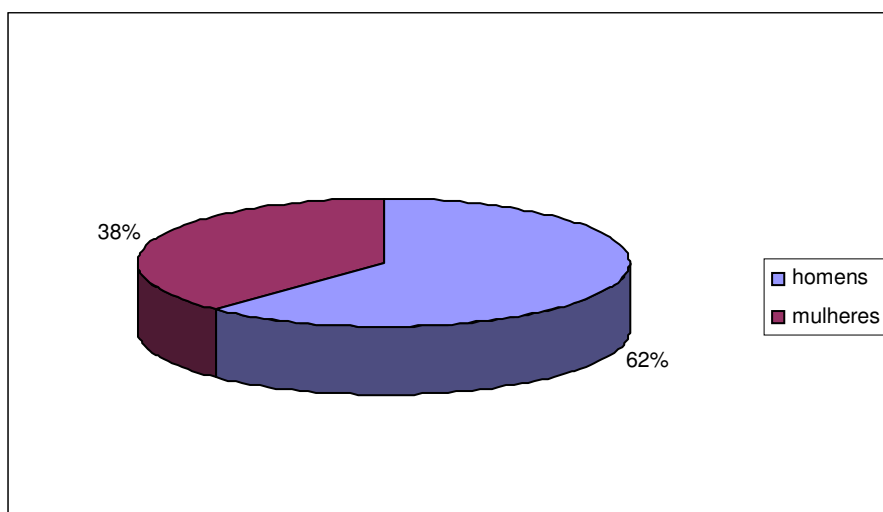


Figura 1 – Distribuição dos 55 pacientes com HCC, em relação ao gênero.

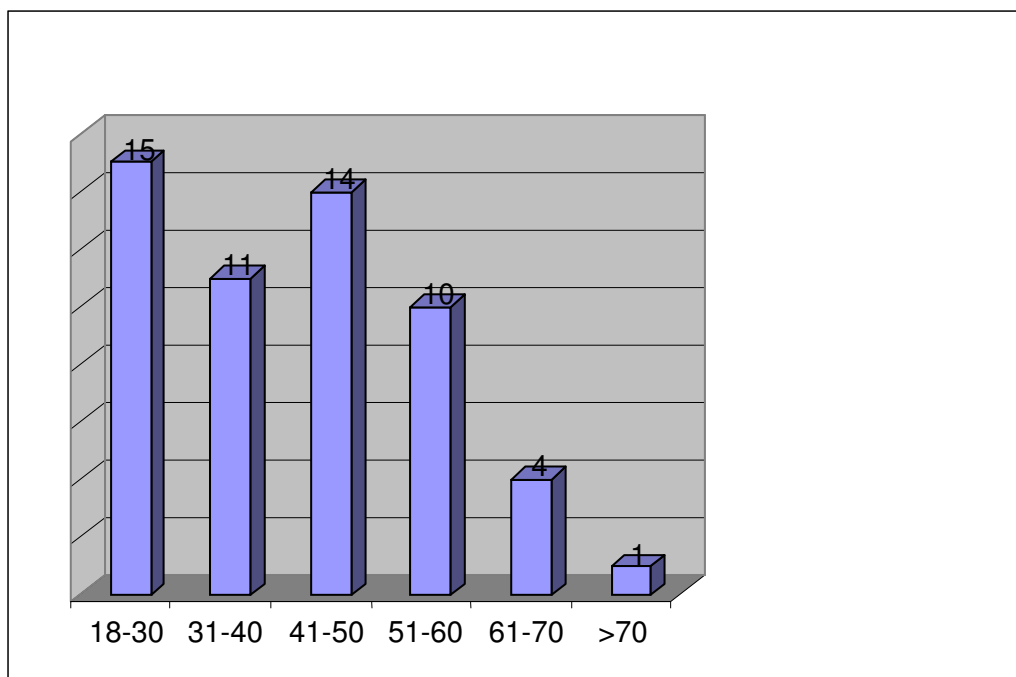


Figura 2 – Distribuição dos 55 pacientes com HCC, de acordo com a faixa etária.

Quanto à cor da pele, houve predomínio de brancos, com 44 (80%), seguidos de sete (13 %) pardos e quatro (7%) negros (Figura 5) .

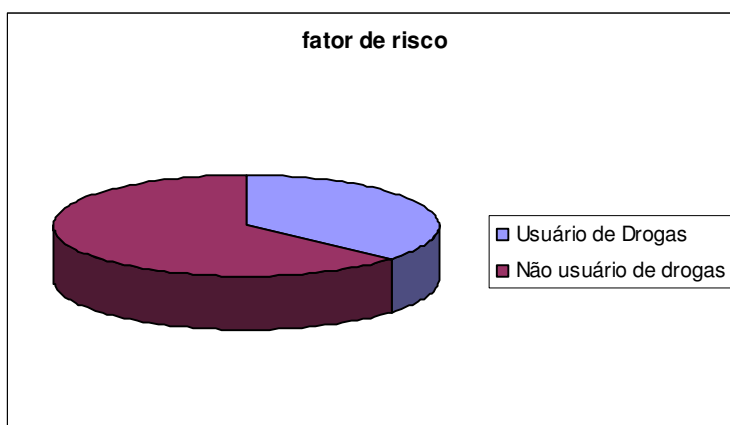


Figura 3 – Distribuição dos 55 pacientes com HCC com uso de drogas como fator de risco.

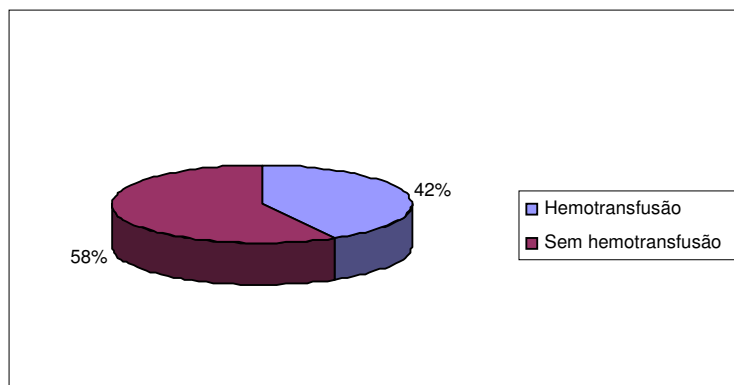


Figura 4 – Distribuição dos 55 pacientes com HCC com hemotransusão como fator de risco.

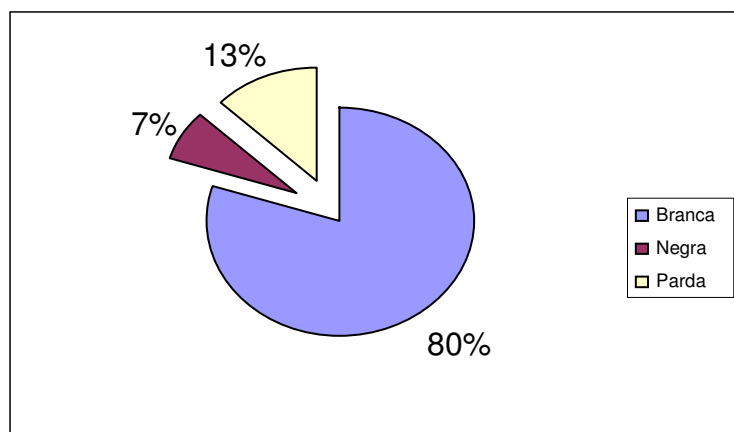


Figura 5 – Distribuição dos 55 pacientes com HCC com a cor da pele.

Nos 55 pacientes estudados, apenas nove apresentavam marcador de infecção prévia pelo VHB, representado pelo anti-HBc; desses nove pacientes, quatro também apresentavam anti-HBs, indicando controle da infecção. Dos 46 pacientes com anti-HBc ausente, 18 tinham anti-HBs, como resultado da vacinação contra Hepatite B, recomendada na rotina do acompanhamento dos pacientes com HCC. A presença de co-infecção oculta pelo VHB, pesquisada pela PCR *in house*, não se confirmou em todos os 55 pacientes avaliados.

2) Distribuição dos 55 doentes com HCC de acordo com o grau de fibrose e sua relação com as citocinas estudadas.

A biópsia hepática, realizada nos 55 pacientes, mostrou fibrose ausente ou leve (F0 e F1) em 26 (47,2 %), moderada (F2) em 25 (45,5%), grave (F3) em três (5,5%), e um paciente (1,8%) apresentava cirrose (F4). Para a análise estatística, esses dois últimos grupos foram reunidos em um só, o de pacientes com fibrose grave e cirrose.

Cada uma das citocinas, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-2, dosadas nos 55 pacientes do estudo, foram relacionadas ao estágio de fibrose apresentado pelos doentes. Desse modo, nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1), a mediana dos níveis séricos de IL-10 encontrados foi de 21,5pg/ml (var: 17,7pg/ml; 31,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75); nos pacientes com fibrose moderada (F2), os níveis séricos encontrados tiveram mediana de 26,0pg/ml (var: 18pg/ml ;34,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e nos pacientes com fibrose grave (F3) ou cirrose (F4), a mediana dos níveis séricos de IL-10 foi de 25pg/ml(var: 16,5pg/ml; 54,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75) com $p = 0,88$. (Tabela 1)

Nos pacientes com ausência de fibrose ou fibrose leve, a mediana dos níveis séricos de IFN γ encontrados foi de 369,0pg/ml (var: 297,5pg/ml; 414,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75); nos pacientes com fibrose moderada (F2), os níveis séricos encontrados tiveram mediana de 377,0pg/ml (var; 256,0pg/ml ; 511,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e nos pacientes com fibrose grave ou cirrose, a mediana dos níveis séricos de γ IFN foi de 317,5pg/ml(var:233,5pg/ml; 471,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75); $p = 0,79$. (Tabela 1)

A dosagem de TNF α nos pacientes com ausência de fibrose ou fibrose leve, mostrou mediana dos níveis séricos de 320,0pg/ml (var: 210,0pg/ml: 417,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75); nos pacientes com fibrose moderada (F2), os níveis séricos encontrados tiveram mediana de 333,0pg/ml (var: 264,0pg/ml;417,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e nos pacientes com fibrose grave ou cirrose, a mediana foi de 282,5pg/ml(var:210,5pg/ml ;378,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75); $p = 0,584$. (Tabela

Nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1), a mediana dos níveis séricos de TGF- β encontrados foi de 411,5pg/ml (var: 299,2pg/ml; 485,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75); nos pacientes com fibrose moderada (F2), os níveis séricos encontrados tiveram mediana de 404,0pg/ml (var: 325,0pg/ml; 501,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e nos pacientes com fibrose grave (F3) ou cirrose (F4), a mediana dos níveis séricos de TGF- β foi de 373,5pg/ml(var:265,5pg/ml ; 453,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75); $p = 0,781$. (Tabela 1)

A mediana dos níveis séricos de IL-2 encontrados nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 141,5pg/ml (var: 110,0pg/ml; 192,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75); nos pacientes com fibrose moderada (F2), os níveis séricos encontrados tiveram mediana de 129,0pg/ml (var; 108,0pg/ml;205,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e nos pacientes com fibrose grave (F3) ou cirrose (F4), a mediana dos níveis séricos foi de 95,5pg/ml(var: 84,0pg/ml ;164,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75); $p = 0,155$. (Tabela 1)

Tabela 1 – Comparação entre diferentes graus de fibrose (F0, F1, F2, F3 e F4) em relação aos níveis séricos das citocinas estudadas.

<i>Citocina</i>	<i>Sem fibrose ou</i>	<i>Fibrose Moderada</i>	<i>Fibrose Grave ou Cirrose (n=4)</i>	<i>p(*)</i>
	<i>Fibrose leve (n=26)</i>	<i>(n=25)</i>		
IL10 (pg/ml)	21,5 (17,7 ; 31,2)	26,0 (18,0 ; 34,5)	25,0 (16,5 ; 54,5)	0,886
IFN (pg/ml)	369 (297,5 ; 414,0)	377,0 (256,0 ; 511,5)	317,5 (233,5 ; 471,2)	0,798
TNF (pg/ml)	320,0 (210,0 ; 417,0)	333,0 (264,0 ; 417,0)	282,5 (210,5 ; 378,5)	0,584
TGF (pg/ml)	411,5 (299,2 ; 485,5)	404,0 (325,0 ; 501,0)	373,5 (265,5 ; 452,0)	0,781
IL2 (pg/ml)	141,5 (110,0 ; 192,0)	129,0 (108,0 ; 205,5)	95,5 (84,0 ; 164,7)	0,155

(*) Teste de Kruskal-Wallis. Resumo descritivo dos valores de citocinas apresentados em medianas e quartis 25 e 75.

3) Distribuição dos 38 doentes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina e dos 17 tratados, de acordo com o grau de fibrose hepática.

Os 55 pacientes com HCC foram separados em dois grupos: o grupo formado por pacientes que haviam sido submetidos previamente ao tratamento com interferon alfa e o grupo virgem de tratamento. O grupo de pacientes não tratados com interferon α contou com 38 indivíduos; desses, 20 (52,6%) não apresentavam fibrose (F0) ou apresentavam fibrose leve (F1), 15 pacientes (39,4%) apresentavam fibrose moderada(F2) e três pacientes(7,8%) apresentavam fibrose avançada (F3) ou cirrose (F4). O grupo de pacientes submetidos ao tratamento contou com 17 indivíduos, sendo que seis (35,3%) não apresentavam fibrose ou tinham fibrose leve, dez (58,8%) apresentavam fibrose moderada (F2), um paciente (5%) apresentava fibrose avançada (F3). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados com

interferon α em relação à distribuição dos pacientes segundo o grau de fibrose ($p=0,806$: teste de qui quadrado) e não houve, portanto, discriminação da fibrose pela dosagem das citocinas, isto é, os grupos foram homogêneos em relação à intensidade de fibrose.

4) Distribuição dos 35 pacientes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina, de acordo com a relação entre as citocinas estudadas e o grau de fibrose hepática.

Considerando o grupo dos 35 pacientes com HCC e fibrose leve ou moderada, excluindo os pacientes com fibrose grave, não tratados com interferon α , a mediana para IL-10 nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 21,5pg/ml (var: 18,75pg/ml ; 36,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 26,0pg/ml (var: 18,0pg/ml; 38,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p=0,640$. (Tabela 2). A mediana para IFN γ nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 389,0pg/ml (var: 322,5pg/ml;426,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 406,0pg/ml (var: 220,0pg/ml ;480,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p=0,920$. (Tabela 2). A mediana para TNF- α nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 308,0pg/ml (var:208,0pg/ml; 428,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 333,0pg/ml (var: 284,0pg/ml; 436,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p=0,395$ (Tabela 2). A mediana para TGF- β nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 382,5pg/ml (var: 295,7pg/ml ; 486,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 411,0pg/ml (var: 330,0pg/ml :496,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p=0,405$. (Tabela 2). A mediana para IL-2 nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 161,5pg/ml (var: 119,0pg/ml; 195,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 129,0pg/ml (var: 108,0pg/ml ; 211,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p=0,947$. (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre graus de fibrose hepática em relação aos níveis séricos das citocinas estudadas, apresentados em mediana, dos 35 pacientes que não foram submetidos ao tratamento com interferon alfa e ribavirina, com fibrose leve ou moderada.

<i>Citocina</i>	<i>Sem fibrose ou</i>		<i>p</i> (*)
	<i>Fibrose leve (n=20)</i>	<i>Fibrose Moderada (n=15)</i>	
IL10 (pg/ml)	21,5 (18,7 ; 36,5)	26,0 (18,0 ; 38,0)	0,640
IFN (pg/ml)	389,0 (322,5 ; 426,7)	406,0 (220,0 ; 480,0)	0,920
TNF (pg/ml)	308,0 (208,0 ; 428,5)	333,0 (284,0 ; 436,0)	0,395
TGF (pg/ml)	382,5 (295,7 ; 486,0)	411,0 (330,0 ; 496,0)	0,405
IL2 (pg/ml)	161,5 (119,0 ; 195,0)	129,0 (108,0 ; 211,0)	0,947

(*) Teste de Mann-Whitney. Resumo descritivo dos valores de citocinas apresentados em medianas e quartis(25 e75).

Pacientes com fibrose leve ou moderada, excluindo pacientes com fibrose grave.

5) Distribuição dos 16 pacientes com HCC com fibrose leve ou moderada, tratados com interferon α e ribavirina, de acordo com a relação entre as citocinas estudadas e o grau de fibrose hepática.

No grupo de 16 pacientes submetidos ao tratamento com interferon α e ribavirina, a mediana para IL-10 nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 24,0pg /ml (var: 10,7pg/ml ;28,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 23,5pg/ml (var: 17,5pg/ml; 33,7 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,550$. (Tabela 3). A mediana para IFN γ nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 318,0pg /ml (var: 279,0pg/ml; 389,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 363,0pg/ml (var: 292,2pg/ml; 553,7,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,416$. (Tabela 3). A mediana para TNF- α nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 387,0pg /ml (var: 333,7pg/ml; 405,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 312,0pg/ml (var: 237,0pg/ml; 407,2 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,448$ (Tabela 3). A mediana para TGF- β nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 473,5pg /ml (var: 386,5pg/ml; 497,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 355,0pg/ml (var: 316,0pg/ml; 526,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,448$. (Tabela 3). A mediana para IL-2 nos pacientes com ausência de fibrose (F0) ou fibrose leve (F1) foi de 118,5pg /ml (var: 108,5pg/ml ; 145,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75), e a mediana para fibrose moderada (F2) foi de 132,5pg/ml (var: 105,5pg/ml; 187,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,625$. (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre graus de fibrose hepática em relação aos níveis séricos das citocinas estudadas, apresentados em mediana, dos 16 pacientes que foram submetidos ao tratamento com interferon α e ribavirina,

<i>Citocina</i>	<i>Sem fibrose ou</i>		<i>p</i> (*)
	<i>Fibrose leve (n=6)</i>	<i>Fibrose Moderada (n=10)</i>	
IL10 (pg/ml)	24,0 (10,7 ; 28,7)	23,5 (17,5 ; 33,7)	0,550
IFN (pg/ml)	318,0 (275,0 ; 389,5)	363,0 (292,2 ; 553,7)	0,416
TNF (pg/ml)	387,0 (333,7; 405,5)	312,0 (316,0 ; 526,5)	0,448
TGF (pg/ml)	473,5 (386,5 ; 497,0)	355,0 (316,0 ; 526,5)	0,448
IL2 (pg/ml)	118,5 (108,5 ; 145,7)	132,5 (105,5 ; 187,5)	0,625

(*) Teste de Mann-Whitney. Resumo descritivo dos valores de citocinas apresentados em medianas e quartis(25 e 75) Pacientes com fibrose leve ou moderada, excluindo pacientes com fibrose grave.

6) Comparação dos níveis séricos da citocinas estudadas entre 38 doentes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina e 17 tratados.

Quando comparados os níveis das citocinas estudadas do grupo dos pacientes não tratados e do grupo de pacientes tratados com interferon α e ribavirina, sem levar em consideração o estágio de fibrose, observou-se que a mediana para IL-10 no grupo não tratado foi de 25,5 pg/ml (var: 18,0pg/ml; 38,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo tratado foi de 21,0 pg/ml (var: 16,0pg/ml ; 29,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,625$. Já para o IFN γ , a mediana correspondeu a 389,0 pg/ml (var: 303,2pg/ml; 433,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75) no grupo não tratado e 349,0pg/ml (var: 279,0pg/ml ;390,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,330$. A mediana do TNF α do grupo não tratado foi de 308,0pg/ml (var: 237,2pg/ml; 423,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e para o grupo tratado foi de 380,0 pg/ml (var: 228,0pg/ml; 403,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,792$. A mediana do TGF β no grupo de pacientes não tratados foi de 394,5 pg/ml (var: 316,7pg/ml; 487,7 pg/ml, entre os percentis 25 e 75), para o grupo tratado a mediana foi de 406,0pg/ml (var: 312,0pg/ml; 495,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,899$. A mediana para IL-2 nos pacientes não submetidos ao tratamento foi de 141,0pg/ml (var: 108,0pg/ml; 198pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e para os pacientes submetidos ao tratamento a mediana foi de 127,0pg/ml (var: 106,0pg/ml; 176,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p= 0,244$. (Tabela 4)

Tabela 4– Comparação dos níveis séricos de citocinas estudadas entre 17 pacientes com HCC tratados e 38 não tratados com interferon α e ribavirina.

<i>Citocina</i>	<i>Grupo não tratado (n = 38)</i>	<i>Grupo Interferon – α (n = 17)</i>	<i>p(*)</i>
IL10 (pg/ml)	25,5 (18,0 ; 38,0)	21,0 (16,0 ; 29,5)	0,254
IFN (pg/ml)	389,0 (303,2 ; 433,7)	349,0 (279,0 ; 390,0)	0,330
TNF (pg/ml)	308,0 (237,2 ; 423,5)	380,0 (228,0 ; 403,0)	0,792
TGF (pg/ml)	394,5 (316,7 ; 487,7)	406,0 (312,0 ; 495,0)	0,899
IL2 (pg/ml)	141,0 (108,0 ; 198,0)	127,0 (106,0 ; 176,5)	0,244

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo me mediana e quartís (25 e 75).

7) Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e os 38 pacientes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina.

No grupo controle, a mediana para IL-10 foi de 10,0 pg/ml (var: 5,0pg/ml; 10,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC não tratados, foi de 25,5pg/ml (var: 18,0pg/ml: 38,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. No grupo controle, a mediana para IFN γ foi de 207,0 pg/ml (var: 151,3pg/ml; 256,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes não tratados, a mediana correspondeu a 389,0pg/ml (var: 303,3pg/ml; 433,8 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Quanto ao TNF α , no grupo controle a mediana correspondeu a 103,0 pg/ml (var: 82,0pg/ml ; 120,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC não tratados, a mediana foi de 308,0pg/ml (var: 237,3pg/ml ; 423,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana para o TGF β no grupo controle foi de 129,0 pg/ml (var: 106,3pg/ml; 180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) enquanto no grupo dos doentes não tratados, foi de 394,5pg/ml (var: 316,8pg/ml ; 487,8 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana para IL-2 no grupo controle foi 109,0 pg/ml (var:91,2pg/ml; 131,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes sem tratamento, foi de 141,pg/ml (var 108,0 pg/ml; 198,0pg/ml) $p < 0,001$. (Tabela 5)

Tabela 5 –Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e 38 doentes com HCC e não tratados com IFN α e ribavirina.

Citocina	n	Controle	n	Doente s/ Interferon - α	p(*)
IL10 (pg/ml)	11	10,0(5,0 ; 10,0)	38	25,5(18,0 ; 38,0)	< 0,001
IFN (pg/ml)	20	207,0(151,3 ; 256,2)	38	389,0(303,3 ; 433,8)	< 0,001
TNF(pg/ml)	20	103,0(82,0 ; 120,0)	38	308,0(237,3 ; 423,5)	< 0,001
TGF(pg/ml)	20	129,0(106,3 ; 180,8)	38	394,5(316,8 ; 487,8)	< 0,001
IL2(pg/ml)	20	109,0(91,25 ; 131,75)	38	141,0(108,0 ; 198,0)	<0,001

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana entre os quartís (25 e 75).

8) Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e os 17 pacientes com HCC tratados com interferon α e ribavirina.

No grupo controle, a mediana dos níveis séricos de IL-10 foi de 10,0pg/ml (var: 5,0pg/ml; 10,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC tratados, foi de 21,0pg/ml (var: 16,0pg/ml ; 29,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. No grupo controle, a mediana para IFN γ foi de 207,0 pg/ml (var:151,3pg/ml; 256,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC tratados, foi de 349,0pg/ml (var: 279,0pg/ml ; 390,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75) $p < 0,001$. Para o TNF α , no grupo controle, a mediana dos valores encontrados correspondeu a 103,0 pg/ml (var:82,0pg/ml; 120,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC tratados, a 380,0pg/ml (var:228,0pg/ml;403,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) $p < 0,001$. A mediana para os valores de TGF β no grupo controle foi de 129,0 pg/ml (var: 106,3pg/ml ;180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC tratados, foi de 406,0pg/ml (var:312,0pg/ml ; 495,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) $p < 0,001$. A mediana dos níveis séricos encontrados para IL-2 no grupo controle foi de 109,0 pg/ml (var: 91,2 pg/ml ;131,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC tratados, de 127,0pg/ml (var: 106,0pg/ml ;176,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75) $p < 0,085$. (Tabela 6)

Tabela 6 – Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre 20 indivíduos do grupo controle e 17 doentes com HCC tratados com interferon α e ribavirina.

<i>Citocina</i>	<i>n</i>	<i>Controle</i>	<i>n</i>	<i>Doente c/ Interferon - α</i>	<i>p</i> (*)
IL10 (pg/ml)	11	10,0(5,0 ; 10,0)	17	21,0(16,0 ; 29,5)	< 0,001
IFN (pg/ml)	20	207,0(151,3 ; 256,2)	17	349,0(279,0 ; 390,0)	< 0,001
TNF(pg/ml)	20	103,0(82,0 ; 120,0)	17	380,0(228,0 ; 403,0)	< 0,001
TGF(pg/ml)	20	129,0(106,3 ; 180,8)	17	406,0(312,0 ; 495,0)	< 0,001
IL2(pg/ml)	20	109,0(91,25 ; 131,75)	17	127,0(106,0 ; 176,5)	< 0,085

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana entre quartís 25 e 75.

9) Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e os 20 pacientes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina e com fibrose ausente (F0) ou leve (F1).

No grupo controle, a mediana para IL-10 foi de 10,0pg/ml (var: 5,0pg/ml; 10,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes não tratados e com F0 ou F1, a mediana correspondeu a 21,5pg/ml (var: 18,8pg/ml ; 36,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. No grupo controle a mediana para IFN γ foi de 207,0 pg/ml (var: 151,3pg/ml; 256,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo com HCC não tratados e com F0 e F1, a mediana correspondeu a 389,0pg/ml (var: 322,5pg/ml ; 426,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Para TNF α , no grupo controle a mediana dos valores encontrados foi de 103,0 pg/ml (var: 82,0pg/ml ; 120,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo dos doentes não tratados e com F0 e F1, a mediana correspondeu a 308,0pg/ml (var: 208,0pg/ml : 428,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana dos níveis séricos de TGF β do grupo controle foi de 129,0 pg/ml (var: 106,3pg/ml; 180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC não tratados e com F0 e F1, a mediana correspondeu a 382,5pg/ml (var: 295,8pg/ml; 486,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana para os valores encontrados de IL-2 no grupo controle foi de 109,0 pg/ml (var: 91,2pg/ml; 131,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo dos doentes com HCC não tratados e com F0 e F1, a mediana correspondeu a 161,5pg/ml (var: 119,0pg/ml ; 195,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. (Tabela 7)

Tabela 07 –Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre 20 indivíduos do grupo controle e vinte doentes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina e sem fibrose (F0), ou com fibrose leve (F1).

<i>Citocina</i>	<i>n</i>	<i>Controle</i>	<i>n</i>	<i>Doente s/ Interferon - α</i>	<i>p(*)</i>
IL10 (pg/ml)	11	10,0(5,0 ; 10,0)	20	21,5(18,8 ; 36,5)	< 0,001
IFN (pg/ml)	20	207,0(151,3 ; 256,5)	20	389,0(322,5 ; 426,8)	< 0,001
TNF (pg/ml)	20	103,0(82,0 ; 120,0)	20	308,0(208,0 ; 428,5)	< 0,001
TGF (pg/ml)	20	129,0(106,3 ; 180,8)	20	382,5(295,8 ; 486,0)	< 0,001
IL2(pg/ml)	20	109,0(91,25 ; 131,75)	20	161,5(119,0 ; 195,0)	<0,001

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana entre quartís 25 e 75).

10) Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e os 15 pacientes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina e com fibrose moderada (F2).

No grupo controle, foi encontrada a mediana para os níveis séricos de IL-10 de 10,0pg/ml (var:5,0pg/ml ; 10,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com F2 não tratados, a mediana correspondeu a 26,0pg/ml (var:18,0pg/ml; 38,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. No grupo controle, a mediana dos níveis séricos de IFN γ foi de 207,0 pg/ml (var:151,3pg/ml ;256,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo com HCC não tratados e com F2, a mediana correspondeu a 406,pg/ml (var: 220,0pg/ml; 480,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Para TNF α , no grupo controle a mediana dos valores encontrados correspondeu a 103,0pg/ml (var: 82,0pg/ml;120,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC não tratados e com F2, a 333,0pg/ml (var:284,0pg/ml; 436,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana dos níveis séricos de TGF β do grupo controle foi de 129,0 pg/ml (var:106,3pg/ml ;180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC, não tratados e com F2 de 411,0pg/ml (var: 330,0pg/ml ;496,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A IL-2 apresentou mediana dos níveis séricos no grupo controle de 109,0 pg/ml (var:106,3pg/ml ; 180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes não tratados e com F2 , essa mediana foi de 129,0pg/ml (var:108,0pg/ml ;211,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. (Tabela 8)

Tabela 08 –Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre 20 indivíduos do grupo controle e 15 doentes com HCC não tratados com interferon α e ribavirina e com fibrose moderada (F2).

<i>Citocina</i>	<i>n</i>	<i>Controle</i>	<i>n</i>	<i>Doente s/ Interferon - α</i>	<i>p</i> (*)
IL10 (pg/ml)	11	10,0(5,0 ; 10,0)	15	26,0(18,0 ; 38,0)	< 0,001
IFN (pg/ml)	20	207,0(151,2 ; 257,0)	15	406,0(220,0 ; 480,0)	< 0,001
TNF (pg/ml)	20	103,0(82,0 ; 120,0)	15	333,0(284,0 ; 436,0)	< 0,001
TGF (pg/ml)	20	129,0(106,2 ; 181,0)	15	411,0(330,0 ; 496,0)	< 0,001
IL2(pg/ml)	20	109,0(91,25 ; 131,75)	20	129,0(108,0 ; 211,0)	<0,012

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana entre os quartís 25 e 75.

11) Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e os seis pacientes com HCC tratados com interferon α e ribavirina e com fibrose ausente (F0) ou leve (F1).

No grupo controle, a mediana para os níveis séricos de IL-10 foi de 10,0pg/ml (var:5,0pg/ml; 10,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC com F0 ou F1 já tratados, foi de 24,0pg/ml (var:10,8pg/ml; 28,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Para IFN γ , no grupo controle a mediana dos valores séricos foi de 207,0 pg/ml (var:151,3pg/ml ; 256,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo com HCC tratado e com F0 ou F1, de 318,0pg/ml (var: 275,0pg/ml; 389,5pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Para TNF α , no grupo controle a mediana dos níveis séricos correspondeu a 103,0 pg/ml (var: 82,0pg/ml ;120,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes tratados e com F0 ou F1, a mediana correspondeu a 387,0pg/ml (var:338,0pg/ml; 405,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana dos valores séricos para o TGF β , no grupo controle, foi de 129,0 pg/ml (var: 106,3pg/ml;180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo dos doentes tratados com F0 ou F1, a mediana correspondeu a 473,5pg/ml (var: 386,5pg/ml; 497,0 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Para a IL-2, no grupo controle a mediana encontrada para os níveis séricos da citocina foi de 109,0 pg/ml (var: 91,2pg/ml;131,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo dos doentes tratados e com F0 ou F1, foi de 118,5pg/ml (var: 108,5pg/ml; 145,7 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,273$. (Tabela 9)

Tabela 09 –Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre 20 indivíduos do grupo controle e seis doentes com HCC, sem fibrose (F0) com fibrose leve (F1), e já tratados com interferon α e ribavirina

<i>Citocina</i>	<i>n</i>	<i>Controle</i>	<i>n</i>	<i>Doente c/ Interferon - α</i>	<i>p</i> (*)
IL10 (pg/ml)	11	10,0(5,0 ; 10,0)	6	24,0(10,8 ; 28,8)	< 0,001
IFN (pg/ml)	20	207,0(151,3 ; 256,5)	6	318,0(275,0 ; 389,5)	< 0,001
TNF (pg/ml)	20	103,0(82,0 ; 120,0)	6	387,0(33,8 ; 405,5)	< 0,001
TGF (pg/ml)	20	129,0(106,3 ; 180,8)	6	473,5(386,5 ; 497,0)	< 0,001
IL2(pg/ml)	20	109,0(91,25 ; 131,75)	6	118,5(108,5 ; 145,7)	<0,273

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana entre os quartís 25 e 75.

12) Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre os 20 indivíduos do grupo controle e os 10 pacientes com HCC tratados com interferon α e ribavirina e com fibrose moderada (F2).

No grupo controle, a mediana para os níveis séricos encontrados para IL-10 foi de 10,0pg/ml (var:5,0pg/ml ;10,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes com HCC e com F2, tratados, de 23,5pg/ml (var:17,5pg/ml; 33,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Quanto ao IFN γ , no grupo controle a mediana dos valores encontrados no soro foi de 207,0 pg/ml (var:151,3pg/ml ;256,2pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo com HCC tratado e com F2, de 363,0,0pg/ml (var: 292,2pg/ml ;553,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. Para TNF α no grupo controle a mediana dos níveis séricos encontrados correspondeu a103,0 pg/ml (var: 82,0pg/ml ;120,0pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo dos tratados e com F2, a 312,0pg/ml (var: 237,0pg/ml ; 407,2 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana dos níveis séricos de TGF β no grupo controle foi de 129,0 pg/ml (var:106,3pg/ml ;180,8pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo dos doentes tratados e com F2, de 355,0pg/ml (var:316,5pg/ml; 526,5 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. A mediana encontrada para os valores séricos de IL-2 no grupo controle foi de 109,0 pg/ml (var:91,5pg/ml ;131,7pg/ml, entre os percentis 25 e 75) e no grupo de doentes tratados, com F2, de 132,5pg/ml (var:105,5pg/ml; 187,7 pg/ml, entre os percentis 25 e 75): $p < 0,001$. (Tabela 10)

Tabela 10 – Comparação dos níveis séricos das citocinas estudadas entre 20 indivíduos do grupo controle e dez doentes com HCC tratados com interferon α e ribavirina e com fibrose (F2).

<i>Citocina</i>	<i>n</i>	<i>Controle</i>	<i>n</i>	<i>Doente c/ Interferon - α</i>	<i>p</i> ^(*)
IL10 (pg/ml)	11,0	10,0(5,0 ; 10,0)	10	23,5(17,5 ; 33,7)	< 0,001
IFN (pg/ml)	20	207,0(151,2 ; 257,0)	10	363,0(292,2 ; 553,7)	< 0,001
TNF (pg/ml)	20	103,0(82,0 ; 120,0)	10	312,0(237,0 ; 407,2)	< 0,001
TGF (pg/ml)	20	129,0(106,2 ; 181,0)	10	355,0(316,0 ; 526,5)	< 0,001
IL2(pg/ml)	20	109,0(91,25 ; 131,75)	6	132,5(105,5 ; 187,7)	<0,055

(*) Mann-Whitney para amostras independentes. Resumo descritivo em mediana entre os quartís 25 e 75.

Discussão

A maioria dos portadores do VHC são assintomáticos, apesar de a doença crônica ocorrer em mais de 85% das pessoas infectadas. Conseqüentemente, é freqüente que a hepatite C seja diagnosticada em estágios mais avançados da doença ou, como ocorre com grande número de portadores, em indivíduos assintomáticos, descobertos quando realizam doação de sangue.

Os pacientes estudados nesta pesquisa, atendidos no ambulatório de Hepatites Virais, da Área de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram encaminhados do Hemocentro da Faculdade e, como tal, eram, na sua grande maioria, assintomáticos. Os casos com doença hepática descompensada, isto é, com diagnóstico tardio, geralmente são encaminhados para outro Ambulatório, da mesma Faculdade. Este, certamente, foi uma dos motivos de se ter encontrado tão poucos casos com fibrose avançada nesta casuística.

Entre os 55 pacientes com hepatite crônica pelo VHC de nosso estudo, predominou o sexo masculino, na faixa etária do adulto jovem. Isso ocorreu em virtude de esses pacientes terem sido triados, na sua maioria, entre os doadores de sangue do Hemocentro que, em geral, são do sexo masculino, na faixa etária do adulto jovem. Os fatores mais associados com a infecção que encontramos em nosso estudo foram uso de drogas injetáveis e transfusão de sangue antes de 1990. Assim, dos 55 pacientes estudados, 20 (36,4%) eram usuários de drogas e 23 (41,8%) sofreram transfusão de sangue.

O estudo NHANES (Nacional Health and Nutrition Examination Survey), que avaliou aproximadamente 40.000 americanos não institucionalizados no período de 1988 a 1994 ⁽⁶¹⁾, associou um aumento da prevalência de infecção pelo VHC em indivíduos com história de uso de drogas ilícitas, e esta prevalência aumentava com a freqüência do uso destas drogas. Também houve prevalência aumentada em indivíduos com início precoce da atividade sexual, número grande de parceiros e infecção pelo vírus herpes tipo 2. Nesse mesmo estudo, foram encontrados taxas maiores de infecção em indivíduos afro-americanos(86%), comparados aos caucasianos (68%). No presente estudo, tais resultados foram discordantes, pois pacientes com cor da pele branca predominaram em relação aos demais (80%). Um fator que pode explicar essa diferença é a grande miscigenação de etnias que deu origem à população brasileira. No Brasil, fica

difícil definir a etnia pela cor da pele, pois, um indivíduo considerado branco pode, na verdade, ser um produto da miscigenação do europeu com o negro e o índio.

Os vírus VHB e VHC são transmitidos por vias comuns, o que facilita a coinfeção, principalmente em áreas endêmicas e entre pessoas com risco aumentado de adquirir infecções parenterais. No presente estudo, encontramos 36,4% de pacientes que podem ter sido infectados pelo VHC por uso de drogas endovenosas. Torbenson et al⁽¹¹⁾ avaliaram, em Baltimore, uma população de 188 usuários de drogas injetáveis com VHC, encontrando 96% desses indivíduos também com presença de anti-HBc, indicando infecção prévia pelo VHB. No nosso estudo, provavelmente por não ter pesquisado apenas usuários de drogas, encontramos apenas nove pacientes com infecção prévia pelo vírus B. Por outro lado, no estudo realizado por Cacciola et al⁽²⁴⁾, que excluíram pacientes usuários de drogas endovenosas, na Itália, um terço dos pacientes, isto é, 66 indivíduos com HCC tinham DNA-VHB detectável, sem a presença do AgHBs, sendo que 46 apresentavam anti-HBc positivo e 20 não apresentavam nenhum marcador para VHB, caracterizando a presença de VHB oculto.

No nosso estudo não encontramos paciente algum com VHB oculto, mesmo utilizando método cujo limite de detecção de DNA-VHB é de menos que 100 cópias/ml. Resultados bem diferentes foram encontrados por Pereira et al.⁽⁶²⁾, que realizaram um estudo em Campinas, envolvendo 100 pacientes com resultado sorológico negativo para anti-VHC e pesquisa de anti-HBc positiva e 50 indivíduos portadores de VHC e pesquisa de anti-HBc com resultado positivo. Esses autores observaram a infecção oculta pelo VHB, detectando o DNA de VHB pela técnica de PCR, em 24% dos pacientes com hepatite C, percentual quatro vezes mais alto do que o encontrado no grupo dos não infectados pelo VHC (6%). Essa diferença entre o estudo de Pereira et al.⁽⁶²⁾ e o nosso pode ser atribuída ao menor número de pacientes com infecção prévia pelo VHB entre os 55 pacientes deste estudo, pois, apenas nove apresentavam pesquisa do anti-HBc positiva, e quatro desses tinham presença de anti-HBs. Entre os pacientes sem infecção prévia pelo VHB neste estudo, 18 tinham presença de anti-HBs, resultado de vacinação. No estudo de Pererira et al⁽⁶²⁾, também se avaliou o resultado da vacinação dos pacientes com DNA-VHB detectável. Entre os doentes vacinados, desenvolveram anti-HBs todos aqueles sem infecção pelo VHC e que tinham DNA do VHB detectável pela PCR, sendo que o DNA do vírus não mais foi demonstrado. Nos infectados pelo VHC e com DNA do VHB detectável pela PCR, o anti-HBs foi desenvolvido por 90% dos vacinados, em 89,4% não mais se detectou o

DNA do VHB pela PCR. Os resultados do estudo sugerem que a vacinação pode eliminar a infecção oculta pelo VHB e este pode ser outro motivo para não se ter encontrado o VHB oculto nos pacientes de nossa pesquisa.

Relato pelos diversos autores da presença de infecção VHB oculta em pacientes com HCC é variável. Estudo grego, com 187 pacientes com VHC presente e AgHBs ausente, encontrou 25% desses pacientes com DNA-VHB detectável por técnicas de PCR.⁽⁶³⁾ O estudo avaliou também pacientes com doença hepática de causa não viral, tendo encontrado presença de infecção VHB oculta em 6% deles; no grupo controle, constituído por pacientes saudáveis, os autores não encontraram o VHB oculto. Vale ressaltar que a região da Grécia central, palco do estudo acima, apresenta prevalência intermediária para a infecção pelo VHB, semelhante ao que ocorre na região sudeste do Brasil, onde foi realizada a presente pesquisa. Pontisso et al.⁽³²⁾, na Itália, não conseguiram, assim como ocorreu em nesse estudo, detectar DNA-VHB sérico e em tecido hepático em 20 pacientes VHC positivo e AgHBs ausente. Koike et al.⁽⁶⁴⁾ encontraram DNA-VHB detectável em mais de 90% de japoneses infectados pelo VHC, em região asiática com prevalência elevada para o VHB. Essas diferenças podem ser atribuídas à sensibilidade do método aplicado, ao número de pacientes de cada estudo, e às diferenças geográficas de prevalência da infecção pelo VHB.

Pacientes com ambas as infecções podem apresentar doença hepática mais grave e aumento do risco de evolução para cirrose e hepatocarcinoma⁽¹⁾. Estudo de Fong et al.⁽⁴¹⁾ encontrou maiores taxas de cirrose (44% versus 21%) e doença hepática descompensada (24% versus 6%) em pacientes co-infectados, quando comparados aos pacientes com infecção apenas pelo VHC. Na Arábia Saudita, foram encontrados resultados semelhantes, isto é, quando foram comparados indivíduos com infecção por VHC e VHB com os infectados apenas pelo VHB, os piores parâmetros foram encontrados nos primeiros: maior incidência de doença hepática descompensada com maiores taxas de cirrose (95% versus 48,5%) e maior frequência de Classificação de Child-Pugh classe C (37% versus 0%)⁽⁴²⁾. Cacciola et al.⁽²⁴⁾ demonstraram que, quando a co-infecção é com VHB oculto, em que a carga viral VHB-DNA é baixa, há aumento significativo na frequência de cirrose nos pacientes com VHC crônica, a cirrose foi diagnosticada em 33% dos pacientes com HCC e VHB oculto e em 19% dos pacientes com HCC sem a presença do vírus oculto. Como a cirrose é um importante fator de risco para desenvolvimento de hepatocarcinoma, esses autores concluíram que a presença do VHB representaria um risco maior, pela propriedade oncogênica direta do

vírus. Outros estudos, contudo, como o de Georgiadou et al ⁽⁶³⁾, não encontraram relação entre a presença do VHB oculto em pacientes com HCC crônica com o grau de alterações histológicas hepáticas. Esses autores justificam os resultados pelo curto período de seguimento dos pacientes. Outro estudo, realizado em Campinas⁽²⁷⁾, Brasil, encontrou cirrose hepática em 20% dos pacientes HCC com DNA do VHB detectável pela PCR e em 12 % sem DNA do vírus detectável, no entanto, a diferença não foi significativa entre os grupos. Neste mesmo estudo também não se observou diferença da resposta ao tratamento da HCC, em indivíduos com e sem DNA do VHB detectável pela PCR. Cacciola et al ⁽²⁴⁾ detectaram resposta virológica em pacientes HCC e VHB oculto em 215 dos pacientes e em 42% dos pacientes com HCC sem VHB oculta.

Talvez, aqui, resida outra razão para não se ter encontrado o VHB oculto em nosso estudo. Nossos pacientes não procuravam o ambulatório por doença hepática, mas, sim, eram encaminhados do banco de sangue, quando detectados por triagem sorológica aplicada aos candidatos a doador.

Quando avaliamos a fibrose pela histopatologia hepática de nossos pacientes, notamos que predominaram aqueles com fibrose leve ou ausência de fibrose (47,2%). Mais uma vez, é válido ressaltar que estes indivíduos foram predominantemente encaminhados pelo hemocentro, e portanto, apresentavam-se assintomáticos. A evolução para cirrose pode acontecer após aproximadamente 20 anos de infecção pelo VHC, podendo acelerar esse processo idade mais avançada quando da aquisição da infecção, gênero masculino e uso abusivo de álcool ou presença de doenças imunossupressoras como a Aids⁽⁶⁵⁾. Fatores relacionados com o vírus, como genótipo do tipo 1 e carga viral elevada também se correlacionam com estágios de fibrose mais avançados . Ryder et al. ⁽⁶⁶⁾ propõem que fibrose promoveria mais fibrose, mas também há a hipótese de a inflamação ser a chave para a fibrogênese. Nesse sentido, citocinas, moléculas pró-inflamatórias e superóxidos são fatores que induziriam a atração de células inflamatórias que, juntamente com o dano celular que ocasionam, seriam responsáveis pela fibrose . Aguilera e Berenguer ⁽³⁹⁾ apresentam vários fatores envolvidos na fibrogênese hepática, dentre eles: citocinas, receptores da matriz extracelular, moléculas de adesão, endotelina, metaloproteínas, inibidores das metaloproteínas, fatores de crescimento.

Em nosso estudo, as citocinas analisadas, tanto as que expressam resposta predominantemente celular - $INF\gamma$ e IL2, quanto aquelas que expressam resposta humoral - IL-10 e TGF β , além da pró-inflamatória TNF α , não discriminaram

o grau de fibrose nos indivíduos com HCC. Isso ocorreu quando a fibrose foi estudada separando-se os pacientes que foram submetidos ao tratamento com interferon α e ribavirina daqueles não tratados, também, esse foi o comportamento das citocinas dosadas no grupo estudado antes do tratamento em relação àquele estudado após ser submetido ao interferon α e ribavirina.

Alguns estudos revelam que indivíduos com cirrose têm níveis de TNF α bem aumentados, quando comparados com indivíduos com ausência de fibrose ou fibrose leve, como o estudo de Crespo et al⁽⁶⁷⁾. Como em nosso estudo havia apenas um paciente com cirrose, não pudemos confirmar esse dado.

Entre os fatores indutores de fibrose, o TGF β é bem caracterizado como uma citocina pró-fibrinogênica, pois leva ao aumento da produção de proteínas da matriz extracelular e inibe enzimas proteolíticas de degradação da matriz. Alguns estudos demonstram que os níveis de TGF β se encontram aumentados em pacientes com hepatite C, como o de Marek et al⁽⁶⁸⁾, que também avaliaram o efeito da terapia antiviral sobre os níveis de TGF β . Assim, no grupo de 34 pacientes que responderam ao tratamento, os níveis de TGF β diminuíram após a terapia, no entanto, nos 26 que não responderam, os níveis de TGF β não caíram. Em outro estudo realizado por Cacciarelli⁽⁶⁹⁾, também avaliando citocinas e tratamento, demonstrou-se que a IL-4 e IL-10 diminuíram significativamente durante o tratamento, concomitantemente com a queda da carga viral do VHC. Ao contrário, a IL-2 apresentou queda transitória na décima segunda semana de tratamento e houve também uma discreta queda nos níveis de IFN γ . Apesar de em nosso estudo não termos podido propriamente avaliar a resposta ao tratamento, pois o grupo não tratado não era composto pelos mesmos indivíduos que o tratado, essas citocinas se apresentavam igualmente aumentada, tanto nos pacientes tratados, quanto naqueles ainda não submetidos ao tratamento, em relação ao grupo controle.

Bertoletti et al⁽⁷⁰⁾ mostraram que a maioria das células T que infiltram o fígado na HCC apresenta perfil Th1. Assim, segundo os autores, a IL-2 e o γ IFN relacionam-se com piora da lesão hepática e também com resposta pobre ao tratamento. O γ IFN é um ativador das células endoteliais e potencializa os efeitos do TNF α , como por exemplo, a adesão e extravasamento de linfócitos para os sítios de infecção, além disso, estimula a ativação de células T CD4+. Baroni et al⁽⁷¹⁾ também descreveram a associação de γ IFN com piora da lesão hepática e processo de ativação viral, observando lesão hepática mais grave na presença de resposta do padrão Th1. Em

nosso estudo, não conseguimos relacionar os níveis de citocinas com o gravidade do padrão histopatológico, talvez porque, em nossa casuística, tenham predominado os indivíduos com alterações histológicas hepáticas leves. Um estudo conduzido por Neuman et al ⁽⁷²⁾ avaliaram 56 pacientes com biópsia inicial com fibrose leve ou ausência de fibrose e atividade inflamatória leve, nos quais foram determinadas as citocinas TGF- β e TNF- α no início do estudo e após três anos de seguimento. Esses resultados foram comparados com os de 103 indivíduos com HCC com atividade inflamatória moderada. Houve diferença significativa entre o grau de atividade inflamatória do grupo controle e o grupo estudado e paralelamente entre os níveis de TNF- α dos respectivos grupos. No grupo controle, com atividade inflamatória e fibrose moderadas, os níveis de TNF- α estiveram significativamente aumentado em relação ao grupo estudado, mas não discriminou fibrose grau 1 e 0 com a mesma atividade inflamatória. Independentemente da atividade inflamatória o TGF- β correlacionou-se com o grau de fibrose. Durante os três anos de investigação, muitos pacientes apresentaram aumento do grau de fibrose hepática, paralelamente ao aumento dos níveis de TGF- β . Os autores correlacionaram a atividade inflamatória com TNF- α e a progressão da fibrose com aumento dos níveis de TGF- β .

As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e o IFN γ , responsáveis pela ativação imune e pela lesão hepatocelular, sofrem inibição de outras citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e a IL-10. A IL-10 apresenta atividade antifibrótica, levando à diminuição da expressão de colágeno tipo I e aumento da colagenase intersticial. No presente estudo, essa citocina esteve aumentada em relação ao grupo controle e, no entanto, não discriminou a intensidade da fibrose hepática⁽⁷²⁾. Neuman et al ⁽⁷³⁾ obtiveram resultados semelhantes, não encontrando relação entre os níveis de IL-10 e as alterações histopatológicas. No estudo desses autores, os níveis de IL-10 não se mostraram diferentes em relação ao tipo de tratamento a que esses pacientes foram submetidos, mas ficou demonstrado que, nos indivíduos que obtiveram resposta virológica sustentada, houve queda dos níveis de IL-10 ao término do tratamento com interferon α e ribavirina .

Em nosso estudo, a comparação entre os níveis das citocinas IL-10, γ INF, TNF α , TGF β e IL2 do grupo controle, constituído por 20 indivíduos e do grupo com HCC não tratado com interferon α e ribavirina, constituído por 38 doentes, notamos que todas as citocinas desses pacientes encontravam-se com valores significativamente elevados em relação ao grupo controle. O mesmo ocorreu quando comparamos o grupo

controle com o grupo de pacientes submetidos ao tratamento com interferon α e ribavirina, constituído por 17 pacientes. Cacciarelli et al ⁽⁶⁹⁾ também encontraram níveis aumentados de IL-2, γ IFn, IL-10 e IL-4 em pacientes com HCC em relação a indivíduos sem HCC. Em outro estudo, realizado por Gramenzi ⁽⁷⁴⁾, não foi encontrada diferença entre as citocinas do padrão Th1, IL-2 e IFN γ , dosadas em pacientes com VHC em relação aos indivíduos sadios.

No presente estudo, mesmo quando levamos em consideração apenas indivíduos com HCC não tratados, e que apresentavam na biópsia hepática ausência de fibrose e fibrose leve, as citocinas estudadas mantinham-se significativamente elevadas em relação ao grupo controle. Esses resultados se mantiveram quando comparamos pacientes com HCC crônica e fibrose moderada sem tratamento prévio.

Nos pacientes com HCC que já haviam completado tratamento com interferon α e ribavirina há pelo menos seis meses desde a coleta das citocinas, essas também se mantinham significativamente elevadas em relação ao grupo controle, tanto nos pacientes com ausência de fibrose ou com fibrose leve, quanto em pacientes com fibrose moderada.

Em nosso estudo, não foram encontrados pacientes com VHB oculto, talvez pelo número pequeno de pacientes avaliados, ou pela maioria dos pacientes não apresentarem infecção prévia pelo VHB, ou mesmo por já terem sido submetidos à vacinação para hepatite B. Quanto às citocinas, todos os pacientes, independente do grau de fibrose ou da presença ou não do tratamento com interferon e ribavirina, apresentaram níveis aumentados em relação aos controles normais. Não se observaram diferenças entre os níveis de citocinas apresentados pelos doentes com diferentes graus de fibrose hepática, nem entre os níveis apresentados antes e depois do tratamento. Estudos futuros, com casuística maior e com doentes com HCC com graus de fibrose mais intensos talvez permitam associar citocinas pró e antiinflamatórias com lesão hepática.

Conclusões

Este estudo pode nos levar a conclusão que a hepatite B oculta não foi encontrada, primeiramente pelo número pequeno de pacientes avaliados, pela maioria dos pacientes avaliados não terem sido expostos previamente ao VHB, apenas nove apresentavam anti-HBc positivo, e pela realização da vacina para hepatite B, que pode ter eliminado o vírus da hepatite B oculta.

O simples estado de portador do VHC já determina imunomodulação importante, pois mesmo os doentes sem fibrose apresentavam citocinas pró e antiinflamatórias significativamente mais elevadas do que os indivíduos do grupo controle. Além disso, não houve diferença dos níveis dessas citocinas entre os diferentes graus de fibrose.

Referências

- 1) Crockett SD, Keeffe EB. Natural history and treatment of hepatitis B virus and hepatitis C virus coinfection. *Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2005;4;13.
- 2) CDC.- Centers of Disease Control - Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminanting transmission in the United States through universal childhood vaccination (ACIP) Management. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1991; 40: (nºRR-13) 1-25.
- 3) Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N engl J Med*. 2001;345:41-52.
- 4) Khouri ME, Santos VA. Hepatitis B: epidemiological, immunological and serological considerations emphasizing mutation. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*. 2004;59(4):216-224.
- 5) Ministério da Saúde – Programa Nacional Para Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. Disponível no endereço: <http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/hepatite.htm>.
- 6) Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of hepatitis B vírus infection. 2005;2(1):50-57.
- 7) Toukan A. Strategy for the control of hepatitis B virus infection in the Middle East and North Afica. *Vaccine*.1990;8:117-121.
- 8) Alter M. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*. 2003;39:64.
- 9) Who- World Health Organization. Hepatites C. Estimated prevalence and number infected by WHO region. Disponível no endereço: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/>.
- 10) Focaccia R, Conceição, OJG, Sette JH, Sabino C, Bassit L, Nitrini DR, Lomar, AV, Lorenço R et al. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 1998, 2, 6. 269-284.
- 11) Torbenson M, Kannangai R, Astemborski J, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. High prevalence of occult hepatitis B in Baltimore injection drug users. *Hepatology*. 2004.39: 51-57.

- 12) Silva L.C., *Hepatites Agudas e Crônicas*. 3^o Ed, São Paulo, Ed Sarvier, 2003.
- 13) Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection- natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 2004;350:1118-29.
- 14) Lioriot MA, Marcellin P, Walker F et al. Persistence of hepatitis B virus DNA in serum and liver from patients with chronic hepatitis B after loss of HBsAg. *J Hepatol*. 1997;27:251-8.
- 15) Hu, KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat*. 2002;9:243-57.
- 16) Grob P, Jilg W, Bornhak H., Gerlich W, et al. Serological pattern anti-HBc alone report on workshop. *Journal of Med Virol*. 2000;62:450-5.
- 17) Luo KX, Zhou R, He C, Liang S. Virus DNA in sera of carries positive exclusively for antibodies to the hepatitis B core antigen. *J Med Virol*. 1991; 35: 55-59.
- 18) Shih LN, Sheu JC, Wang JT, Yang PM., Lee HS et al. Serum hepatitis B virus DNA in healthy HBsAg-negative Chinese adults evaluated by polymerase chain reaction. *J Med Virol* .32:257-260,
- 19) Kroes ACM, Quint WG, Heijtkink RA. Significance of isolated hepatitis B core antibodies detected by enzyme immunoassay in a high risk population. *J Med Virol*. 1991;35: 96-100.
- 20) Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LMMB, Castelo A. The biological meaning of the anti-HBc positive in blood donors: relation to VHB-DNA and to other serological markers. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2003; 45 (3): 137-140.
- 21) Strauss E. Marcadores de hepatites virais em doadores de sangue: o dilema da escassez versus possibilidade de contaminação. *GED*. 1995;14: 72-76.
- 22) Gonçalves Jr FL, Pedro R.J, Silva LJ, et al. Hepatites pós-transfusionais na cidade de Campinas-SP-Brasil. Incidência, agentes etiológicos e aspectos clínicos-epidemiológicos da hepatite por vírus C. *Rev Inst Méd Trop* .1993; 35:53-62..
- 23) Leite N C, Nogueira C M., Coelho HSM, et al. Prevalência do anticorpo contra hepatite C (anti-VHC) em doadores de sangue no Rio de Janeiro, Brasil. Sua relação com ALT e anti-HBc. *Arq Gastroenterol*. 1992; 29:5-11.
- 24) Cacciola I, Pollicinina T, Squachito G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med*. 1999; 34:22-26. 32).
- 25) Penna A, Artini M, Cavalli A, Lebrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest*. 1996; 98(5): 1185-94.

- 26) Mimms LT, Mosley JW, Hollinger FB, Aach RD, Stevens CE, et al. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *Bmj*. 1993;307:1095-7.
- 27) Silva C, Gonçalves NSL, Pereira JSF, Escanhoela CAF, Pavan MHP, Junior FLG. The influence of occult infection with hepatitis B virus on liver histology and response to interferon treatment in chronic hepatitis c patients. *The Brazilian J Infections Disease*. 2004;8(6):431-9.
- 28)Crockett SD. Treatment of Hepatitis B and C Coinfection. 2004,<http://clinicaloptions.com/hepatitis>.
- 29) Sheen Is, Liaw YF, Lin DY, Chu CM. Role of hepatitis C and delta viruses in the termination of chronic hepatitis B surface antigen carrier state: a multivariate analysis in a longitudinal follow-up study. *J Infect Dis*. 1994;170:358-61.
- 30) Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YH. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7cells. *J Virol*. 1993;67:5823-32.
- 31) Schuttler CG, Fiedler N, Schimdt K, Repp R, Gerlich WH, Schaefer S. Suppression of hepatitis B virus enhancer 1 and 2 by hepatitis C virus core protein. *J hepatol*.2002;37:855-62.
- 32) Pontisso P, Gerotto M, Benvegna L, Chemello L, Alberti A: Coinfection by hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Antivir Ther*. 1998;3:137-142.
- 33) Liaw YF. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology*. 1995;22:1101-8.
- 34) Liaw YF. Hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterology*. 2002;37(13):65-8.
- 35) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M. Histopathology improvement of fibrosis in patient with hepatitis C who have sustained response to Interferon therapy. *An Int Med*. 2000; 132;517-24.
- 36) Goodman ZD, Ishak KG. Histopathology of hepatitis C virus infection. *Seminars in Liver Disease*. 1995; 15:70-81.
- 37) Poynard T, Bedosa P, Opolon P. for the OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. Natural history of liver progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet* 1997; 348;825-632.

- 38) Poynard T, Ratziv V, Charlotte F, Goodman Z, Mchutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* .2001; 34:730-9.
- 39) Aguilera V, Berenguer M. Hepatitis C and fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* (Madrid).2004;96(6). 402-414.
- 40) Laggin FM, Westin J, Svensson E, et al. Progression of fibrosis in untreated patients with hepatitis C virus infection. *Liver*. 2002;22:136-144.
- 41) Fong TL, Di Bisceglie AM, Waggoner JG, Banks SM, Hoofnagle JH. The significance of antibody to hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*.1991;14:64-7.
- 42) Mohamed Ael S, al Karawi MA, Mesa GA. Dual infection with hepatitis C and B viruses: clinical and histological study in Saudi patients. *Hepatogastroenterology*.1997;44:1404-6.
- 43) Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Occult hepatitis B virus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *J Clin Microbiol*.2002;40: 4068-1071.
- 44) Rehermann B. Immunopathogenesis of acute hepatitis B and hepatitis C, 2004; <http://clinicaloptions.com/hepatitis>.
- 45) Fan XG, Liu WE, Li CZ, et al. Circulating Th1 and TH2 cytokines in patients with hepatitis virus infection. *Mediator Inflamm*. 1998; 7:2957.
- 46) Abbas AK, Lichtman AH. Cytokines. In: Abbas A K; Lichtman A. H. *Cytokines cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Saunders.2003. 243-274.
- 47) Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1999; 19:157-169.
- 48) Ferrari C, Urbani S, Penna A, et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* .1999;31 (suppl 1);31-38.
- 49) Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* .1995;21:570-583.
- 50) Rockey DC. Hepatic fibrinogenesis and hepatitis C. *Semin Gastrointes Dis*. 2000; 11:69-83.
- 51) Kehrl JH, Wakefield LM, et al. Production of transforming growth factor-beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med*.1986: 163:1037-1050.
- 52) Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: Problems and prospects. *Cell Regul*.1990; 1:875-82.

- 53) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* .1986; 83: 4167-4171.
- 54) Igotz RA, Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- beta action. *Cell*. 1987;51: 189-197.
- 55) Poynard T, Marcellin P, Lee SS et al. Randomised trial of infection alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus infection alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet*.1998;352:1426-32.
- 56) McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 1998;339:1485-92.
- 57) Heathcote EJ, Shiffman ML, Cooksley WGE, Dusheiko GM, Lee SS, Balart L, et al. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrosis. *N Engl J Med*. 2000.343(23) , 1673-80.
- 58) Arif A, Levine RA, Sanderson SO, Bank L, Velu RP, Shah A, Mahl TC, Gregory DH. Regression of fibrosis in chronic hepatitis C after therapy with Interferon and ribavirin. *Digestive Diseases and Sciences*. 2003;48(7), 1425-30.
- 59) Zignego AL, Fontana R, Pulti S. et al. Relevance of inapparent coinfection by hepatitis B virus in interferon treated patients with hepatitis C virus chronic infection. *J Med Virol*. 1997: 51:313-8.
- 60) Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M et al. Serologically silent hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *J Med Virol*. 1999;58:201-7.
- 61) Alter MJ et al. The prevalence of Hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*.1999;341(8), 556-62.
- 62) Pereira JSF, Gonçalves Jr FL, Gonçalves NSL, SilvaC, Lazarini MSK, Pavan MHP, Fais VC. HBv vaccination of HCV- infected patients with occult HBV infection and anti HBc- positive blood donors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39;525-31.

- 63) Georgiadou SP, Zachou K, Rigopoulo E, Liaskos C, Mina P, Gerovasilis F, Makri E, Dalekos. Occult hepatitis B virus infection in Greek patients with chronic hepatitis C and in patients with diverse nonviral hepatic diseases. *N. journal of viral Hepatitis*. 2004;11:358-365.
- 64) Koike K, Kobayashi M, Gondo M, Hayashi I, et al.. Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus infected chronic hepatitis patients. *J Med Virol*. 1998;54:249-255.
- 65) Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis*. 2001;14. 279-287.
- 66) Ryder SD. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat biopsy study. *Gut*. 2004;53. 451-5.
- 67) Crespo J, Montserrat R, Fabrega E, Cayon A, Amado JA, Garcia-Unzeta MT, et al. Plasma leptin and TNF α levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis. *Dig Dis Sci*. 2002;47. 1604-10.
- 68) Marek B, Kajdaniuk D, Mazurek U, Janczewska-Kazek E, Kos-Kudla B, Strzalla B, Fila A, Niedziolka D, et al. TGF β 1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF β 1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy. *Journal of Clinical Pharmacy and therapeutics*. 2005: 30. 271-277.
- 69) Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: Pre and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology*. 1996;24:6-9.
- 70) Bertoletti A, D'Elios MM, Boni C. Different cytokine profiles in intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and C virus infection. *Gastroenterology* 1997;112:17-25.
- 71) Baroni GS, Pastorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L, Solforosi L. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1 like response in chronic hepatitis C. *Liver*. 1999;19:212-9.
- 72) Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology*. 2005: 32. 75-85.
- 73) Neuman MG, Benhamou JP, Shear NH, Boyer N, Marcellin P. Serum IL-10 in chronic Hepatitis C. *J Hepatology*. 2000;2:175-9.

74) Graminzi A, Andreone P, Loggi E, Foschi FG, Cursaro C et al. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. *Journal of Viral hepatitis*.2005;12:525-30.

Anexos

Relação Dos Pacientes do Trabalho

Número	Inicias	RG	Vacina	Já realizou Tratamento	Estadiamento de Fibrose
1	VMS	518421			1
2	RCFO	276280			1
3	ASS	420557			2
4	LCR	23058	X		2
5	ADB	158343	X		2
6	JJ	194105			2
7	TBM	518140			2
8	IKN	52375			2
9	JHPO	519314	X		4
10	RMD	486539	X		1
11	JAA	453426			2
12	CRB	480855			2
13	VAC	100701			2
14	JRS	466884			0
15	DR	91302			1
16	MPSF	352655			2
17	MO	73336	X		1
18	ADM	424542	X	X	2
19	CM	321815		X	2
20	DA	306076		X	2
21	JCOP	56241		X	3
22	JFM	314040		X	2
23	PDO	284066	X		1
24	PVA	165229		X	2
25	LH	481726	X	X	2
26	ACS	232766	X		2
27	CFM	478484		X	0
28	FMS	482661		X	2
29	SMSS	490812			2
30	JJS	502003			3
31	CCA	485726			2
32	EBL	493717		X	1
33	MNLP	386149		X	1
34	MRA	398180	X		1
35	MLS	487735			0
36	FRO	95140			1
37	AFR	407122	X		1
38	OO	86352			1
39	HDS	496123	X	X	1
40	GGA	416742		X	1
41	RCL	195209	X	X	1
42	LGB	90348			3
43	AC	529265			1
44	ASM	490105	X		1
45	SO	124377			1
46	AAC	258124			2
47	JCZ	477521			1
48	SCD	389725	X		1
49	CFF	315267	X	X	2
50	BVAB	1626	X	X	2
51	JRO	194875		X	2
52	MP	149314	X		0
53	TRS	167313			1
54	DDL	292088			1
55	JGR	267950			2

Pacientes Pré tratamento

número	iniciais	RG	vacina	fibrose	IL-10	IFN	TNF α	TGF-Beta	IL-2
1	VMS	518421		1	30	340	440	520	98
2	RCFO	276280		1	18	720	320	388	240
3	ASS	420557		2	42	220	510	487	104
4	LCR	23058	X	2	26	417	246	304	212
5	ADB	158343	X	2	32	116	284	380	99
6	JJ	194105		2	40	820	481	563	241
7	TBM	518140		2	27	320	304	361	128
8	IKN	52375		2	18	187	436	506	127
9	JHPO	519314	X	4	32	518	281	384	184
10	RMD	486539	X	1	21	210	187	321	204
11	JAA	453426		2	18	326	301	416	108
12	CRB	480855		2	26	217	407	496	189
13	VAC	100701		2	18	431	199	231	129
14	JRS	466884		0	24	211	121	210	94
15	DR	91302		1	21	330	207	294	162
16	MPSF	352655		2	29	581	647	580	211
17	MO	73336	X	1	11	411	320	301	102
23	PDO	284066	X	1	17	404	301	401	196
26	ACS	232766	X	2	26	480	364	451	129
29	SMSS	490812		2	38	621	417	404	280
30	JJS	502003		3	18	331	284	363	107
31	CCA	485726		2	11	416	333	411	120
34	MRA	398180	X	1	22	389	421	542	118
35	MLS	487735		0	44	401	462	571	190
36	FRO	95140			21	342	186	244	150
37	AFR	407122	X	1	16	223	172	261	99
38	OO	86352		1	47	442	502	473	122
42	LGB	90348		3	62	304	410	476	84
43	AC	529265			38	621	431	490	192
44	ASM	490105	X	1	25	320	211	340	238
45	SO	124377		1	38	517	310	441	186
46	AAC	258124		2	42	406	292	330	204
47	JCZ	477521		1	10	428	306	377	132
48	SCD	389725	X	1	21	340	280	321	161
52	MP	149314	X	0	21	301	211	286	122
53	TRS	167313		1	32	423	506	474	208
54	DDL	292088			43	389	411	492	192
55	JGR	267950		2	16	231	206	292	108

média	27,39474	386,9474	334,3947	399,5263	157,1053
mediana	25,5	389	308	394,5	141
desvio pad	9,899495	77,07464	165,463	161,2203	7,071068

Pacientes Pós tratamento

Número	Inicias	RG	Vacina	Estadiamento de Fibrose	IL-10	IFN	TNF α	TGF-Beta	IL-2
18	ADM	424542	X	2	36	321	284	349	122
19	CM	321815		2	28	638	340	406	286
20	DA	306076		2	41	377	417	617	181
21	JCOP	56241		3	16	210	187	233	84
22	JFM	314040		2	11	349	210	304	108
24	PVA	165229		2	20	381	282	331	133
25	LH	481726	X	2	18	281	186	210	91
27	CFM	478484		0	31	391	381	484	184
28	FMS	482661		2	19	586	246	320	207
32	EBL	493717		1	28	287	416	536	127
33	MNLP	386149		1	11	349	388	466	110
39	HDS	496123	X	1	10	389	402	481	133
40	GGA	416742		1	27	269	386	422	110
41	RCL	195209	X	1	21	277	192	280	104
49	CFE	315267	X	2	16	180	506	588	98
50	BVAB	1626	X	2	27	543	380	506	132
51	JRO	194875		2	33	296	404	361	172

media	23,11765	360,2353	329,8235	405,5294	140,1176
mediana	21	349	380	406	127
desvio pad	9,177979	125,4689	98,23647	120,682	51,55202

Resultados- citocinas- Grupo Controle

TNF	IFN	IL-10	IL-2
1-66	108	4	104
2-117	174	10	59
3-86	118	10	164
4-109	211	12	83
5-96	244	19	156
6-78	161	0	112
7-131	284	0	71
8-121	142	6	98
9-108	204	0	142
10-76	226	5	108
11-93	290	5	121
12-85	268	0	110
13-110	179	0	89
14-81	210	10	113
15-116	246	5	143
16-127	260	0	98
17-80	124	0	125
18-128	181	10	79
19-98	148	0	108
20-135	261		