

Mariana Sartori Magnoni

Perfil imunofenotípico e nível de citocinas plasmáticas em portadores de hepatite C crônica com diferentes graus de comprometimento hepático.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Pesquisa e Desenvolvimento –
Biotecnologia Médica – Faculdade
de Medicina de Botucatu – Unesp,
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Márjorie de Assis Golim

Co-orientador: Prof. Emérito Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

**Botucatu
2014**

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

Magnoni, Mariana Sartori.

Perfil imunofenotípico e nível de citocinas plasmáticas em portadores de hepatite C crônica (genótipo 1) com diferentes graus de comprometimento hepático / Mariana Sartori Magnoni. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Márjorie de Assis Golim

Coorientador: Paulo Eduardo de Abreu Machado

Capes: 21102007

1. Hepatite C. 2. Citocinas. 3. Marcadores biológicos. 4. Fígado - Doenças. 5. Fibromialgia.

Palavras-chave: Biomarcador; Citocinas; Fibrose; Hepatite C; Quimiocinas.

DEDICATÓRIA

A Deus...
Por estar presente em tudo na minha vida. Pela força em tantos momentos de provações e
fraqueza. Tudo é do pai, toda honra e toda glória
É dele a vitória, alcançada em minha vida!

A Nossa Senhora Aparecida, minha mãezinha do céu.
“Nossa Senhora me dê a mão, cuida do meu coração
da minha vida, do meu destino,
do meu caminho, cuida de mim!

Ao meu avô Alcides (in memoriam)
que aí do céu, olhou por mim a vida toda
Dizia que nunca veria seus netos formados, pois é, em vida não conseguiu, porque Deus te quis
ao lado dele antes.
Mas aí de cima tenho certeza que está orgulhoso de todos nós.
Té amo muito! Saudades eternas.

Aos meus amados pais Paulo Henrique e Rosemeire
Que abriram mão do seus próprios sonhos para sonharem o meu.
Que se sacrificaram infinitas vezes para que eu pudesse realizar este sonho.
Não bastaria apenas um obrigado.
Esta conquista também é de vocês.
Amo vocês incondicionalmente.

À Minha irmã Maria Eugênia, por todo apoio e dedicação,
pela amizade e amor sem limites. Minha companheira, minha amiga, presente em todos os
momentos. Té amo incondicionalmente.

As minhas primas Luiza e Isabela, donas do meu melhor e mais puro sorriso.
Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha querida orientadora Dra. Márjorie de Assis Golim, por tudo que fez por mim desde a minha chegada ao laboratório de Citometria de Fluxo. Pelo incentivo a minha carreira científica e por me incentivar todos os dias a dar o melhor de mim em todas as minhas atividades. Que sabe todos os dias ser mestre, amiga, companheira, irmã, um pouco de tudo. Que mostra que tudo o que é feito com amor e com honestidade vale muito a pena.

Obrigada pelos infinitos conselhos, conversas, pelo apoio profissional e pessoal. Obrigada pelas orientação neste trabalho e por dividir seus conhecimentos.

Você nos motiva a querer ser como você. Assim como diz a frase: "Tú te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas"

Devo te agradecer de duas formas. Muito obrigada minha amiga.

Muito obrigada Mestre.

Ao meu estimado Co-orientador Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, que com seu imensurável conhecimento, sempre se mostrou simples e humilde nos ensinando que devemos sempre passar nosso conhecimento adiante.

Nunca saberei como agradecer os momentos em que pude desfrutar de seus conhecimentos, de aprender com suas explicações e ouvir suas histórias.

Tudo estará guardado em minha memória com muito carinho.

Obrigada por todas as oportunidades que me deste.

À querida, amiga Léia, que consegue transformar o maior problema do mundo em um sorriso e fazer tudo ficar bem. Que torna os dias leves, divertidos, que dá bronca, aconselha, acolhe. Amiga você é tão especial que nem caberia aqui tudo que poderia falar pra você. Mas a frase de uma música se encaixa bem com você então aqui está: “A arte de sorrir cada vez que o mundo diz não!” Essa é você, que ensina sobre a vida pra nós todos dias. Te amo demais.

A minha amiga, biomédica Aline, amiga, confidente, companheira. Sem seu compromisso, seu esforço e dedicação este trabalho não poderia ter sido concluído. Obrigada pelas horas de conversa, pelos incentivos nas horas de desânimo, nas horas em que tudo parecia muito difícil, complicado, nas horas de trabalho árduo, de risadas e brincadeiras. Não sei o que seria de mim sem você. Te amo amiga.

À Dra. Michele que com seu carinho e ternura faz tudo ficar melhor. Obrigada pela amizade verdadeira e fiel, pelo amor, pelas conversas, por ser você. Você faz toda diferença na minha vida. Te amo muito.

À Dra. Lucila que pra mim não é só uma médica. É meu porto-seguro, onde eu posso me encontrar. É ela que me mostra o norte e como seguir para chegar lá. Me dá a vara e ensina a pescar. Muito obrigada por entrar na minha vida no momento em que mais precisei e não sair mais. Hoje estou realizando um sonho, e a senhora fez parte dele por me ajudar a sonhá-lo. Muito obrigada.

Ao querido Dr. Giovanni Faria Silva, grande exemplo de Mestre e profissional, que ao abrir as portas do ambulatório de Hepatites Virais da Faculdade de Medicina mostrou-se um mundo paralelo ao que vivenciava, e me motivou a querer aprender cada dia mais sobre hepatites. Obrigada pela paciência, por disponibilizar seu tempo para tirar minhas dúvidas, por aceitar participar deste trabalho, por nos receber de braços abertos e por ser um grande amigo. Minha eterna gratidão por todas as oportunidades vindas do senhor, e por toda atenção e carinho recebidos. Jamais me esquecerei.

AGRADECIMENTOS

A minha avó Iolanda, exemplo de mulher guerreira, batalhadora, que viveu para o trabalho, e que amou seu netos acima de tudo. Obrigada por tudo que fez por mim.

Aos meus avós Maria e Domingos, exemplos de perseverança e humildade. Quanto aprendi com vocês!! Minha gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim..Amo vocês!

A todos os meus familiares que torceram por mim, só tenho a agradecer por todas as palavras de incentivo, força, carinho, e principalmente pelos sentimentos a mim demonstrados. Obrigada por acreditarem.

A minha amiga Paula Ribeiro que foi o presente mais lindo que eu ganhei. A amiga-irmã, companheira, cúmplice. Obrigada por tanto amor.

Aos meus amigos de uma vida inteira Guilherme Sartori, Caroline Sartori, Cibele, Cintia, Nano, Lidiane Cássia, Débora Paula, Rafael Sartori, Luciano Luiz, Marquinho, Ana Paula, Fernanda, Dédo, Breno. É... uma vida toda feita de momentos tristes e alegres, e vocês presentes sempre. Impossível em poucas palavras escrever aqui o que significam pra mim. Minha gratidão pelo carinho e pela amizade de uma vida inteira.

Ao meu cunhado Danilo, por tudo que fez e faz por mim, pelo carinho, amizade, e por torcer por mim. Minha gratidão.

As minhas amigas Fabiana da Silva e Fabiana Andrade, pelo carinho e amor a mim dedicados. Por torcerem pela minha felicidade e pelos meus sonhos.

Aos meus queridos amigos Priscila e Emerson, com quem eu posso contar, desabafar e confiar. É bom saber que na vida temos pessoas como vocês que nos protegem e nos amam.

A minha amiga Larissa, que sei mesmo não podendo estar presente sempre, torce por mim. Agradeço imensamente pelo presente mais precioso que pode me dar a nossa amizade!

As queridas Adaíze e Denise pelo carinho de todos os dias. Pelas palavras de incentivo, carinho e pelo amor de mãe a mim oferecidos desde que cheguei ao Hemocentro. Vocês tem um lugar especial no meu coração. Obrigada.

A Dra. Valéria Nogueira Dias Paes Secco. Minha gratidão pelo carinho, por acreditar e confiar na minha capacidade desde que fui aprimoranda e pelo incentivo sempre. A senhora tem e terá sempre um lugar muito especial no meu coração.

Ao Fernando Oliveira, exemplo de grande profissional e competência. De um coração enorme, e humildade sem medir esforços para ajudar e dividir seus conhecimentos. A você Fer, muito obrigada pela amizade, pelo incentivo a ser uma grande profissional me motivando sempre a dar o meu melhor todos os dias. Obrigada de coração por fazer a diferença na minha vida.

A Janisse pela amizade, pela sua dedicação e atenção conosco. Obrigada por toda ajuda, e por disponibilizar seu tempo para me orientar, até mesmo para resolver os meus problemas quando não tinha tempo para os mesmos. Nunca esquecerei.

À querida Rita Alvarado por toda atenção, dedicação incomparável e competência no envio do projeto a FAPESP. Você foi peça chave dessa conquista. Minha eterna gratidão por todos os momentos dispensados a nós, pelas orientações e pela amizade sincera.

A amiga Luciane Lima, por todos os momentos vividos juntas. Pelos conselhos, risadas, viagens, puxões de orelha mais acima de tudo pela amizade tão sincera que existe entre nós. Só tenho a agradecer por me permitir estar ao seu lado e ser sua amiga. Você é uma pessoa iluminada.

Aos queridos Maércio e Regina, anjos que Deus mandou a Terra para fazer a diferença na vida das pessoas. Vocês fizeram na minha. Obrigada pelos conselhos oportunos, pelas risadas, brincadeiras e principalmente pela amizade verdadeira. Adoro demais vocês.

A minha amiga do coração Andressa Cruz, obrigada pelas palavras de incentivo, e principalmente pela amizade mais linda que cresceu entre nós. Sem palavras para falar de você.

À Equipe do Ambulatório de Hepatites Virais Mari Nilce, Fernanda Winckler, Vanessa, Carol, Flavinha, Mariana e Iara que nos receberam de braços abertos e nos ajudaram em tudo o que foi possível. Não temos palavras para agradecer vocês. Sem essa preciosa colaboração nada disso poderia ter sido realizado.

A querida amiga Fernanda Nalli. Exemplo de amizade verdadeira. As vezes longe, as vezes perto, mas dentro do coração sempre. Obrigada por toda preciosa ajuda com o trabalho.

A querida Carolina Mititká que com tanto carinho e prontidão, contribuiu para esse trabalho. Obrigada de coração pela ajuda e pelo carinho, amizade tão sinceros que recebi de você. Sempre no coração.

A Luciana Pizzani, que com tanta competência, atenção, prontidão, carinho, corrigiu e me orientou para com as referências desta dissertação.

Ao Hemocentro de Botucatu, pela oportunidade de trabalho e por ser um lugar que amo tanto trabalhar.

Aos colegas do Hemocentro de Botucatu, que sempre me receberam, me trataram com muito carinho. Obrigada por tantos momentos vividos, pela força e incentivo sem a qual não poderia estar concretizando mais esta etapa de minha vida.

*À FAPESP pelo auxílio financeiro sem o qual não seria possível a execução desse trabalho.
(Processo número 2012/14477-0)*

Aos pacientes que com tanto carinho nos ouviram e aceitaram doar seu sangue para este trabalho. Sem vocês nada disso teria sido feito. Foi por vocês que tudo aconteceu. Que Deus os abençoe sempre. Minha eterna gratidão e amor.

Duras Palavras

Basta apenas um “bom dia” e um sorriso,
Para o dia se tornar bem melhor.
Uma conversa agradável,
E desperta-se gargalhadas:
Baboseiras, ensinamentos e conselhos são frutos do dia-a-dia!
Uma palavra de carinho,
faz com que a dor diminua e lágrimas cessem.
O simples “silêncio-acompanhado”,
pode curar feridas, dar força e motivação.
Assim como arregaçar as mangas em ocasiões de muito trabalho,
Pode estreitar laços.
Há momentos em que nada parece dar certo,
Em que os espinhos parecem surgir de todos os lados e que as forças se esgotam,
E é nesses momentos que precisamos ouvir certas e duras palavras.
Palavras que a princípio até nos magoam,
Mas são essas “verdades” que nos fazem voltar ao caminho correto,
E nos dão forças para encontrarmos uma “saída”.
E diante disso, nos resta agradecer pelas duras palavras.
Amigo:
Uma palavra sua pode mudar meu dia,
me ajudar a trilhar o caminho certo e conquistar minhas vitórias!
Obrigada amigos por não apenas me apoiarem dizendo aquilo que eu queria ouvir,
Mas por terem sido verdadeiros em todos os momentos,
Ajudando-me à nunca perder o foco.
Obrigada por estarem comigo!

Aline Braz Rosso

EPÍGRAFE

Aquilo que sou

Passamos grande parte da vida estudando, trabalhando, planejando,
Nos preparando para um dia que não sabemos se iremos viver.
Passamos a vida amando,
Fazendo aquilo que mais gostamos [pelo menos deveria ser assim],
Ou apenas nos isolando de medo do que não sabemos.
Vivemos tão aceleradamente o dia-a-dia,
Esquecendo-nos “do que” e “de quem” estão ao nosso redor,
Até estarmos embrenhados no abismo da solidão.
Não há conhecimento que preencha o coração;
Subcrevo Max Weber: “O trabalho enobrece o homem”,
Mas para mim, a amizade, o carinho e o amor é que acalentam a alma!
Sozinhos não somos nada;
Sozinhos não conquistamos nada e não chegamos à lugar algum.
Não há trabalho que seja executado,
Nem conhecimento que seja compartilhado na solidão.
Somos apenas aquilo que significamos,
Aquilo que plantamos nos corações das pessoas.
E que fique como legado póstumo,
Não apenas aquilo que fiz,
Mas principalmente tudo aquilo que fui.

Aline Braz Rosso

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1: Morfologia do vírus da hepatite C.....	2
Figura 2: Estrutura do genoma do vírus VHC.....	2
Figura 3: Ciclo de Replicação do VHC.....	4
Figura 4: Formação da Fibrose Hepática	7
Figura 5: Intensidade de expressão dos marcadores CD16 e CD56 nas células NK	12
Figura 6: <i>Dot Plot</i> tamanho (FSC) <i>versus</i> granulosidade (SSC) com gate R1 selecionando toda população de leucócitos excluindo debris.....	23
Figura 7: Ensaio de quatro cores em sangue total. Região R2 inclui HLA-DR ⁺ e Lineage Cocktail dim ou negativo.....	23
Figura 8: Ensaio de 4 cores com sangue total. Região R3 define basófilos, R4 define DCs CD123 ⁺ e R5 define CD11c ⁺	24
Figura 9: Estratégias de <i>gates</i> para seleção de subpopulação de células NK.....	25
Figura 10: Estratégias de aquisição e análise de monócitos utilizando anticorpos monoclonais anti-CD14 (FITC) e anti-CD16 (APC).....	26
Figura 11: Frequência (valores absolutos) das subpopulações de linfócitos T periféricos nos grupos. A) Linfócitos T auxiliares (CD3 ⁺ /CD4 ⁺); B) Linfócitos T citotóxicos (CD3 ⁺ /CD8 ⁺); Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$	29
Figura 12: Frequência das subpopulações de monócitos nos grupos. A) Monócitos Clássicos CD14 ⁺ /CD16 ⁻ ; B) Monócitos Pró-inflamatórios (CD14 ⁺ /CD16 ⁺). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$	30
Figura 13: Frequência das subpopulações de células NK nos grupos. A) Células NK ^{dim.} ; B) Células NK ^{bright.} ; C) NK total. Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$	32
Figura 14: Frequência de subpopulações de células dendríticas nos grupos. A) mDC (CD11c ⁺); B) pDC (CD123 ⁺). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$	34
Figura 15: Relação mDC:pDC nos grupos. Teste de Mann-Whitney, p	

< 0,05..... 35

LISTA DE TABELAS

Lista de Tabelas

Tabela 1: Caracterização qualitativa da amostra..... 27

Tabela 2: Frequência das subpopulações celulares periféricas e níveis de transaminases (mediana, valores mínimo e máximo) distribuídas nos grupos..... 28

Tabela 4: Dosagem de citocinas e quimiocinas plasmáticas (mediana, valores mínimo e máximo) distribuídas nos grupos..... 37

*LISTA DE
ABREVIACÕES*

Lista de Abreviações

HCV: Hepatitis C Virus

VHC: Vírus da Hepatite C

RNA: Ácido Ribonucleico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HBV: Vírus da Hepatite B

HTLV: Vírus linfotrópico da célula T humana

CD: Cluster of Differentiation

NK: Natural Killer

IFN- γ : citocina Intérféron gama

TNF- α : citocina fator de necrose tumoral alfa

MF: Miofibroblastos produtores de colágeno

DC: Dendritic Cells (células dendríticas)

pDC: Célula dendrítica plasmocitóide

mDC: Células dendrítica mielóide

HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano ativado por moléculas MHC de classe II

Linfócitos T CD4⁺: Linfócitos T auxiliares

Linfócitos T CD8⁺: Linfócitos T citotóxicos

IL: Interleucina

Th: Resposta T helper

HSC: Hepatic Stellate Cells (Células estreladas hepáticas)

TCR: Receptor de células T

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MMPs: Metaloproteinases

TIMPs: Inibidor Tecidual de Metaloproteinases

ALT: Alanino aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

ECM: Extracellular matrix (matriz extracelular)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético

PBS: Tampão salina fosfato

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

PE: Fluorocromo denominado ficoeritrina

PerCP: Fluorocromo denominado Peridinin chlorophyll protein

APC: Fluorocromo denominado alofococianina

μl: Microlitro

pH: concentração hidrogeniônica de uma solução

TGF- β: Fator de crescimento tumoral - beta

PEG-IFN: Intérferon peguilado

RBV: Ribavirina

RVS: Resposta Viroológica Sustentada

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

RESUMO

O vírus da hepatite C crônica (VHC) é causa de doença hepática crônica afetando cerca de 3% da população mundial, aproximadamente 170 milhões de pessoas. Investigações sobre a resposta imune em indivíduos infectados com HCV é justificável pelo fato desta constituir doença infecciosa cujas alterações imunológicas têm relação direta com o desenvolvimento e a manutenção da infecção. Este projeto visou avaliar aspectos que compõem a resposta imune de pacientes com hepatite C crônica com diferentes graus de lesão hepática. Foram incluídos no estudo pacientes VHC⁺ (n=83), genótipo 1, pré-tratamento, os quais foram estratificados conforme o grau de fibrose hepática determinada por biópsia (classificação METAVIR), compondo: G1 (n = 15) pacientes nos estágios F0 (nenhuma fibrose) + F1 (fibrose em expansão dos espaços porta); G2 (n = 21) pacientes no estágio F2 (poucas fontes de fibrose nos espaços porta); G3 (n = 15) pacientes em estágio F3 (início da formação de nódulos); G4 (n = 32) pacientes em estágio F4 (fibrose severa); G5 (n = 16) doadores de sangue voluntários (grupo controle). Foram avaliadas características imunofenotípicas de subpopulações de leucócitos do sangue periférico (células NK totais, NK^{dim}, NK^{bright}, células dendríticas mielóides e plasmocitóides, monócitos clássicos e pro-inflamatórios, linfócitos T CD4+/CD8+), níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas (TGF- β , TNF- α , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10), analisando a relação destes com a progressão da fibrose. Todas as frequências das subpopulações leucocitárias avaliadas estão alteradas em portadores de hepatite C crônica comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, há correlação entre o grau de fibrose e a quantidade de linfócitos T CD4, T CD8, monócitos pro-inflamatórios e células NK^{bright} circulantes. Níveis aumentados de TNF- α foram observados em pacientes cirróticos (G4) e TGF- β nos grupos VHC⁺ com moderada fibrose hepática (G2 e G3). As quimiocinas plasmáticas CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES, MIP-1 α estão aumentadas em pacientes com hepatite C crônica e CXCL10/IP-10 tem correlação positiva com a severidade da lesão hepática. Os resultados sugerem que, em conjunto, biomarcadores circulantes, podem ser úteis na predição de estágios de inflamação e fibrose hepática nos pacientes portadores de hepatite C crônica.

ABSTRACT

The chronic hepatitis C virus (HCV) is the cause of chronic liver disease affecting about 3% of world population, approximately 170 million people. Investigations of the immune response in individuals infected with HCV is justifiable because this form infectious disease whose immunological changes are directly related to the development and maintenance of infection. This project aimed to evaluate aspects that make up the immune chronic hepatitis C patients with different degrees of liver damage response. The study included patients HCV+ (n = 83), genotype 1, pretreatment, which were classified according to the rate of hepatic fibrosis determined by biopsy (METAVIR classification), composed of: G1 (n = 15) patients in stages F0 (no fibrosis) + F1 (fibrosis expansion of port spaces), G2 (n = 21) patients in the F2 stage (few sources of fibrosis in portal), G3 (n = 15) patients with stage F3 (early nodule formation), G4 (n = 32) patients with stage F4 (severe fibrosis), G5 (n = 16) volunteer blood donors (control group). Immunophenotypic characteristics of subpopulations of peripheral blood leukocytes (total NK cells, NKdim, NKbright, myeloid dendritic cells and plasmacytoid, classical monocytes, pro-inflammatory CD4+ / CD8+ cells), cytokine levels and plasma chemokines (were evaluated TGF- β , TNF- α , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10), analyzing their relationship with the progression of fibrosis. All frequencies of evaluated leukocyte subpopulations are altered in patients with chronic hepatitis C compared with healthy subjects. In addition, no correlation between the degree of fibrosis and the amount of CD4, CD8, pro-inflammatory monocytes and circulating NK^{bright} cells. Increased levels of TNF- α were observed in cirrhotic patients (G4) and TGF- β in HCV+ groups with moderate hepatic fibrosis (G2 and G3). Plasma chemokine CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES, MIP-1 α are increased in patients with chronic hepatitis C and CXCL10/IP-10 has positive correlation with the severity of liver injury. The results suggest that use of the circulating biomarkers together can be useful predicting stages of inflammation and hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C.

SUMÁRIO

Sumário

Agradecimentos	
Agradecimentos Especiais	
Epígrafe	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Resumo.....	i
Abstract.....	ii
1. Introdução.....	1
1.1. Morfologia do vírus, ciclo de replicação e transmissão do HCV.....	1
1.2. Fatores virais e do hospedeiro.....	5
1.3. Fibrose – lesões hepáticas.....	5
1.4. Sistema Imune e alterações hepáticas causadas pelo HCV.....	7
1.4.1. Subpopulações de Monócitos.....	8
1.4.2. Subpopulações de Células Dendríticas.....	9
1.4.3. Células Natural Killers.....	11
1.4.4. Linfócitos T CD4+/CD8+.....	13
1.4.5. Papel de citocinas e quimiocinas na inflamação e fibrose hepática induzidas pelo vírus HCV.....	14
1.5. Biópsia Hepática.....	16
1.6. Ação das enzimas alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) na hepatite C crônica.....	17
2. Objetivo Principal.....	19
3. Objetivos Específicos.....	19
4. Casuística e Métodos.....	20
4.1. Coleta da amostra para imunofenotipagem e armazenamento de plasma.....	21
4.2. Imunofenotipagens por citometria de fluxo.....	21
4.3. Imunofenotipagens.....	22
4.3.1. Imunofenotipagem de Células Dendríticas.....	22
4.3.2. Imunofenotipagem de células NK.....	24
4.3.3. Imunofenotipagem de monócitos.....	25
5. Dosagem de Citocinas e Quimiocinas pelo método de CBA (Cytometric Bead Array).....	26
6. Análise Estatística.....	26
7. Resultados e Discussão.....	27
6.1. Linfócitos T CD4/CD8.....	28
6.2. Monócitos.....	30
6.3. Células NK.....	31
6.4. Células Dendríticas.....	33
6.5. Enzimas Hepáticas ALT e AST.....	36
6.6. Dosagem de Citocinas e Quimiocinas plasmáticas	37
7. Conclusão.....	44

8. Referências Bibliográficas.....	45
9. Anexos.....	46

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma das principais causas de doenças crônicas do fígado, afetando cerca de 3% da população mundial, aproximadamente 170 milhões de pessoas. A maioria das pessoas infectadas, cerca de 70%, progride para a fase crônica da doença, podendo desenvolver cirrose ou carcinoma hepatocelular. (KUO et al., 1989; LLOYD, 2006; DUSTIN; RICE, 2007; SOLDEVILLA et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

1.1. Morfologia do vírus, ciclo de replicação e transmissão do HCV

A hepatite C é consequência de uma infecção por vírus hepatotrópico denominado *Hepatitis C Virus (HCV)* ou vírus da hepatite C (VHC). É um vírus de RNA, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* de pequeno tamanho, variando de 30 a 80nm, possuindo uma cadeia de 9.600 nucleotídeos. (FERREIRA; SILVEIRA, 2004; THIMME et al., 2006; MAJEAU et al., 2009; SKLAN, 2009) (Figura 1).

O genoma do vírus é constituído por uma molécula de RNA que contém aproximadamente cerca de 9500 nucleotídeos que codificam as informações para a replicação viral. A cadeia de RNA é composta por duas regiões terminais altamente conservadas e não codificadoras (UTR) 5' e 3', e entre estas uma única fase de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*), que codifica uma poliproteína com cerca de 3011 aminoácidos. No polo N-terminal essa proteína é clivada em três proteínas estruturais o nucleocapsídeo viral (*core*), envelope um (E1), envelope dois (E2), que estão envolvidas na organização arquitetural do VHC. No polocarboxi-terminal a poliproteína é clivada em seis proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4 (NS4A e NS4B), NS5 (NS5A e NS5B), e NS6, responsável pelo ciclo biológico do vírus (Figuras 1 e 2). (WELLNITZ et al., 2002; MAUS et al., 2010; CHAYAMA et al., 2011; ROQUE-CUÉLLAR et al., 2013).

Cada proteína estrutural exerce uma função específica com relação ao ciclo biológico do vírus. NS2, NS3 e NS4A, são proteínas envolvidas nas atividades proteolíticas, NS4B está relacionada com a formação de complexos de replicação,

NS5A com a ligação do RNA, e por fim a formação da RNA dependente RNA polimerase. (LLOYD et al., 2007) (Figura 2).

Figura 1: Morfologia do vírus da hepatite C.

(Fonte: <http://www.torontoliver.ca/content/hepatitisc.html>).

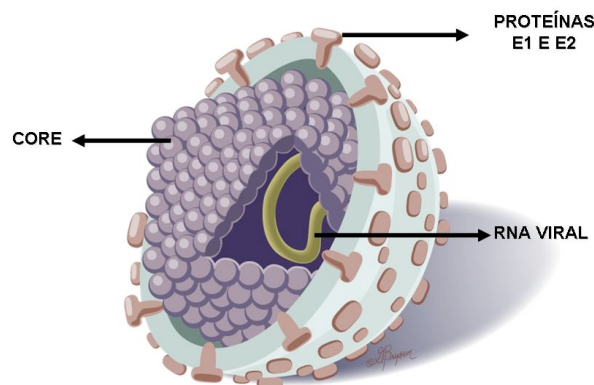
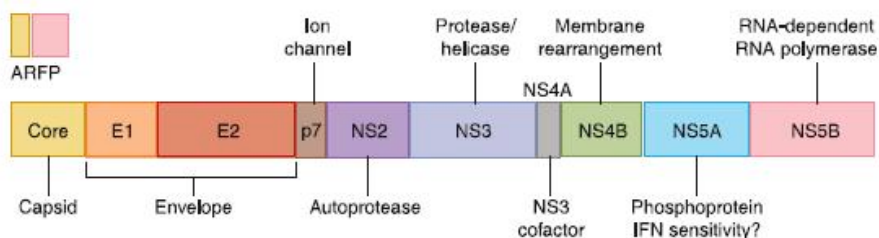


Figura 2 – Estrutura do genoma do vírus VHC (DUSTIN; RICE, 2007)



O VHC apresenta ampla variabilidade genômica, que pode estar associada à atividade da enzima RNA polimerase no momento da transcrição. Devido a essa variação houve uma caracterização de seis genótipos enumerados de 1 a 6, que ainda são subdivididos em grupos. As cepas variam entre si, podendo ainda obter variações do VHC que são denominadas de *quasispecies*, que sugere mutações acumuladas durante a replicação viral. Sua taxa de replicação é de 10^{12} vírions ao dia, e sua taxa de mutação é relativamente alta, perfazendo 10^{-3} substituições de nucleotídeos ao ano.

(MELO et al., 2003). No Brasil os genótipos mais frequentes encontrados são os genótipos 1, genótipo 3, seguido respectivamente do genótipo 2. (LIANG et al., 2000; STRAUSS, 2001; CHAVALIEZ ; PAWLOSTSKY, 2007; SKLAN et al., 2009 ; DST-AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2011 ; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2012).

O VHC penetra no organismo através da corrente sanguínea, e por tropismo segue para o fígado, podendo passar por diversos órgãos e infectá-los. Sabe-se que o VHC é um vírus hepatotrópico e linfotrópico, podendo também se replicar em linfócitos T e B de indivíduos que possuam hepatite C crônica. (MAC DONALD et al., 2002). O VHC também possui a capacidade de infectar sítios extra-hepáticos, favorecendo então o aparecimento de variantes virais e diminuir o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. (GIANNINI; BRÉCHOT, 2003).

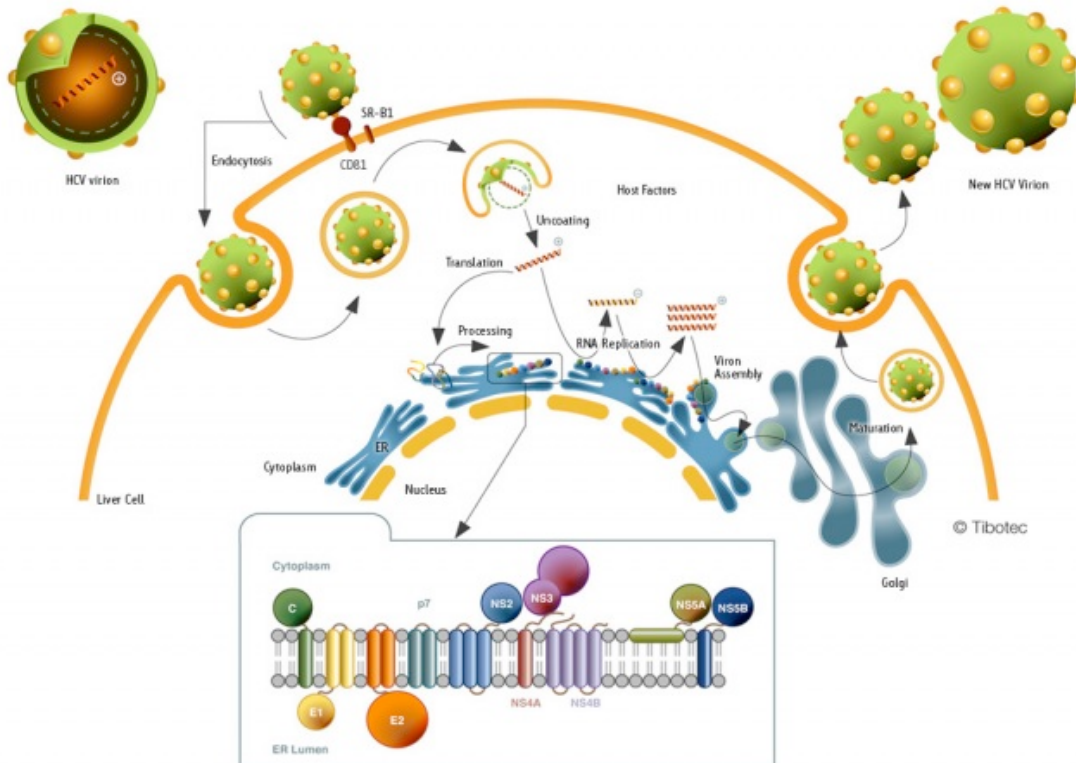
A entrada do VHC na célula se dá através da ligação da proteína do envelope lipídico E2 com a molécula de superfície CD81 presente em hepatócitos e linfócitos. (PILERI et al., 1998; FANG et al., 2006; SKLAN et al., 2009).

A molécula CD81 é um membro da família das tetraspaninas, contém quatro domínios transmembranares, sendo dois domínios extracelulares e dois intracelulares. As tetraspaninas estão envolvidas em diversas funções fisiológicas e numerosos processos relacionados a doenças infecciosas. CD81 é expresso na superfície de vários tipos de células e possui um grande espectro de atividades biológicas. O CD81 é descrito na literatura como um dos receptores de células B, T e hepatócitos, que facilita a entrada do vírus VHC. (PILERI et al., 1998; SOLDEVILLA et al., 2010).

Após a interação da proteína E2 com a molécula CD81, o VHC entra na célula por endocitose e no citoplasma acontece a tradução do RNA mensageiro e o processamento de suas poliproteínas, depois disso, há a replicação do RNA viral e novos vírus são envelopados e liberados para infectar novas células hospedeiras, completando novo ciclo. (LINDEBACH; RICE, 2005; FANG et al., 2006; SKLAN et al., 2009). (Figura 3)

Figura 3: Ciclo de replicação do VHC.

(Fonte: <http://thebileflow.wordpress.com/2011/02/07/lecture-hcv-viral-kinetics/>).



A

transmissão do vírus VHC ocorre de duas formas: transmissão parenteral e a não parenteral. A infecção parenteral acomete indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados, antes de 1993, sendo o VHC encontrado nos concentrados de hemácias, plasmas, plaquetas e fatores da coagulação. Usuários de drogas intravenosas, pessoas que tiveram exposição percutânea, como tatuagem, *piercing*, em consultórios odontológicos, podólogos, manicures, com uso de material não estéril. Já a infecção não parenteral é a possibilidade de se adquirir o vírus pela transmissão sexual, porém esta via de transmissão é pouco freqüente, ocorrendo mais em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco. Líquidos orgânicos

como leite materno e sêmen também podem conter o vírus e constituir-se como fonte de infecção. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

1.2. Fatores virais e do hospedeiro

Alguns fatores virais contribuem para a progressão da doença crônica do VHC, idade no momento da infecção pelo vírus, o inóculo da infecção, citopatogenicidade direta do vírus, genótipo viral, esteatose hepática, síndrome colestática, hepatite aguda lobular induzida por VHC, e apoptose. (GREMION; CERNY, 2005, SILVA et al., 2005).

Estudos de Cholet e colaboradores (2004) demonstram que a proteína do *core* e NS5A, estão presentes nas superfícies de vesículas lipídicas, alterando seu metabolismo, causando a esteatose, que influencia a progressão da doença em relação ao grau de fibrose na hepatite C crônica.

Em relação ao genótipo do vírus, o mais frequente é o genótipo 1b, que acarreta pior resposta terapêutica, porém discutível de ser o causador de lesões hepáticas mais graves. O genótipo viral 3 é frequentemente relacionado com a formação de esteatose e por isso considerado citopático. (NEGRO, 2006; STRAUSS, 2001).

Fatores do hospedeiro são classificados como extrínsecos e intrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados à idade, gênero masculino, raça negra, diabetes *mellitus*, índice de massa corpórea e obesidade, sistema imune, fatores genéticos e grande quantidade de ferro encontrada no fígado. Fatores extrínsecos são aqueles que poderiam ser evitados para amenizar os efeitos causados no indivíduo com hepatite C como uso de álcool, tabagismo, coinfeção com outros vírus (HIV, HBV, HTLV, entre outros). (SILVA et al., 2012).

1.3. Fibrose – lesões hepáticas

A fibrose resulta de um processo dinâmico onde ocorre desequilíbrio entre síntese da matriz extracelular (*extracellularmatrix* - ECM) e sua degradação. Alguns estudos têm relacionado ativação das células estreladas hepáticas (*hepaticstellatecells*

- HSCs) e dos miofibroblastos (*myofibroblasts* - MF) na patogênese da fibrose hepática. (POYNARD et al., 1997; SCHUPPAN et al., 2003; BATALLER; BRENNER, 2005; XU et al., 2011).

Na fase aguda de doenças hepáticas a fibrogênese é balanceada pela fibrinólise, pela remoção do ECM por enzimas proteolíticas, sendo as metaloproteinases (MMPs) as mais importantes. Com a repetição da injúria a fibrogênese prevalece sobre a fibrinólise, resultando no excesso de deposição de ECM, caracterizando fibrose.

A fibrose hepática ocorre durante doenças hepáticas crônicas e é dirigida por respostas inflamatórias a injúria tecidual, a qual frequentemente leva a um estágio final de cirrose, caracterizado pela formação de nódulos densos, fluxo sanguíneo hepático alterado e disfunção imune. (BATALLER; BRENNER, 2005; ALLOMAN; TACKE, 2010; ALLOMAN et al., 2011).

Recentes achados experimentais têm fornecido evidências de que a inflamação intra-hepática é altamente regulada por processo envolvendo o recrutamento e a diferenciação de distintas populações de células imunes dentro do microambiente hepático. (BATALLER; BRENNER, 2005; ALLOMAN; TACKE, 2010; ALLOMAN et al., 2011).

Alterações iniciais na histologia do fígado são caracterizadas pelo acúmulo de células inflamatórias e deposição de ECM em torno da veia porta. Em doenças hepáticas, inclusive na hepatite C, a fibrose é definida pelo acúmulo anormal de matriz extracelular, tendo a inflamação papel crucial. HSCs são as principais produtoras de matriz no fígado, quando ativadas atuam na injúria, diferenciando-se em miofibroblastos e adquirindo propriedades contráteis, pró-inflamatórias e fibrogênicas. Há evidências que um substancial número de citocinas pró-inflamatórias regula a função das HSCs. As vias de ativação das HSCs incluem aquelas que provocam a iniciação e também mantêm a perpetuação da fibrogênese. Dentre os estímulos de iniciação podemos citar a infecção pelo VHC. Após a iniciação, miofibroblastos são caracterizados pelo aumento da proliferação, migração e relativa resistência a apoptose. (BATALLER; BRENNER, 2005) (Figura 4).

1.4. Sistema Imune e alterações hepáticas causadas pelo HCV

O balanço entre a sensibilidade, efetividade, especificidade e rapidez da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro associadas à replicação do vírus contribuem para a eliminação ou persistência da infecção. (BROWN; NEUMAN, 2001).

O hospedeiro responde rapidamente à infecção viral pela resposta imune inata, produzindo citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , que favorecem a ativação de células NK, bem como a atividade de apresentação de antígenos por fagócitos, dentre os quais se destacam as células dendríticas e monócitos. (KANTO; HAYASHI, 2006; DUSTIN; RICE, 2007; ISAGLUTIANS 2003; LLOYD et al., 2007; AKIRA, 2011).

O alto percentual de infecção crônica pelo VHC pode ser devido à possibilidade do VHC não induzir uma resposta imune eficiente ou pela ativação de mecanismos de escape agindo contra a resposta imune protetora.

1.4.1. Subpopulações de Monócitos

Monócitos constituem uma população de leucócitos circulantes que mediam funções essenciais da imunidade inata incluindo fagocitose e produção de citocinas. Têm importante papel na patogênese de desordens inflamatórias, pois são precursores de macrófagos teciduais e células dendríticas. Apesar de não se conhecer a função dos monócitos de forma esclarecida, estudos sugerem que os mesmos atuam em mecanismos da homeostase do vaso sanguíneo. Sendo assim em processos inflamatórios e infecciosos, eles seriam as primeiras células a extravasarem para o tecido nas primeiras duas horas do processo e a se diferenciarem em macrófagos oito horas depois, desenvolvendo rápida e transitória resposta inflamatória. (ROBBINS; SWIRSKY, 2010).

Macrófagos derivados de monócitos perpetuam respostas inflamatórias após dano hepático como uma condição prévia para a fibrose do órgão. Em humanos, monócitos consistem em células CD14⁺/CD16⁻ denominados em clássicos ou inflamatórios, e CD14⁺/CD16⁺, como não clássicos, residentes ou pró-inflamatórios. (ZIMMERMANN et al., 2010).

Zimmermann e colaboradores (2010) apontam a necessidade de investigar a relevância das subpopulações de monócitos para a fibrose do fígado e hipotetizam que grandes níveis de monócitos não clássicos circulantes apontam funções inflamatórias e pró-fibrogênicas em pacientes durante a progressão da doença do fígado. Em seus trabalhos verificaram que a subpopulação CD14⁺/CD16⁺ foi significativamente aumentada em pacientes com doença hepática crônica em comparação ao grupo controle. Além disso, segundo os mesmos, monócitos CD14⁺/CD16⁺, mas não CD14⁺/CD16⁻, podem diretamente, ativar a produção de colágeno. Durante a progressão da fibrose em modelos murinos, macrófagos derivados de monócitos liberam citocinas perpetuando a inflamação crônica, como também, ativam diretamente as HSC, resultando em sua proliferação e diferenciação em MF produtores de colágeno.

Zimmermann e colaboradores (2010) ressaltam ainda que monócitos CD14⁺/CD16⁺ que se acumulam no fígado fibrótico/cirrótico, são importantes fontes de mediadores pró-inflamatórios, assim perpetuando a inflamação crônica.

Robbins & Swirsky (2010) sugerem que estudos que avaliem as diferentes funções de subgrupos de monócitos são relevantes para compreender os processos envolvidos na iniciação e resolução de processos inflamatórios.

1.4.2. Subpopulações de Células Dendríticas

As células dendríticas (*Dendritic Cells* - DCs) são apresentadoras de antígenos especializadas, as quais desempenham papel importante na imunidade frente às infecções, constituindo um elo entre imunidade inata e adaptativa. (MAC DONALD et al., 2002).

DCs circulantes migram para o sítio da inflamação, capturam o vírus ou antígenos virais, processam e migram para os tecidos linfóides para induzir a resposta imune antígeno-específica *in vivo*.

Usando citometria de fluxo pesquisadores têm analisado a frequência de DCs circulantes em infecções virais crônicas, enquanto outros tem focado a migração e mobilização induzida por fatores hematopoiéticos. Para avaliar DCs por citometria de

fluxo são necessárias peculiaridades para assegurar a caracterização fenotípica destas células distinguindo-as das demais. Células NK e NKT podem expressar níveis intermediários de CD11c, e a exclusão dessas células durante análise de DC é importante devido ao envolvimento destas durante a fibrose. (WERTHEIMER, 2004; CICINNATI, 2008; GOUTAGNY, 2004; TSUBOUCHI, 2004; SWIECHI, 2011; ALLOMAN; TACKE, 2010; ALLOMAN et al., 2011).

No sangue, DCs estão presentes de forma imatura e podem ser distintas por não expressarem marcadores específicos de linhagens (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) e expressarem altos níveis de HLA-DR. Células dendríticas humanas são divididas em duas populações celulares baseadas em marcadores fenotípicos e função:

- **DC mielóide (mDC)** expressam CD11c e estão associadas com captura de antígenos, ativação de células T e habilidade para secretar IL-12;
- **DC plasmocitóides (pDC)** expressam CD123 e produzem altos níveis de IFN- α que tem importante papel no controle de infecções virais (WERTHEIMER et al., 2004, ALMEIDA et al., 2005; CRUVINEL et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; MAECKER et al., 2012).

Poucos estudos tem retratado a frequência de subpopulações de DCs (mDC e pDC) no sangue periférico de pacientes portadores de hepatite C crônica, mostrando uma tendência à diminuição quando comparados com controles saudáveis. Há uma correlação positiva entre a diminuição destas células e o nível de IFN-I circulante. Pacientes que estão em tratamento com IFN- α também apresentam baixos níveis de pDCs e mDC periféricas, assim como ocorre em pacientes infectados pelo HIV. (TSUBOUCHI et al., 2004; SZABO; DOLGANIUC, 2005 ; CICINNATI, 2008; LAI et al., 2007; KUSHWAH ; HU, 2011).

Não há um consenso sobre a frequência de mDC no sangue periférico de pacientes VHC. Alguns estudos confirmam ser similar entre pacientes e grupo controle, enquanto outros reportam ser significativamente menor. Com relação às pDCs trabalhos têm mostrado frequência significativamente reduzida em pacientes com hepatite crônica.

DCs podem potencialmente ser capazes de modular a regressão da fibrose através da secreção de metaloproteinases (MMPs) que podem ajudar no remodelamento da matriz extracelular após a causa da injúria ser descontinuada. Além disso, DCs ativam células NKs, uma população de linfócitos conhecida por atenuar na progressão da fibrose hepática através da eliminação de células produtoras de matriz. (DOLGANIUC; SZABO, 2011; ALLOMAN et al., 2011).

Intensos esforços objetivando compreender o papel das DCs no sucesso do *clearance* viral *versus* o estabelecimento da infecção crônica são emergentes. (DOLGANIUC; SZABO, 2011).

1.4.3. Células Natural Killers

Células natural killers (NK) são essenciais na resposta imune inata, correspondem a aproximadamente 30% do total de células linfóides no fígado e representam 15% do total de linfócitos no sangue periférico. (DOHETY; O'FAREELY, 2000; KANTO; HAYASHI, 2007; SRIVASTAVA et al., 2008; NALESNIK; KANTO, 2010).

Recentemente estudos têm sugerido que subpopulações de NKs respondem à ativação principalmente com produção de citocinas. A maioria das NKs (>95%) constitui subpopulação citolítica e expressa fenotipicamente CD56^{low}CD16⁺. Essas migram para sítios inflamatórios e portam perforinas que rapidamente medeiam citotoxicidade. Uma menor subpopulação de NK no sangue (<5%) tem fenótipo CD56^{high}CD16⁻, não têm perforinas, mas secretam grande quantidade de IFN- γ e TNF- β após ativação e são superiores às NKs CD56^{low} nestas funções (FERLAZZO; MUNZ, 2004).

Em viroses hepatotrópicas, como a hepatite C, para sobreviver no órgão, o vírus tem que evitar ou superar a resistência antiviral inata oriunda das células NKs (GOLDEN-MASON; ROSEN, 2006; MELHEM et al., 2006; GAO et al., 2007).

Kondo e colaboradores (2011) verificaram que células NK regulam e balanceiam a ativação e inibição de sinais mediados por diferentes expressões de receptores. Uma importante função é a produção de IFN- γ que recruta células inflamatórias intra-hepáticas, e ativa outras células NKs, macrófagos, células apresentadoras de antígeno,

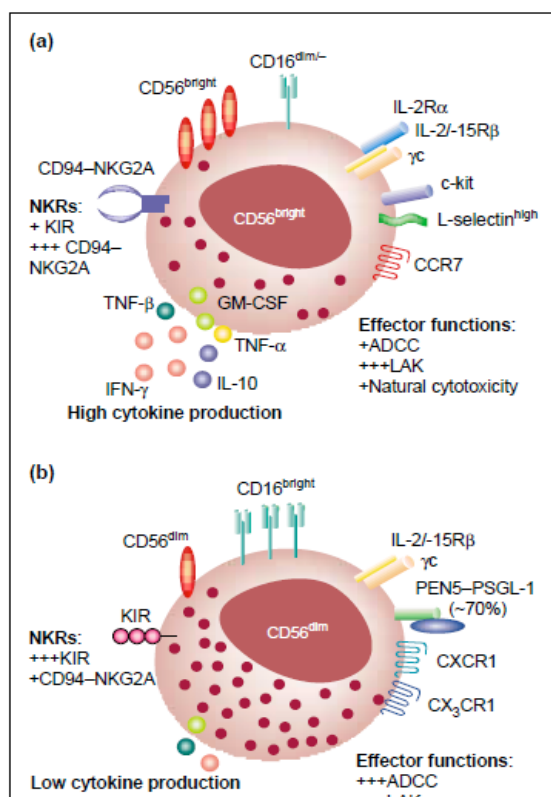
linfócitos B e elementos da imunidade adaptativa como a linfócitos T e suas respostas Th1 e Th2. (AGRATI et al.,2002).

A maioria das células NK está presente no fígado exercendo papel citotóxico, produzindo IL-4 e IFN- γ , porém também produzem outras citocinas como IL-1, IL-12 e estimulam a maturação de células dendríticas. Desta forma, na infecção pela hepatite C, atuam induzindo necrose ou apoptose da célula infectada, sinalizando a presença do vírus (JANEWAY et al., 2007; NORRIS, et al., 2003).

SegundoThimme e colaboradores (2006) o VHC inibe os genes receptores de ativação das células NK, diminuindo a ação dessas células, reduzindo o número e função das mesmas nos indivíduos cronicamente infectados.

Golden-Mason e colaboradores (2008) têm demonstrado que na infecção crônica pelo VHC a frequência de CD56^{low} é reduzida e CD56^{high} aumentada com resposta inadequada, contribuindo à persistência viral e diminuição de seus níveis tanto no fígado quanto no sangue (GOLDEN-MASON; ROSEN, 2006; KANTO; HAYASHI, 2007). (Figura 5).

Figura 5:Subpopulações de células NK e as suas principais características fenotípicas e funcionais. a) Representa a subpopulação CD56^{bright} e b) representa a subpopulação CD56^{dim} (COPPER, 2001).



Dados clínicos mostram que a atividade de células NKs é inversamente correlacionada com a regeneração hepática em pacientes VHC e pacientes com hepatite fulminante. Todavia, células NKs não apenas desenvolvem papel importante contra patógenos, mas também estão envolvidas na indução da injúria hepática e na inibição da reparação. Recentes estudos têm mostrado que células NKs estão envolvidas na regulação da fibrose hepática.

Embora não exista consenso se a atividade das células NKs está diminuída em pacientes infectados pelo VHC, existe uma correlação inversa entre atividade das células NKs e a fibrose hepática na infecção crônica pelo VHC, sugerindo que células NKs podem regular negativamente a fibrose. Entretanto o tratamento com IFN- α , potente ativador de células NKs, tem sido utilizado para amenizar fibrose hepática em pacientes infectados com VHC que respondem à terapia, bem como em pacientes com falha terapêutica na resposta à eliminação do vírus. Os efeitos antifibrogênicos de IFN- α são importantes para mediar, através de inibição direta, a proliferação e ativação das células HSC (GAO et al., 2007)

O papel das células NKs na fibrose hepática em humanos ainda é pouco claro. Alguns autores demonstraram que elas podem induzir a apoptose de células HSC *in vitro*. Uma correlação inversa foi verificada entre atividade de células NKs e o grau de fibrose hepática em pacientes com VHC crônico, sugerindo a inibição da fibrose pelas células NKs (GAO et al., 2007).

1.4.4. Linfócitos T CD4⁺/CD8⁺

Na imunidade adaptativa, linfócitos T possuem uma ampla variedade de funções em relação à infecção viral. São identificados por receptores específicos denominados de receptores de células T (TCR), que expressam receptores $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. (CHANG, 2003; BOWEN; WLAKER, 2005).

Linfócitos T $\alpha\beta$ são subdivididos em populações conhecidas como CD4⁺ e CD8⁺, que reconhecem as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e I respectivamente. As células T CD4⁺ são denominadas de células T auxiliares e as células T CD8⁺ denominadas de células T citotóxicas.

A produção de citocinas pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ pode desempenhar importantes funções na resposta do hospedeiro contra o vírus, e em alguns casos, contribuir para o desenvolvimento de danos hepatocelulares (ABAILY et al., 2003).

1.4.5. Papel de citocinas e quimiocinas na inflamação e fibrose hepática induzidas pelo vírus HCV

Muitas citocinas e quimiocinas têm sido relacionadas na literatura com importante papel em pacientes infectados pelo vírus VHC e/ou no processo da fibrogênese.

Quimiocinas são pequenas citocinas quimiotáticas (8-12 kDa), as quais recrutam diretamente células imunes para sítios específicos. Elas têm papel importante em doenças hepáticas agudas e crônicas, podem afetar diretamente a biologia de células residentes no fígado, como células estreladas hepáticas e hepatócitos durante as respostas inflamatórias e teciduais. É salutar o potencial destas moléculas tanto no processo inflamatório quanto na fibrogênese, os quais conduzem a progressão da doença hepática. Tem sido mostrado que quimiocinas tem relevante participação na patogênese da infecção pelo VHC, pelos altos níveis detectados no sangue periférico e no fígado. (KANG; SHIN 2011, WASMUTH et al., 2010, LARRUBIA et al., 2008).

Metade das quimiocinas conhecidas pertence à família CC. Muitas são detectadas em sítios inflamatórios ativos e em tecidos lesados e são os principais atraentes de células T, células B, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Em resposta à injúria hepática neutrófilos migram para o local da infecção através do estímulo de citocinas e quimiocinas. Tendências distintas da expressão de quimiocinas têm sido observadas em células de Kupffer (CXCL8), células do endotélio sinusoidal (CCL2), hepatócitos (CXCL8), linfócitos (CCL3), células estreladas hepáticas (CCL2), regulação de linfócitos T (CCL5), atividade de células estreladas hepáticas (TIMPs) (SHUPPAN et al., 2003; NEUMAN et al., 2012).

A CCL2 (*monocyte chemoattractant protein 1*- MCP-1) é uma das melhores quimiocinas caracterizadas no fígado. Ela é secretada por hepatócitos, células de

Kupffer e células do epitélio biliar após dano biliar ou tóxico. Células estreladas hepáticas são também rica fonte de CCL2.

CCL3 (MIP-1 α) e CCL4 (MIP-1 β) são produzidas por hepatócitos, células epiteliais sinusoidais hepáticas e células epiteliais biliares. Estudos mostram aumento destas quimiocinas no fígado e no sangue periférico de pacientes infectados cronicamente pelo VHC (KANG; SHIN, 2011; FLORHOLMEN et al., 2010).

CCL5 (RANTES) é outra quimiocina potencialmente importante no fígado. Ela estimula a proliferação de HSCs humanas. Estudos têm mostrado alta expressão de mRNA do CCL5 em pacientes com doenças hepáticas crônicas. Outros reportam o aumento do nível desta quimiocina no soro de pacientes HCV comparado ao grupo controle (WASMUTH et al., 2010; FLORHOLMEN et al., 2010)

Quimiocinas CXC, caracterizadas por um único aminoácido não conservado entre os resíduos de cisteína N-terminal, são o segundo maior grupo de quimiocinas. A função principal é atrair neutrófilos para o tecido lesado e inflamação, são importantes na fase inicial da inflamação e durante a reparação no fígado.

Dentre elas podemos citar CXCL8 (também denominada IL-8). Altos níveis séricos estão associados com a severidade da fibrose hepática. Pacientes com estágios mais severos de fibrose (F2 a F4) tem níveis significativamente mais elevados de CXCL8 que pacientes com grau mais leve de fibrose (F0/F1). Estes dados estão em concordância com a alta expressão de mRNA CXCL8 dentro do fígado de infectado por VHC (WASMUTH et al., 2010; KANG; SHIN, 2011).

CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC; IP-9) e CXCL4 (PF-4) têm sido consideradas interessantes na inflamação hepática e correlacionadas com a severidade da inflamação em pacientes infectados pelo VHC. A CXCL9 é produzida em altas concentrações por células endoteliais hepáticas, hepatócitos e HSC. Com a injúria hepática a produção desta quimiocina no fígado por células residentes promove a retenção de células que expressam CXCR3 (ligante de CXCL9). Quando a resposta imune falha no controle da replicação viral, células infectadas no fígado secretam IFN- γ , que induz quimiocinas como CXCL9, CXCL10 e CXCL11, as quais resultam na migração de células mononucleares não específicas para o fígado, sendo estas

incapazes de controlar a infecção, mas resultam em dano hepático persistente. Vários fatores estão envolvidos no processo de inflamação crônica, incluindo citocinas como IL-6, TNF- α , TGF- β , fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento epidermal, CCL21 e PDGF (XU et al., 2011; WASMUTH et al., 2010).

O TGF- β é um forte indutor da fibrogênese em células efectoras de fibrose hepática, especialmente em HSCs e MFs. Ele é liberado durante a inflamação, a regeneração tecidual e fibrogenese. O dano imunomediado é ligado à fibrogenese, mas o caráter da resposta imune determina a progressão da fibrose. (SCHUPPAN et al., 2003; NEUMAN et al., 2012).

Uma forte correlação entre o grau de inflamação e TNF- α tem sido encontrada, apontando a possibilidade de utilizá-lo como biomarcador do grau de inflamação hepática.

1.5. Biópsia Hepática

Baseado no “*Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para Hepatite Viral C e coinfeções*”, publicado pelo Ministério da Saúde em 2011, a biópsia hepática é um procedimento invasivo essencial para o estadiamento da hepatite crônica e definição da necessidade do tratamento. É indicada por permitir a retirada de fragmentos das áreas distantes da cápsula de Glisson, já que as áreas subcapsulares mostram muitas alterações inespecíficas.

Na hepatite crônica, a inflamação é predominantemente portal. O diagnóstico histológico baseia-se na presença de infiltrado inflamatório portal predominantemente linfocitário, número variável de plasmócitos e histiócitos seguidos de grau variável de atividade periportal, atividade parenquimatosa e fibrose. O padrão histológico hepático complementa a abordagem de pacientes com doença hepática, sendo que o tratamento será definido com base no grau de fibrose. Quando não recomendado o tratamento, a avaliação histológica hepática deve ser realizada em intervalos de três a cinco anos.

A biópsia hepática percutânea não deve ser realizada quando o paciente apresentar obesidade mórbida e possibilidade de lesões hepáticas vasculares.

De acordo com o consenso, as aminotransferases [transaminases – aspartatoaminotransferase (AST) e alaninoaminotransferase (ALT)] são marcadores de agressão hepatocelular. Na hepatite C crônica elas apresentam-se elevadas chegando a quinze vezes o valor normal. Em indivíduos assintomáticos, pode ser o único exame laboratorial sugestivo de dano hepático.

Acreditamos que outros marcadores laboratoriais não invasivos, de maior sensibilidade e especificidade, possam auxiliar na avaliação de dano hepático em pacientes com hepatite C crônica, incluindo aqueles para os quais a biopsia não é indicada.

1.6. Ação das enzimas alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) na hepatite C crônica.

As enzimas séricas alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), as transaminases, monitoram as funções hepáticas. Apesar de não serem totalmente específicas para o fígado (em particular AST), níveis elevados de soro podem indicar possível injúria hepática de causas variadas como por hepatites virais, alcoolismo, toxicidade hepática relacionada a excesso de drogas entre outras. (TSUI et al., 2012).

Alguns pacientes infectados pelo vírus C apresentam persistência de níveis normais de ALT durante todo o processo de infecção. (GRAMENZI et al., 2005; SINN et al., 2013).

A quantificação das transaminases constitui uma ferramenta de baixo custo utilizada para detectar doenças hepáticas. Os valores de referencia variam de acordo com gênero, sendo considerados como constituídos da média da dosagem no soro de indivíduos saudáveis com variação de até dois desvios (SINN et al., 2013).

Alguns pacientes apresentam persistência de níveis normais de ALT, os quais geralmente apresentam doença hepática leve, porém quando níveis de ALT tornam-se anormais esses pacientes podem exibir uma significativa progressão para fibrose hepática ou desenvolvem carcinoma hepatocelular. (CALLEJA et al., 2012).

Níveis de ALT e AST também são fatores associados à progressão da hepatite C, assim como níveis de alfa-fetoproteína, além de outros fatores já conhecidos. Uma análise de regressão verificou que níveis de plaquetas, idade, níveis de AST e ALT foram significativamente associada com a progressão da doença em homens (SIIN et al., 2013).

Investigações sobre a resposta imune em indivíduos infectados com HCV são justificáveis pelo fato desta constituir doença infecciosa cujas alterações imunológicas têm relação direta com o desenvolvimento e a manutenção da infecção. Nossa proposta baseia-se na avaliação de uma combinação de biomarcadores circulantes, os quais podem ser úteis na predição e monitoramento de estágios de inflamação e fibrose hepática nos pacientes portadores de hepatite C crônica.

2. Objetivo Principal:

Avaliar aspectos da imunidade inata e adaptativa, incluindo fenótipos celulares, níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticos e correlacionar os achados com diferentes graus de lesão hepática em portadores de hepatite C crônica.

3. Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de subpopulações de leucócitos circulantes nos portadores de hepatite C crônica comparados a indivíduos saudáveis;
- Correlacionar as frequências das subpopulações celulares circulantes com o grau de lesão hepática dos pacientes, segundo a classificação METAVIR;
- Dosar citocinas plasmáticas TGF- β e TNF- α , correlacionando com lesão hepática;
- Dosar quimiocinas plasmáticas CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e avaliar se há associação dos seus níveis com o grau de lesão hepática nos pacientes VHC⁺ comparados ao grupo controle.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 83 indivíduos portadores crônicos do vírus VHC, genótipo 1, pré-tratamento, atendidos no ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e no Serviço de Atendimento Especializado de Infectologia “Domingos Alves Meira”, UNESP, separados em grupos conforme a classificação METAVIR, que classifica os graus de fibrose hepática. Os grupos foram constituídos conforme descrição abaixo:

G1 – n = 15: pacientes nos estágios F0 (nenhuma fibrose) + F1 (fibrose em expansão dos espaços porta);

G2 – n = 21: pacientes no estágio F2 (poucas fontes de fibrose nos espaços porta);

G3 – n = 15: pacientes em estágio F3 (início da formação de nódulos);

G4 – n = 32: pacientes em estágio F4 (fibrose severa);

G5 – n = 16: indivíduos sadios, doadores de sangue voluntários, os quais representarão o grupo controle.

Critérios de Inclusão: Foram incluídos no estudo pacientes e doadores que forneceram consentimento livre e esclarecido (TCLE) por escrito, idade superior ou igual a 18 anos, de ambos os sexos, pacientes VHC com diagnóstico confirmado por PCR, estabilidade clínica e função hepática preservada.

Critérios de Exclusão: Coinfecções com HIV, HBV, HTLV, uso de álcool frequente (mais de duas respostas afirmativas no teste CAGE - *vide* ficha clínica) e gestantes.

A coleta de dados foi realizada em ficha clínica própria (Anexo 1) incluindo: Nome, RG, data de nascimento, sexo, grau de fibrose, genótipo, data da biópsia

hepática, data do diagnóstico sorológico, data provável do contágio, causas (prováveis) da infecção, avaliação de consumo de álcool (Teste CAGE).

O presente trabalho obteve parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, local de realização da pesquisa sob o protocolo número 4173-2012.

4.1. Coleta da amostra para imunofenotipagem e armazenamento de plasma

Foram coletados dois tubos de sangue total (5mL de cada) com anticoagulante EDTA ou K₂ (Vacutainer), levados ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu – UNESP, para processamento em até duas horas após coleta, para assegurar a integridade de proteínas circulantes (citocinas e quimiocinas), objetos do estudo. Um tubo foi destinado às imunofenotipagens realizadas em sangue total, no mesmo dia da coleta. Para tanto, foram mantidas à temperatura ambiente até o momento do processamento. Outra amostra, foi destinada às dosagens de citocinas e quimiocinas, foi mantida à 4°C imediatamente após a coleta, centrifugada a 300g por 10 minutos, o plasma aliquoteado em microtubos Eppendorf® e congelado a -80°C em no máximo 2 horas após a coleta. O concentrado de hemácias e a camada de *buffy-coat* que restaram no tubo-mãe foram desprezados.

4. 2. Imunofenotipagens por citometria de fluxo

Alíquotas de 100uL de sangue total foram inseridas em tubos de poliestireno (12X75mm), próprios para uso em citômetro de fluxo, incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas de luz. Após marcação, as hemácias foram lisadas com 900uL de FACS LysingSolution® - BD, para otimizar a posterior análise de leucócitos. Após 15 minutos de incubação, a amostra foi centrifugada a 300g por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 500uL de PBS (0,015M pH 7,4) e o processo de lavagem é repetido. Ao final, acrescentou-se 300uL de PBS para ressuspender as células e

procedeu-se à leitura em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur® (BD), constituído de 4 detectores de fluorescência. Controles isotípicos apropriados são utilizados.

Os marcadores de superfície celulares avaliados foram:

4.2.1. Monócitos

- Monócitos Clássicos CD45⁺/CD14⁺/CD16⁻
- Monócitos Não Clássicos (Pró-inflamatórios)
CD45⁺/CD14⁺/CD16⁺

4.2.2. Células Natural Killers

- CD45⁺PerCP/CD3⁻FITC/CD16⁺APC/CD56⁺PE

4.2.3. Células Dendríticas

- Lineage Cocktail (CD3/CD14/CD16/CD19/CD20/CD56)FITC
- HLA-DR-PerCP
- CD123-PE
- CD11c-APC
 - Dendríticas plasmocitóides (pDC) Cocktail⁻/HLA-DR⁺/CD123⁺/CD11c⁻
 - Dendríticas mielóides (mDC) Cocktail⁻/HLA-DR⁺/CD123⁻/CD11c⁺

A aquisição e análise dos dados foram realizadas no programa CellQuest™, empregando-se diferentes estratégias de análises.

4. 3. Imunofenotipagens

4.3.1. Imunofenotipagem de Células Dendríticas

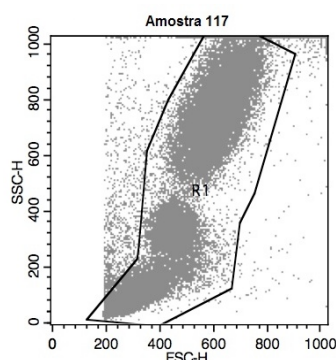
Para determinação de subclasses de células dendríticas (DCs) em sangue periférico, caracterizando células dendríticas plasmocitóides (pDC) e mielóides (mDC), dois marcadores específicos foram utilizados: CD123 (Anti-IL-3Ra) e CD11c respectivamente. Ambas populações de DCs expressam altos níveis de HLA-DR e

baixos níveis de marcadores de outras linhagens celulares expressos em monócitos, linfócitos e células NK. Os marcadores de linhagem específicos são marcados com um único fluorocromo, sendo denominado *cocktail* de linhagem, o qual contém CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56, marcados com fluorocromo FITC. Além disso, o ensaio permite identificação de basófilos que são negativos para o cocktail de linhagem e expressam níveis similares de CD123 como a subclasse de DCs plasmocitóide (CD123), mas podem ser distintos por sua falta de expressão de HLA-DR.

Foi realizado ensaio de quatro cores com os anticorpos monoclonais: *LineageCocktail* 1 (Lin 1) - FITC com os marcadores: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, e CD56. Anti-CD123-PE, Anti-CD11c-APC e Anti-HLA-DR-PerCP.

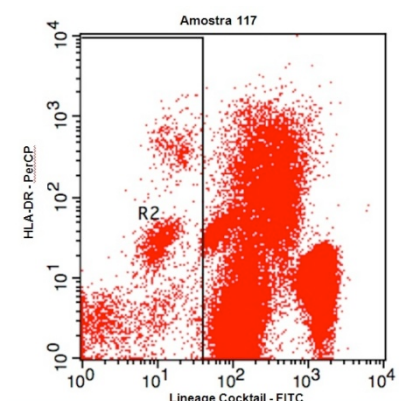
Para aquisição, inicialmente foi feito gráfico do tipo *dotplot* dos parâmetros tamanho celular *versus* granulosidade (*forwardscatter-FSC x sidescatter-SSC*), com *gate* denominado R1 na região de leucócitos totais, excluindo debris (restos celulares, hemácias, plaquetas, etc.) (Figura 6).

Figura 6: *DotPlot* tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) com gate R1 selecionando toda população de leucócitos, excluindo debris.



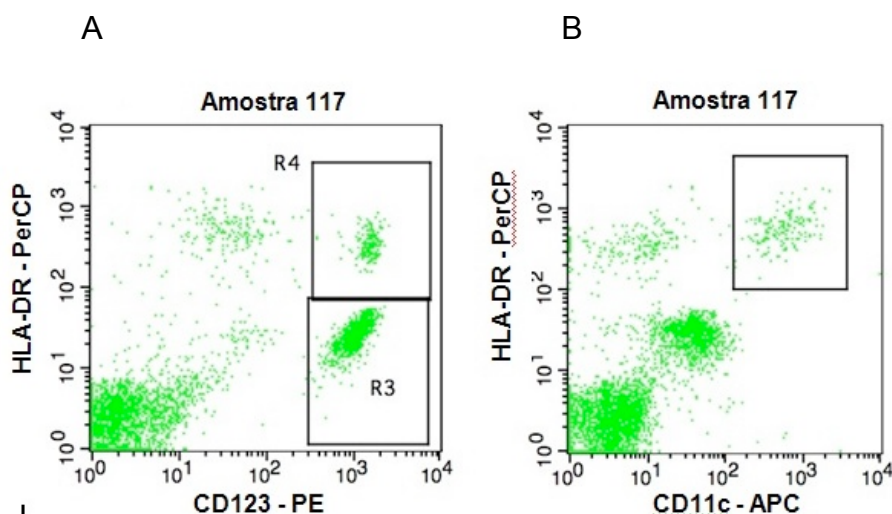
Em relação ao gate R1, um segundo dotplot foi feito correlacionando os marcadores Anti-HLA-DR (PerCP) e *LineageCocktail* (FITC). Dot Plot (*LineageCocktail*) FITC x (Anti-HLA-DR) PerCP. Desenhou-se Gate R2 que seleciona população HLA-DR+ e *LineageCocktail* dim ou negativa, de modo a excluir outras linhagens celulares (linfócitos, monócitos e células NK), positivas para *LineageCocktail*-FITC. (Figura 7)

Figura 7: Ensaio de quatro cores em sangue total. Região R2 inclui HLA-DR⁺ e LineageCocktail^{dim} ou negativo.



Em seguida, outros dois dotplots foram criados. Sendo os eventos oriundos do gate R2. (Figura 8).

Figura 8: Ensaio de 4 cores com sangue total. Região R3 define basófilos, R4 define DCs CD123⁺ e R5 define CD11c⁺.



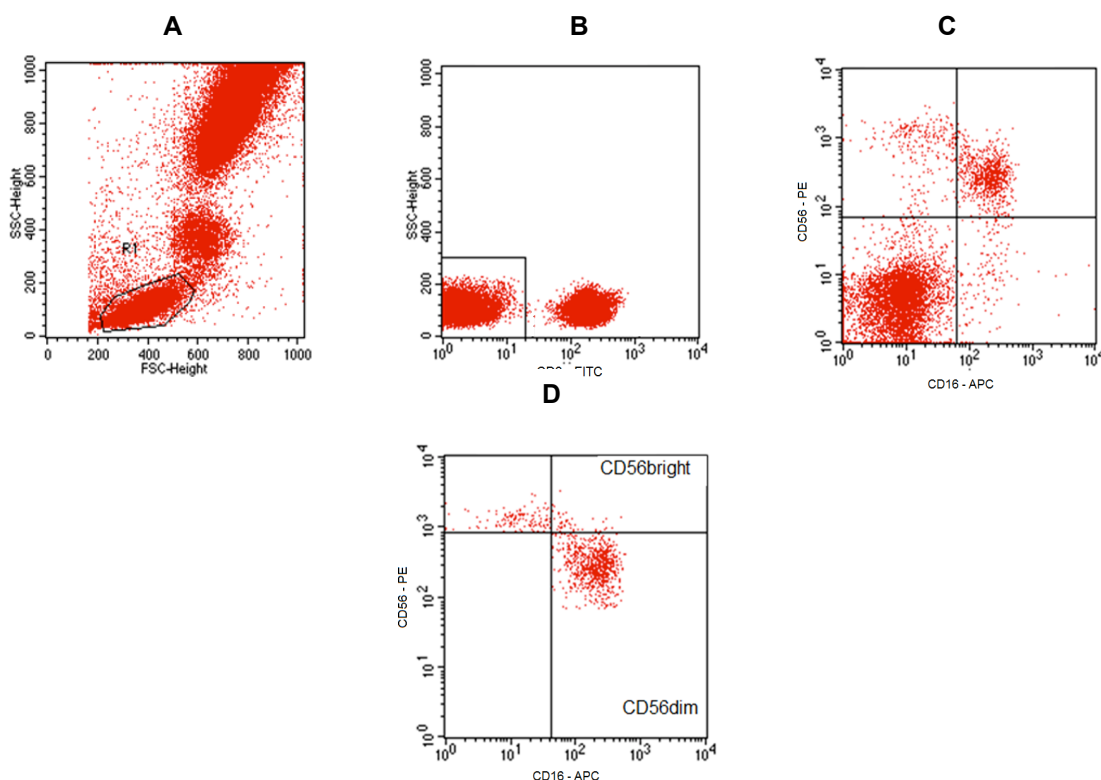
Dois dot plots criados para aquisição das DCs mielóides e plasmocitóides. A) Anti-HLA-DR (PerCP) x CD123 (PE), gate R4 na região duplo positiva caracterizando DCs plasmocitóides. B) Anti-HLA-DR (PerCP) x CD11c (APC), R5 em HLA-DR⁺/CD11c⁺ caracterizando DCs mielóides. Um quinto dot plot foi feito usando CD123 (PerCP) e CD11c (APC), através de um *gate* lógico R6, cuja fórmula foi G6 = NOT R3 AND R1

AND R2 AND (R4 OR R5), permitindo selecionar apenas as populações de DCs de interesse, dentro dos *gates* R4 e/ou R5 excluindo as demais populações dos outros *gates*. É importante ressaltar que o *gate* R3 foi feito no dotplot Anti-HLA-DR x CD123 para excluir a população de basófilos que expressa altos níveis de CD123. Foram adquiridos 50.000 eventos em R1 para cada amostra.

4.3.2. Imunofenotipagens de células NK

A tela de aquisição foi desenhada para permitir a separação das subpopulações de células NK, baseadas na expressão de CD56 (*dim* - baixa expressão e *bright* - alta expressão), perfazendo as subpopulações CD16⁺/CD56⁺, CD16⁺/CD56⁺⁺ e CD16⁻/CD56⁺⁺. O número total de eventos adquiridos foi 30.000. Os dot plots sequenciais estão representados abaixo: (Figura 9)

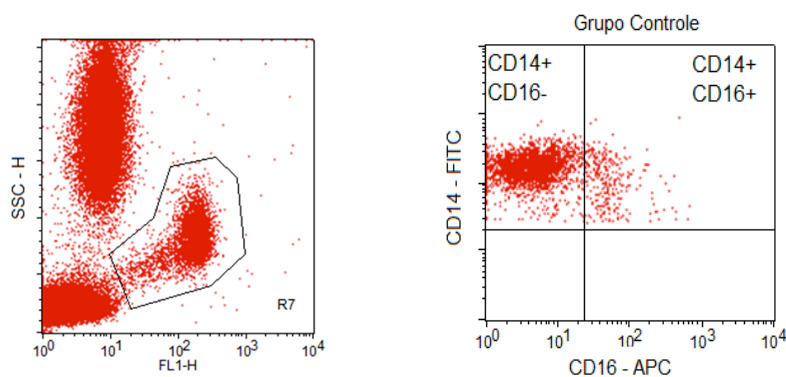
Figura 9: Estratégia de *gates* para seleção de subpopulações de células NK: **A)** Seleção de linfócitos totais (FSCxSSC); **B)** Isolamento de linfócitos CD3⁺; **C)** Identificação de células NK totais (CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺); **D)** Subpopulações de NK (CD3⁺/CD16⁺/CD56^{bright}; CD3⁺/CD16⁺/CD56^{dim}).



4.3.3. Imunofenotipagens de monócitos

Para separação de monócitos dos demais leucócitos utilizou-se um marcador de linhagem monocítica anti-CD14 (FITC) x granulosidade (SSC). Sequencialmente, avaliou-se a coexpressão de CD14⁺/CD16⁺, para verificação da frequência de monócitos clássicos e pro-inflamatórios. Para adequada identificação das subpopulações foi padronizada aquisição de 50.000 eventos no total de células. (Figura 10)

Figura 10: Estratégias de aquisição e análises de monócitos utilizando anticorpos monoclonais anti-CD14 (FITC) e anti-CD16 (APC).



5. Dosagens de citocinas e quimiocinas pelo método de CBA (*Cytometric Bead Array*[®])

As quantificações de quimiocinas e citocinas foram realizadas com uso dos kits *CBA Human Chemokine Kit* (CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES) e *CBA Single Plex Enhanced Sensitivity* TGF- β , TNF- α , CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP-1 β , seguindo as instruções do fabricante.

Neste ensaio cada uma das *beads* fluorescentes é conjugada a um anticorpo específico (exemplo: anti-quimiocina CXCL10) e a detecção de ligação entre anticorpo e proteína de interesse é feita por anticorpos de detecção conjugados com fluorocromos PE (fluorescência distinta das *beads*), fornecendo um sinal de

fluorescência proporcional à quantidade da quimiocina presente na amostra, avaliados por citometria de fluxo. Ao final do ensaio as aquisições foram analisadas no software BD FCAArray[®].

6. Análise Estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software *GraphPadPrism*[®] versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância estabelecido para verificar a hipótese de nulidade foi de 5,0%. A comparação de duas variáveis independentes foi feita pelo teste U de Mann-Whitney, enquanto as análises de mais de duas variáveis independentes foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis.

6. Resultados e Discussão

Existem fatores que podem influenciar na progressão mais rápida da fibrose na hepatite C crônica, como o gênero (indivíduos do sexo masculino geralmente progridem mais rapidamente), idade no momento da infecção, consumo de álcool, coinfeção com HIV e VHB, diabetes *mellitus* e obesidade (SILVA, et al. 2012). A caracterização amostral dos grupos foi realizada considerando as variáveis gênero e idade pré-tratamento dos sujeitos da pesquisa, visto que demais fatores foram critérios de exclusão neste estudo (exceto diabetes e obesidade, não avaliados).

O perfil demográfico dos grupos de estudo estão sumarizados na tabela abaixo. (Tabela 1)

Tabela 1: Caracterização qualitativa da amostra

Variável	G1 (F0+F1) (n=15)	G2 (F2) (n=21)	G3 (F3) (n=15)	G4 (F4) (n=32)	G5 (Controle) (n=16)
Idade	45 (30; 64)	49 (32; 64)	48 (31; 61)	52 (38, 71)	31,5 (23; 52)
Sexo	71%	54%	82%	71%	60%
Masculino					

Quanto à frequência de subpopulações de leucócitos periféricos em portadores de hepatite C crônica comparados ao grupo controle (indivíduos sadios) e relação com grau de fibrose;

De modo geral, foram observados perfis de frequência celular periférica distintas entre os pacientes VHC⁺ quando comparados com indivíduos saudáveis e, em alguns casos, entre os grupos de doentes estratificados de acordo com o grau de fibrose. A tabela 2 (abaixo) sumariza os dados da análise estatística descritiva (mediana, valores mínimo e máximo) de cada subpopulação celular avaliada, estratificadas nos grupos de estudo.

Tabela 2: Frequência das subpopulações celulares periféricas e níveis de transaminases (mediana, valores mínimo e máximo) distribuídas nos grupos.

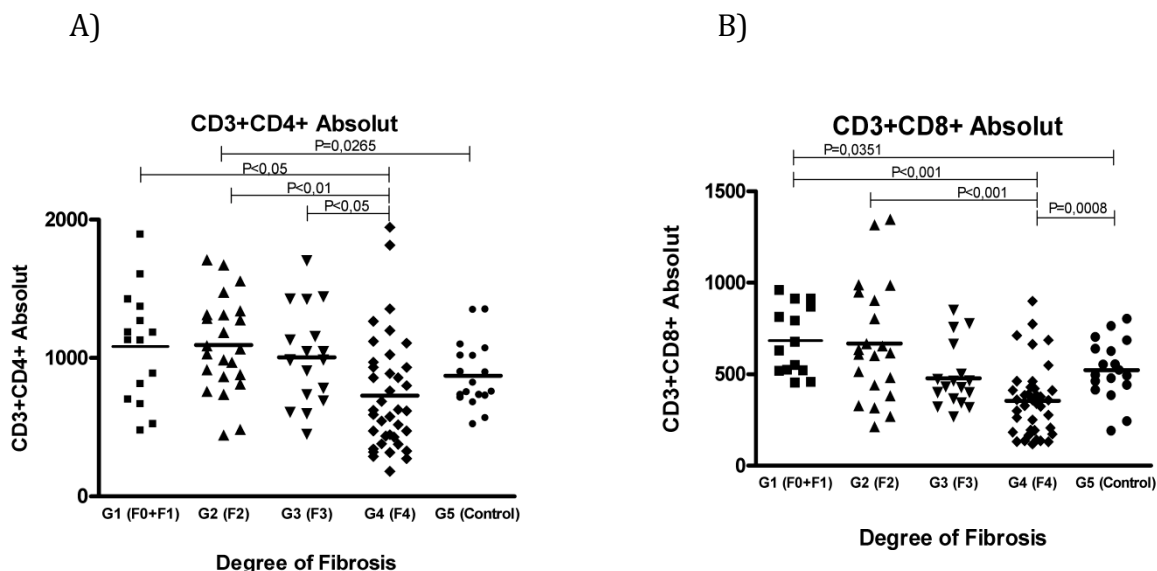
Subpopulações Celulares	G1 (F0+F1)	G2 (F2)	G3 (F3)	G4 (F4)	G5 (Controle)
Linfócitos T Totais (CD3+)	n=15 1847 (965; 3683)	n = 23 1819 (915; 3734)	n = 18 1465 (832; 2625)	n = 38 1092 (315; 2783)	n = 18 1389 (947; 2236)
Linfócitos T auxiliares (CD3+CD4+)	n = 15 1129 (476; 1893)	n = 23 1066 (443; 1710)	n = 18 986 (449; 1704)	n = 38 619 (180; 1945)	n = 18 788 (520; 1351)
Linfócitos T citotóxicos (CD3+CD8+)	n = 15 650 (452; 958)	n = 23 617 (213; 1347)	n = 18 429 (267; 850)	n = 38 349 (118; 899)	n = 18 506 (188; 800)
Relação CD4+/CD8+	n = 15 1,42 (1,0; 2,5)	n = 23 1,49 (0,8; 3,5)	n = 18 2,07 (1,2; 4,4)	n = 38 2,10 (0,9; 4,2)	n = 18 1,59 (1,1; 4,0)
Monócitos Clássicos (CD14+/CD16-)	n = 14 85,72 (69,0;91,2)	n = 22 84,48 (78,1;95,2)	n = 16 87,49 (75,5;91,0)	n = 33 87,61 (79,9;99,5)	n = 10 91,04 (88,3;95,9)
Monócitos Próinflamatórios (CD14+/CD16+)	n = 14 14,27 (8,8;31,0)	n = 22 15,73 (4,8;21,9)	n = 16 12,50 (8,9;24,5)	n = 33 12,39 (0,4;20,0)	n = 10 8,96 (4,1;11,8)
Monócitos Totais	n = 14 7,01 (4,6;10,9)	n = 22 7,13 (3,7;14,9)	n = 16 6,74 (0,9;10,3)	n = 33 7,69 (2,6; 15,9)	n = 10 5,64 (4,9;9,0)
Células NK Bright (CD56 ^{bright} /CD16)	n = 14 6,35 (3,0;14,6)	n = 22 5,86 (1,0;25,9)	n = 17 9,05 (0,0;25,6)	n = 29 12,59 (5,2;45,3)	n = 18 5,39 (1,9;11,0)
Células NK Dim (CD56 ^{dim} /CD16)	n = 14 93,17 (76,7;97,0)	n = 22 94,13 (74,0;98,9)	n = 17 89,57 (74,3;98,8)	n = 29 87,90 (12,4;97,6)	n = 18 93,83 (63,2;98,0)
Células NK Totais	n = 14 26,45 (4,9;45,8)	n = 22 29,53 (8,3; 51,1)	n = 17 19,82 (0,0;42,6)	n = 29 19,61 (0,5;52,4)	n = 18 32,13 (3,2;61,3)
Células Dendríticas mielóides (CD11c+)	n = 9 78,02 (65,1;96,8)	n = 15 72,54 (42,4;84,5)	n = 16 77,41 (48,4;87,6)	n = 23 70,52 (50,9;81,7)	n = 16 64,56 (50,5;71,3)
Células Dendríticas plasmocitóides (CD123+)	n = 9 22,69 (3,2;47,9)	n = 15 26,61 (14,6;41,7)	n = 16 22,58 (5,9;52,8)	n = 23 26,57 (9,8;42,6)	n = 16 34,08 (28,8;47,3)
Relação mDC:pDC	n = 9 3,25 (1,1;6,7)	n = 15 2,63 (1,4;4,2)	n = 16 3,18 (0,9;8,6)	n = 23 2,95 (1,3;9,1)	n = 16 1,83 (1,0;2,5)
Nível de AST	n = 14 38,0 (23,0; 101,0)	n = 17 40,0 (30,0; 164,0)	n = 14 72,0 (38,0; 200,0)	n = 29 91,0 (21,0; 408,0)	n = 17 34,0 (9,0; 85,0)
Nível de ALT	n= 14 57,5 (26,0;106,0)	n = 17 80,5 (23,0;163,0)	n = 14 83,0 (50,0; 231,0)	n = 29 99,5 (17,0;216,0)	n = 17 28,0 (8,0; 66,0)

6.1. Linfócitos T CD4/CD8

Os linfócitos T CD4/CD8 estão intimamente ligados à infecção crônica pelo VHC. Essas células podem atuar em múltiplos caminhos e são peças fundamentais na iniciação e manutenção da imunidade adaptativa.

Em nossos achados, observou-se diminuição da frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 periféricos com o avanço da lesão hepática, havendo assim, correlação invertida entre níveis destas células e o grau de fibrose nos grupos de pacientes (Figura 11).

Figura 11: Frequência (valores absolutos) de subpopulações de linfócitos T periféricos nos grupos. **A)** Linfócitos T auxiliares ($CD3^+/CD4^+$); **B)** Linfócitos T citotóxicos ($CD3^+/CD8^+$). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$



Essas diferenças foram observadas inclusive entre os diferentes graus de fibrose, o que aponta essas populações celulares como possíveis contribuintes à avaliação imunológica de pacientes VHC⁺, que, de maneira semelhante à infecção pelo HIV, parecem apresentar declínio com o avanço da fibrose hepática. Esses resultados vão de encontro com Rashkin e colaboradores que reportaram que pacientes com HIV a diminuição das células T CD4⁺ está envolvida com a disfunção do sistema imune e consequentemente com a progressão da doença, e na infecção pelo VHC com a progressão da doença hepática.

Semmo et. al. (2007) em seus estudos verificaram que no sangue periférico de pacientes crônicos do vírus C células T CD4⁺ encontram-se diminuídas. Numa avaliação comparando-se pacientes VHC *versus* saudáveis, estas observações podem ser confirmadas, no entanto, quanto estratificam-se os pacientes de acordo com o grau de fibrose, observamos que em pacientes com grau mais leve de fibrose (G1 e G2) linfócitos T CD4⁺ estão aumentados e em pacientes com estágios mais severos de fibrose (especialmente G4), apresentam-se diminuídos.

Estudos realizados com pacientes HIV reportaram que a contagem de células T CD4⁺ demonstraram ser importante na disfunção imune e na progressão da doença. (RASHKIN et. al., 2009).

Há evidências que células T CD4⁺ e CD8⁺ VHC-específicas desempenham um papel importante controle da replicação viral e na injúria hepática. (THIMME et. al., 2006).

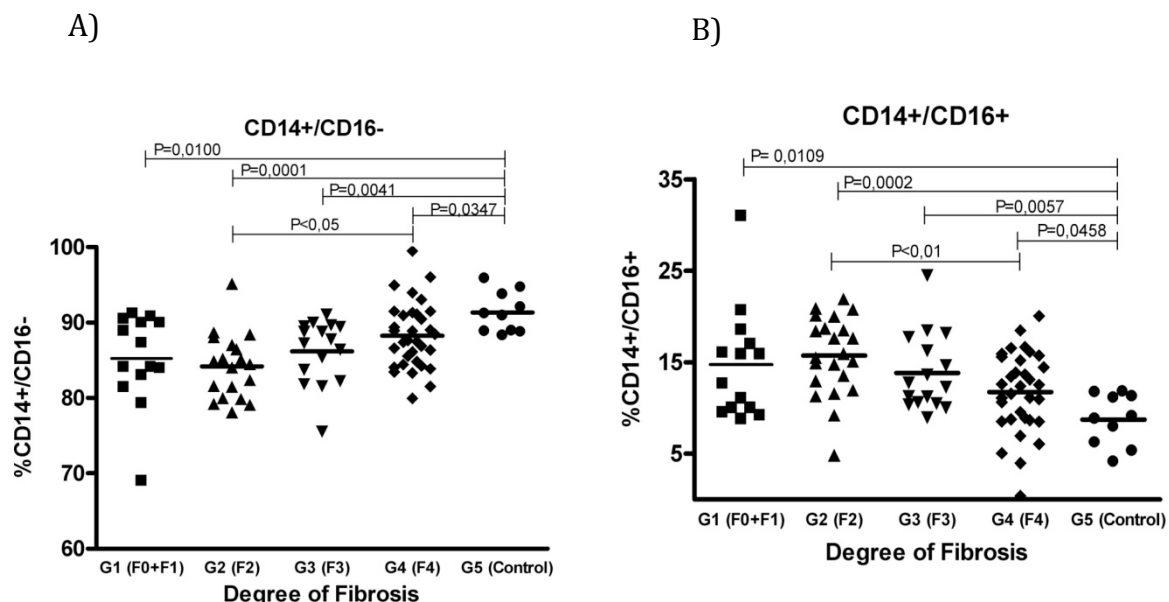
Segundo Spaan et. al. (2012) na fase crônica da infecção pelo VHC células T CD4 e CD8 são encontradas em frequência mais baixa tanto no sangue quanto no fígado. A baixa contagem de CD4 está associada com a fibrose hepática tanto em pacientes coinfectados quanto em monoinfectados pelo VHC.

6.2. Monócitos

Foram observadas diferenças na frequência de subpopulações de monócitos circulantes nos pacientes VHC⁺ quando comparados com indivíduos saudáveis e intergrupos de pacientes.

A população de monócitos clássicos (CD14⁺/CD16⁻) encontra-se diminuída em todos os grupos em relação ao grupo controle, porém demonstra tendência a aumentar de acordo com maior grau de lesão hepática (Figura 12A).

Figura 12: Frequência das subpopulações de monócitos nos grupos. **A)** Monócitos Clássicos $CD14^+/CD16^-$; **B)** Monócitos Pró-inflamatórios ($CD14^+/CD16^+$). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.



As análises demonstraram que monócitos pró-inflamatórios estão aumentados em pacientes VHC comparados ao grupo controle, porém com relação invertida entre o percentual destas células e o grau de fibrose (Figura 10B). Tal subpopulação $CD14^+CD16^+$ perfaz cerca 10% de monócitos totais em indivíduos saudáveis (BELGE, 2002; SÁNCHEZ-TORRES, 2001). Níveis aumentados destas células tem sido relatado em uma série de doenças inflamatórias e infecciosas no homem como hepatite B, hepatite C, HIV e dengue, sugerindo um papel importante para monócitos $CD14^+CD16^+$ em tais processos (SÁNCHEZ-TORRES, 2001; ZIEGLER-HEITBROCK, 2007; WONG et. at., 2012).

Segundo Wong et al. (2012) ocorre aumento de monócitos pró-inflamatórios em pacientes VHC crônicos assim como já observado na infecção pelo vírus B (VHB). No entanto, segundo os autores, o VHC pode infectar monócitos $CD14^+/CD16^+$, mas não monócitos $CD14^+/CD16^-$. A preferência por esta subpopulação pode ser atribuída ao marcador CD81, molécula que o vírus VHC utiliza para entrar na célula, a qual está

presente em maior quantidade na superfície celular destes monócitos. Zimmerman et al. (2011) relatam que monócitos intra-hepáticos não clássicos, em contraste com a subpopulação clássica, estão criticamente envolvidos na progressão da fibrose hepática em seres humanos, por produzir citocina pró-inflamatória no microambiente hepático ativando diretamente células estreladas hepáticas produtoras de colágeno, agravando a fibrogênese. Deste modo, podemos sugerir que esta subpopulação CD14⁺/CD16⁺ atue como sítio extrahepático de replicação viral, embasando-se em diversos estudos que sugerem que diferentes subpopulações de leucócitos no sangue periférico de pacientes com infecção crônica pelo VHC parecem representar um reservatório extrahepático do HCV, assim como ocorre com DCs (LAPORTE et al., 2003; GOUTAGNY et al., 2003; TSUBOUCHI et al., 2004; LAI et al., 2007).

6.3. Células NK

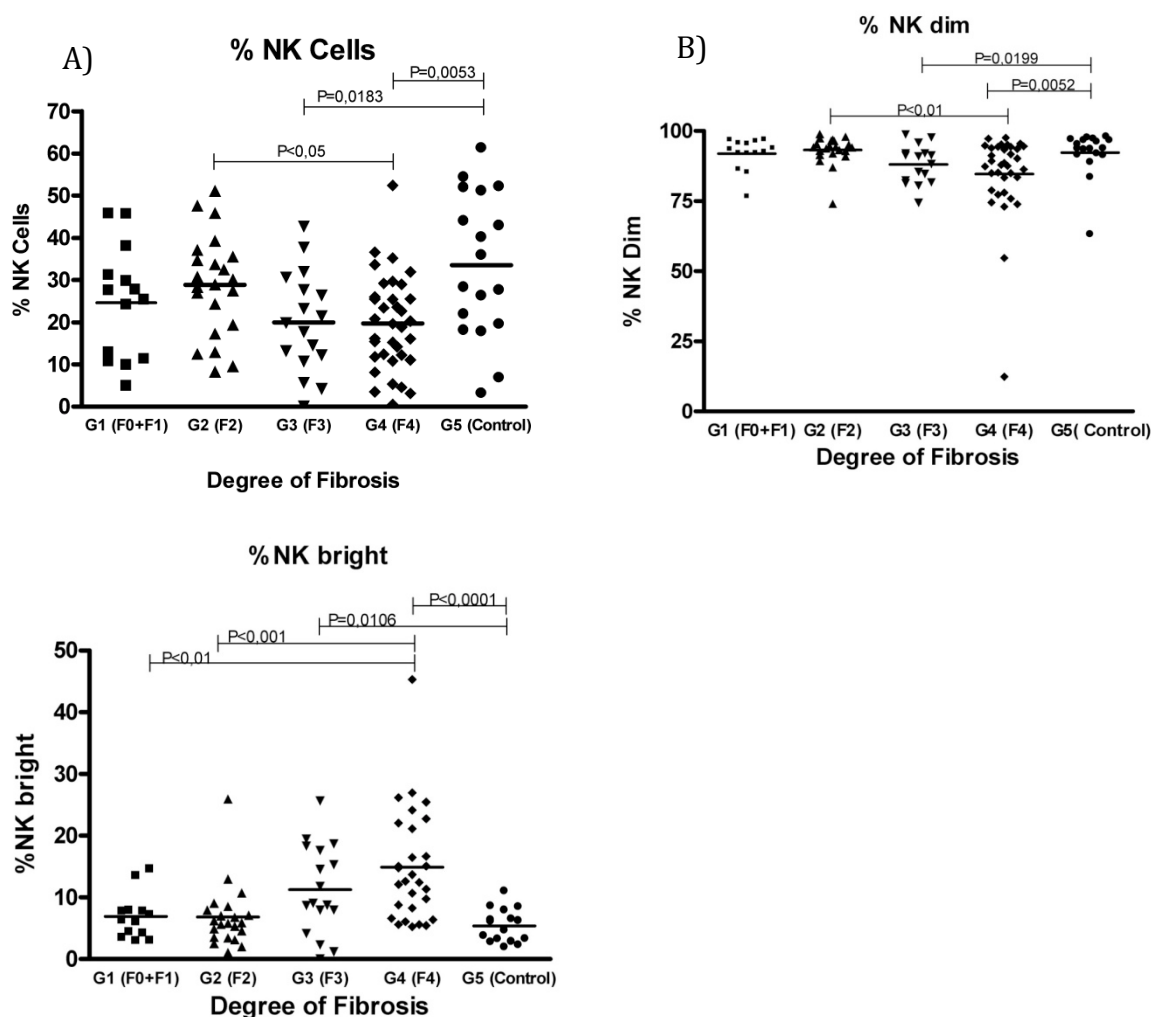
Células NK totais apresentaram-se diminuídas em relação ao grupo controle, sendo a diminuição mais evidente nos grupos com maior severidade de lesão (G3 e G4), conforme figura 13A. Estes resultados estão de acordo com Yoshida e colaboradores (2011) que verificaram que células NK periféricas foram diminuídas em pacientes VHC e inversamente proporcionais com a progressão da fibrose hepática.

Gao & Radaeva recentemente reportaram que células NK derivadas do sangue e células NK residentes nas mucosas dos tecidos produzem a citocina IL-22, importante na proteção contra injúria hepática e inibição da fibrose. Não achamos relatos sobre o nível desta citocina em pacientes com diferentes graus de fibrose, mas esta informação vem contribuir com nossos achados, visto que em pacientes com menor lesão (G1 e G2) observamos os percentuais mais elevados de células NK.

Células NK^{dim} apresentaram-se de forma semelhante ao grupo controle nos grupos com menor lesão hepática, porém as mesmas tendem a diminuir conforme o avanço de lesão hepática. (Figura 13B)

Células NK^{bright} apresentaram-se aumentadas em todos os grupos avaliados, sendo este aumento diretamente proporcional à severidade da lesão hepática, havendo maior relevância nos grupos G3 e G4 (Figura 13C).

Figura 13: Frequência das subpopulações de células NK nos grupos. **A)** Células NK^{dim}; **B)** Células NK^{bright}; **C)** NK total. Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.



Nossos achados estão de acordo com os trabalhos de Xu e colaboradores (2011) e Notas (2009) mostrando que a atividade citolítica (NK^{dim}) tem associação inversa com o estágio da fibrose hepática, sugerindo que a presença destas células proteja contra progressão da doença. Contrariamente, o aumento de NK^{bright}, está diretamente relacionada a progressão da fibrose.

Gonzales et. al. (2004) observaram resultados semelhantes aos nossos, com aumento de células NK^{bright} em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite

C em relação a indivíduos saudáveis. Além disso, quando estratificamos os pacientes segundo o grau de fibrose, observamos a correlação positiva, sugerindo ser relevante a avaliação desta subpopulação celular os pacientes VHC.

Na infecção crônica pelo VHC ocorre alteração da diferenciação das células NK. A população NK^{bright} é expandida e consequentemente o perfil de citocinas Th2, tanto na periferia como dentro do fígado, levando à falha de maturação da subpopulação NK^{dim}. A estimulação crônica por receptores de ativação e citocinas intra-hepáticas pode também causar diferenciação acelerada de NK^{dim}, gerando uma subpopulação com defeito funcional CD56⁻/CD16⁺, a qual é também expandida. Esses processos levam à redução da frequência de células funcionalmente maduras, CD56^{dim}/CD16⁺ citotóxica, e aumento relativo de células CD56^{bright}/CD16⁻ (CHEENT; KHAKOO, 2011).

Gonzales e colaboradores (2004) verificaram que pacientes tratados com interferon-peguilado (PEG-IFN) e ribavirina tendem a aumentar o número de células NK^{bright} e diminuir células NK^{dim}. Estes dados sugerem que o perfil de células NK que encontramos em pacientes VHC⁺ pré-tratamento deve manter-se durante do tratamento, fato que pretendemos confirmar em estudos posteriores, em pacientes submetidos a diferentes terapias.

6.4. Células Dendríticas

Observou-se aumento das células dendríticas mielóides e diminuição das pDCs com relação ao grupo controle, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de fibrose (Figura 14).

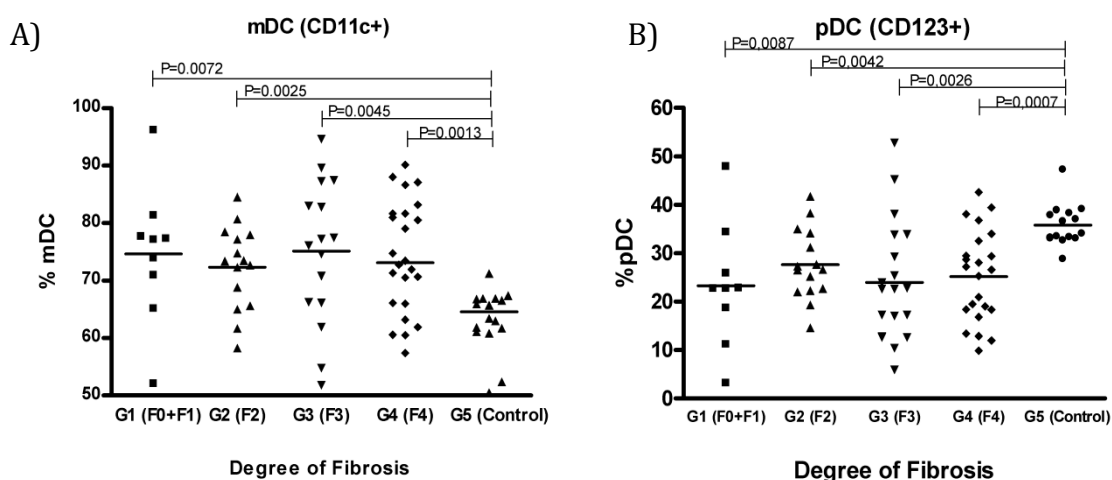


Figura 14: Frequência de subpopulações de células dendríticas nos grupos. **A)** mDC (CD11c⁺); **B)** pDC (CD123⁺). Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Diferentemente de nossos resultados, Losikoff et. al. (2012) relataram ambas subpopulações de DCs, mDCs e pDCs, estão reduzidas no sangue periférico em pacientes infectados com hepatite C crônica. Observamos esta diminuição na subpopulação pDC, mas as células mDC estão significativamente aumentadas nos pacientes VHC, não diferindo em relação à fibrose.

Pacientes com hepatite C aguda exibem baixa frequência e prejudicada função aloestimulatória de mDCs e possuem alta chance de desenvolver a persistência viral, enquanto que alta prevalência de pDCs na circulação sanguínea durante a infecção aguda pode ser um preditor do sucesso do *clearance* viral (SZABO; DOLGANIUC, 2011).

Estudos têm demonstrado que na infecção pelo VHC as funções das DCs estão normais no início da infecção, mantendo o papel no desenvolvimento de resposta efetiva anti-VHC mediada por células T. No entanto, eles indicam que DCs podem ser sequestradas muito precocemente durante o curso da infecção aguda e estar limitadas após o estabelecimento da infecção (fase crônica) (SZABO; DOLGANIUC, 2011).

A ocorrência de infecção de DCs circulantes pelo VHC pode acarretar maiores consequências na progressão da doença (GOUTAGNY et al., 2003).

A relação mDC/pDC apresentou-se aumentada no sangue periférico. De acordo com a literatura, indivíduos saudáveis têm relação de mDC/pDC variando entre 1,5 a 4,0, estando nosso resultado condizente com estudos prévios (Figura 15). Embora haja aumento em todos os grupos de pacientes, este é mais relevante naqueles com maior lesão hepática (G3 e G4).

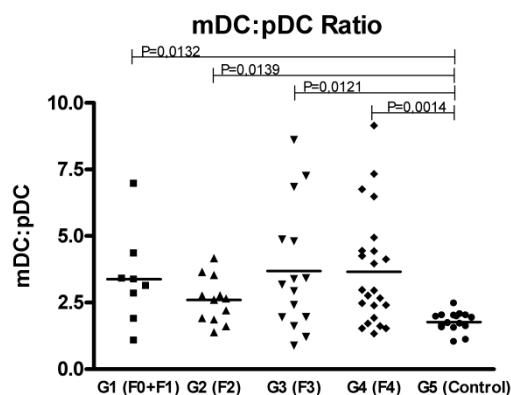


Figura 15: Relação mDC:pDC nos grupos. Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

A disfunção das DCs pode afetar potencialmente a imunidade adaptativa em pacientes com infecção por VHC persistente, prejudicando o estímulo para maturação das células T CD4+ e a capacidade de secretar IL-12, citocina importante na resposta T CD4+ (KANTO et al., 1999; AUFFERMANN-GRETZINGER et al., 2001; BAIN et al., 2001; KANTO et al., 2004; TSUBOUCHI et al., 2004).

Tsubouchi et al. (2004) analisaram a capacidade estimulatória de DCs circulantes de pacientes com hepatite C crônica, estando estas altamente prejudicadas quando comparadas aos grupos controle e de pacientes com doença no fígado crônica não-VHC. Esses achados podem contribuir para baixa resposta imune anti-VHC e a persistência viral, tipicamente observadas na infecção crônica pelo VHC.

Após uma injúria hepática DCs secretam muitas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e ganham marcante capacidade de induzir HSCs, NKs, e células T para mediar inflamação, proliferação e produção de potente resposta imune. Esses achados apontam uma interessante potencialidade no aspecto de ativação de células imunes pró-fibrogênicas (ALLOMAN; TACKE, 2010).

Verificou-se que as enzimas hepáticas encontram-se aumentadas em pacientes infectados cronicamente pelo vírus C.

Os níveis do grupo controle estão dentro dos valores normais adotados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Em nossos achados verificamos correlação positiva entre os níveis de ALT/AST e a severidade de lesão hepática.

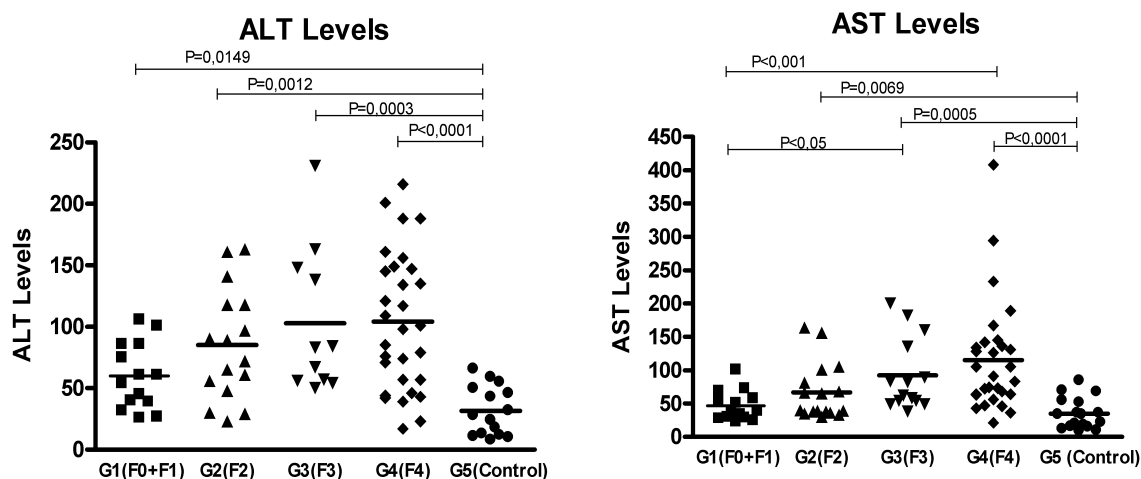


Figura: Perfil das enzimas ALT e AST em pacientes VHC crônicos e indivíduos saudáveis.

Embora as dosagens das transaminases hepáticas sejam úteis às avaliações de dano hepático, tem sido reportado na literatura situações em que estas não contribuem por não refletirem a real evolução da fibrose.

Segundo Calleja et al., 2012, aproximadamente 25% dos pacientes VHC crônicos tem persistência de atividade normal de ALT, e 20 – 30% destes progridem para fibrose ou carcinoma hepatocelular.

Konerman e colaboradores (2013) em seus estudos verificaram que níveis elevados de ALT e AST no soro estão correlacionados com a progressão da fibrose. Afirmaram também que altos níveis de AST foram associados com uso abusivo de álcool.

Os níveis de ALT foram positivamente associados aos níveis de IFN- γ , IL-8, MCP-1 e IP-10. (FARCI et al., 2012).

Quanto à dosagem de citocinas/quimiocinas plasmáticas e avaliação de associação destas com o grau de lesão hepática dos pacientes VHC⁺.

O perfil de citocinas e quimiocinas avaliado no trabalho está sumarizado na Tabela 4, que inclui número de indivíduos por grupo, mediana, valor mínimo e valor máximo.

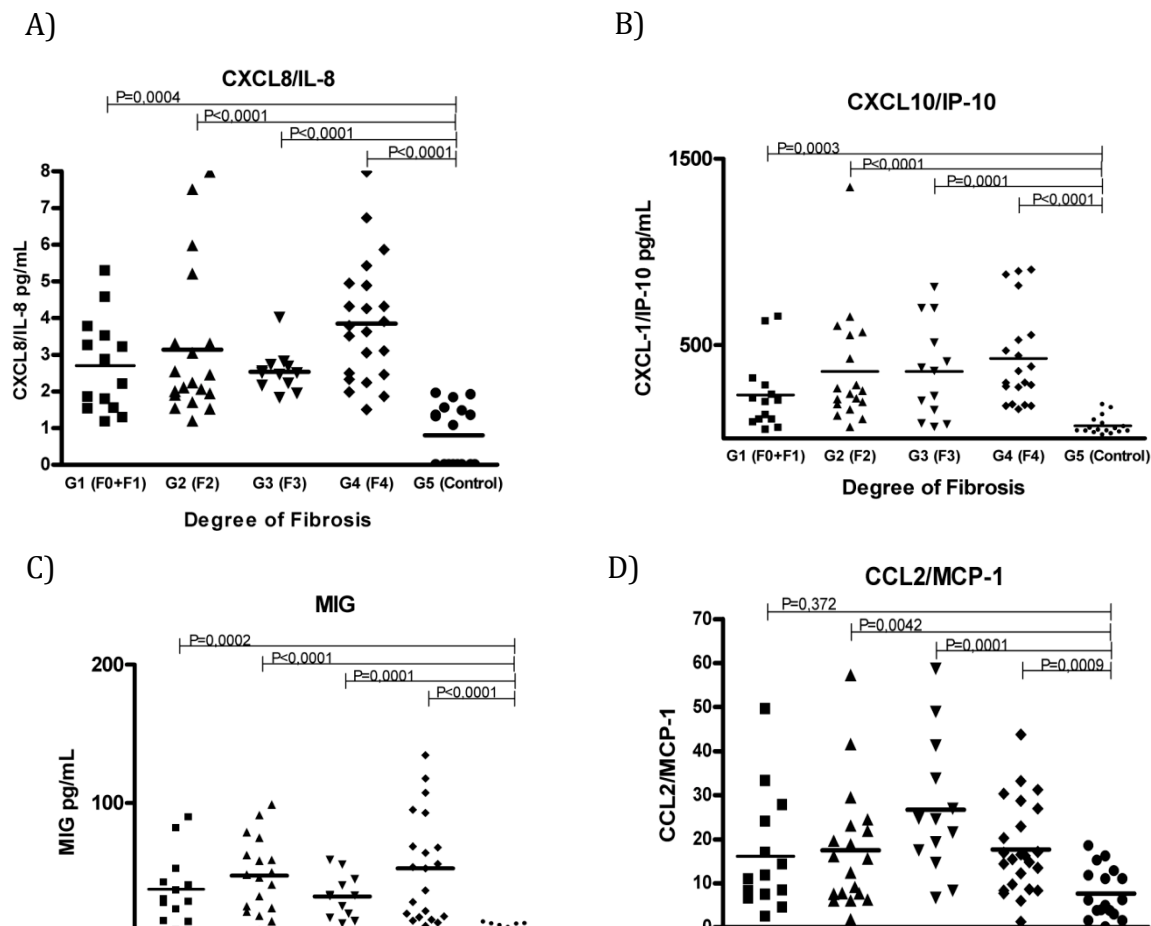
Tabela 4: Dosagens de citocinas e quimiocinas plasmáticas (mediana, valores mínimo e máximo) distribuídas nos grupos.

Citocina/ Quimiocina	G1 (F0+F1)	G2 (F2)	G3 (F3)	G4 (F4)	G5 (Controle)
CXCL9 /MIG	n = 14 30,3 (7,7; 89,7)	n = 19 47,1 (7,8; 98,9)	n = 17 32,8 (12,9; 58,9)	n = 22 52,7 (11,1; 134,5)	n = 16 7,3 (3,0; 13,9)
CXCL10/ IP-10	n = 14 198,8 (46,8; 653,3)	n = 19 247,5 (61,3; 1348,4)	n = 17 361,6 (61,8; 811,4)	n = 22 330,3 (157,1; 905,6)	n = 16 44,8 (18,1; 181,0)
CXCL8/ IL-8	n = 14 2,7 (1,2; 5,3)	n = 19 3,1 (1,2; 7,9)	n = 17 2,5 (1,8; 4,0)	n = 22 4,1 (1,5; 7,9)	n = 16 1,1 (0,0; 1,9)
CCL2/ MCP-1	n = 14 11,3	n = 19 15,6	n = 17 24,5	n = 22 15,9	n = 16 6,0

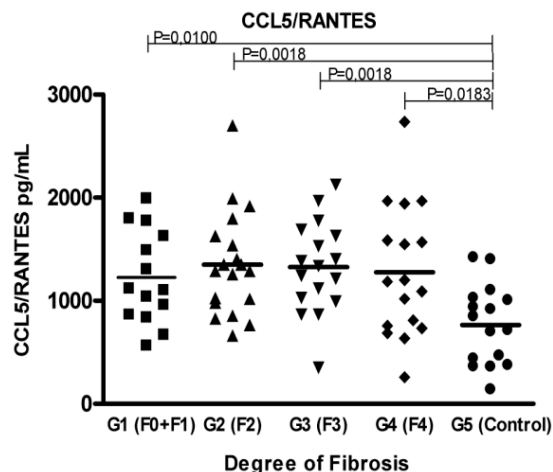
	(2,4; 49,5)	(1,8; 57,3)	(6,7; 58,7)	(1,3; 43,7)	(0,0; 18,4)
CCL5/ RANTES	n = 14 1111,3 (565,9; 1993,7)	n = 19 1289,4 (664,7; 2700,6)	n = 17 1336,9 (350,3; 2127,1)	n = 22 1185,8 (259,9; 2737,4)	n = 16 782,6 (142,2; 1420,8)
TNF- α	n = 14 0,0 (0,0; 384,6)	n = 17 0,0 (0,0; 419,5)	n = 12 0,0 (0,0; 202,2)	n = 21 38,2 (0,0; 581,3)	n = 14 0,0 (0,0; 29,3)
TGF- β	n = 14 736,3 (539,9; 1930,1)	n = 21 1207,3 (233,1; 6176,4)	n = 19 1723,1 (522,8; 4255,4)	n = 23 1104,4 (454,6; 3245,9)	n = 14 480,2 (153,8; 2638,7)
MIP 1- α	n = 13 2,5 (0,0; 8,9)	n = 18 2,6 (0,0; 19,3)	n = 19 3,8 (0,0; 19,3)	n = 21 2,3 (0,0; 16,6)	n = 14 0,7 (0,0; 3,7)

As quimiocinas dosadas com uso do kit *CBA Human Chemokine Kit*, que inclui CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES, apresentaram níveis plasmáticos elevados nos pacientes VHC⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis, conforme demonstrado na figura abaixo.

Figura 16: Níveis de quimiocinas plasmáticas nos grupos (pg/mL). A) CXCL9/MIG; B) CXCL10/IP-10; C) CXCL8/IL-8; D) CCL2/MPC-1; E) CCL5/RANTES.



E)



Observou-se elevada concentração de CXCL9/MIG em todos os grupos quando comparados ao grupo controle, sendo os níveis mais relevantes observados nos grupos G2 e G4 (Figura 16A).

Zeremski et. al. (2007) em seus estudos afirmaram que durante a hepatite C um maior número de células intrahepáticas expressa essa quimiocina, a qual está aumentada e correlacionada com maior grau de inflamação, corroborando com nossos resultados em sangue periférico.

Esses mesmos autores relatam que após terapia com IFN- α e ribavirina, níveis plasmáticos de CXCL9/MIG apresentaram-se diminuídos, comparando-se com indivíduos saudáveis.

A quimiocina CXCL10/IP-10 está aumentada no plasma dos pacientes VHC⁺ e diretamente correlacionada à severidade da lesão hepática (Figura 16B).

De acordo com dados da literatura esta quimiocina tem sido encontrada em níveis aumentados tanto no fígado quanto no soro de pacientes VHC comparados com saudáveis, contudo, quando estratificamos os pacientes VHC⁺ de acordo com o grau de fibrose, encontramos correlação positiva, indicando esta quimiocina como potencial biomarcador.

Está reportado que existe positiva correlação das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 com os diferentes graus de fibrose em dosagens intrahepáticas, indicando que a persistência da inflamação hepática, produzidas por células mononucleares atraídas

por essas quimiocinas, pode indicar a ativação da cascata que causa fibrose hepática. (Zeremski et. al., 2007; Larrubia et. al., 2008).

Zeremski e cols (2007) sugerem que essa quimiocina também pode ser um marcador de resposta positiva ao tratamento dos pacientes com interferon- α e ribavirina, pois após o tratamento seus níveis foram encontrados diminuídos.

Os níveis de CXCL8/IL-8 estão aumentados em todos os grupos de pacientes em relação ao controle, havendo crescimento ascendente conforme maior grau de lesão hepática, salvo no grupo G3, onde observa-se ligeira diminuição com relação a G2. No entanto, esta quimiocina tem os menores níveis plasmáticos (pg/mL) mensurados quando comparada às demais, de modo que esta diminuição entre G2 e G3 representa 0,6pg/mL somente (diferença entre as medianas). Possivelmente, numa análise envolvendo maior número de indivíduos essa diferença possa ser minimizada. (Figura 16C).

Esse achado corrobora com a literatura onde, em estágios mais avançados de fibrose (F3-F4) a concentração desta é maior que em estágios iniciais (F0-F2), contribuindo para um maior dano hepático. (KUSHNER et. al., 2013; WASMUTH et. al., 2013).

Níveis significativamente maiores de CXCL8 (IL-8) e CCL5 (RANTES) em pacientes VHC⁺ com grau moderado de inflamação hepática comparados àqueles de baixo grau de inflamação, também foram observados. (NEUMAN, et al., 2011).

A quimiocina CCL2/MCP-1 está aumentada em todos os grupos de pacientes, porém com maior concentração no grupo G3. (Figura 16D).

Estudos de Kushner e cols (2013), demonstraram que em indivíduos portadores VHC mono infectados não observou-se aumento de CCL2/MCP-1 no soro, mas sua concentração em indivíduos que obtiveram resposta virológica sustentada em relação a indivíduos não respondedores foi maior. Outra observação realizada por esse grupo foi em relação a indivíduos co-infectados com HIV que CCL2/MCP-1 apresentou-se aumentada.

Sendo assim, podemos associar nossos achados com dados de Kushner, visto que existe aumento dessa quimiocina em todos os grupos de pacientes em relação aos indivíduos saudáveis, porém com maior significância no grupo G3, possivelmente devido a constante inflamação periportal.

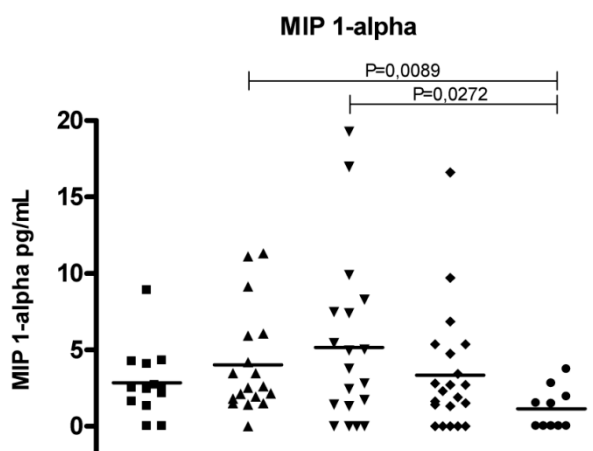
Constatamos que níveis de CCL5/RANTES estão elevados em todos os grupos de pacientes VHC quando comparados ao grupo controle, de acordo com dados da literatura. No entanto, não ocorrem mudanças intergrupos. Como esta quimiocina está envolvida tanto no processo inflamatório quanto na fibrogenese, este perfil pode ser justificável, sugerindo que esta quimiocina não seja um bom marcador para avaliar a progressão da fibrose, embora possa contribuir se associada com outros biomarcadores. (Figura 16E).

Zeremski et. al., 2007, avaliando pacientes com VHC, observaram que a expressão de RANTES intrahepática está aumentada em hepatócitos e células do epitélio biliar, afirmando que a atividade de RANTES está associada com o grau de inflamação hepática.

Neuman e cols (2011) encontraram níveis de RANTES, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12, TGF- β aumentados em soro de pacientes VHC, comparando estes com grupo controle.

Os níveis de MIP-1 α estão aumentados nos pacientes VHC dos grupos G2 e G3. No entanto, observa-se uma tendência ao aumento também nos grupos G1 e G4, embora sem valor estatístico (Figura 17).

Figura 17: Nível plasmático de MIP-1 α nos grupos avaliados.

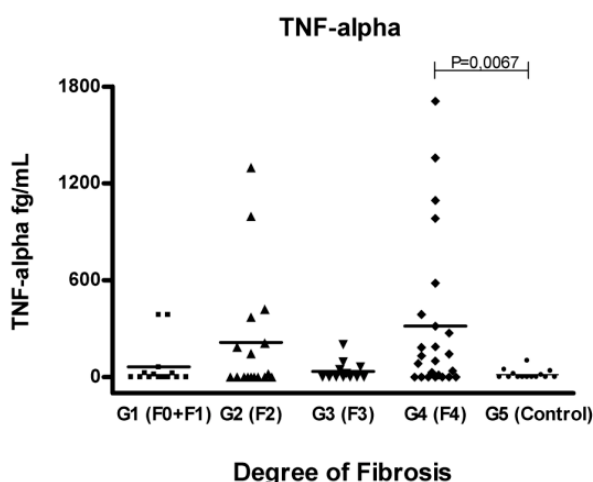


Nossos dados corroboram com os estudos de Zeremski e cols (2007), visto que também foi encontrado aumento de MIP-1 α no soro de pacientes infectados pelo VHC em todos os graus de lesão hepática.

Os resultados de MIP-1beta não estão demonstrados, pois ocorreram problemas técnicos na realização do ensaio de dosagem desta quimiocina e não havia material biológico suficiente para repetição.

Encontramos aumento de TNF- α nos grupos G2 e G4, mas somente entre G4 e G5 (controle) houve diferença significativa (Figura 18).

Figura 18: Nível plasmático de TNF- α nos grupos avaliados (fg/mL).



Na literatura há relatos que níveis de TNF- α encontram-se muito aumentados em pacientes VHC crônicos, especialmente pela atuação constante desta citocina desde o processo inflamatório precoce, sugerindo que a presença de altos níveis da citocina TNF- α reflita a severidade da doença em relação aos níveis inflamatórios. Embora tenhamos nos preocupado em utilizar kit de alta sensibilidade na detecção desta citocina, não obtivemos resultados semelhantes.

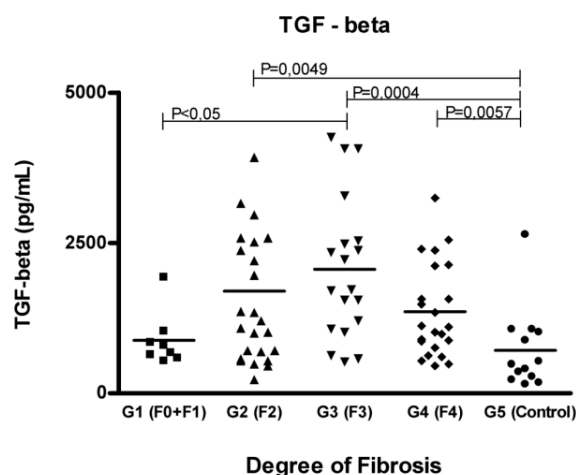
Neuman e colaboradores, avaliando níveis de citocinas em pacientes VHC com diferentes graus de lesão hepática, observaram correlação positiva entre o nível de TNF- α e o grau de inflamação, indicando a possibilidade do TNF- α atuar como um marcador para inflamação. (Neuman et. al., 2011).

Estudos prévios de Neuman e cols (2001), identificaram que TNF- α pode atuar caracterizando a severidade da doença e ser um preditor para resposta virológica sustentada de pacientes VHC crônicos.

Acreditamos que repetições das dosagens com adaptações metodológicas sejam necessárias, visto que esta é uma citocina que pode sofrer alterações com elevação de temperatura, condições de armazenamento, tempo de processamento.

Pacientes com hepatite C crônica têm níveis aumentados da citocina TGF- β , especialmente aqueles com lesão hepática moderada (G2 e G3), como pode ser observado na figura 19.

Figura 19: Nível plasmático de TGF- β nos grupos avaliados (pg/mL).



Nossos resultados estão alinhados com os resultados de Neuman e cols, que relataram altos níveis de TGF- β , significativamente maiores em pacientes com fibrose de grau leve a moderado (F2-F3), sugerindo importante papel desta citocina

principalmente em pacientes VHC em estágios iniciais da doença, antes da cirrose estabelecer-se (NEUMAN et al., 2012).

Em conjunto, os resultados sugerem que avaliações celulares e de proteínas de sinalização (como citocinas/quimiocinas) em associação com as transaminases, possam contribuir de modo considerável, aumentando a sensibilidade e especificidade dos resultados na avaliação do dano hepático.

7. Conclusão

De acordo com nossos resultados concluímos que:

- Frequências das subpopulações leucocitárias avaliadas estão alteradas em portadores de hepatite C crônica comparados com indivíduos saudáveis.
- Existe associação entre o grau de fibrose e as frequências das subpopulações de linfócitos T CD4, T CD8, monócitos proinflamatórios e células NK^{bright}.
- TNF- α está elevada em pacientes com cirrose (G4).
- O nível de TGF- β está aumentado em pacientes VHC+, especialmente naqueles com moderada fibrose hepática (G2 e G3);
- Dosagens das quimiocinas plasmáticas CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL8/IL-8, CCL2/MPC-1, CCL5/RANTES, MIP-1 α estão aumentadas em pacientes com hepatite C crônica comparados com indivíduos saudáveis;
- A quimiocina CXCL10/IP-10 tem correlação positiva com a severidade da lesão hepática.

8. Referências Bibliográficas

ABAYLI, B.; CANATAROGLU, A.; AKKIZ, H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C vírus infection. **Turk. J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 7-11, 2003.

AGRATI, C. et al. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection a main role for MHC unrestricted T cell. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warz)**, v. 50, p. 307-316, 2002.

AKIRA, S. Innate immunity and adjuvants. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 366, p. 2748-2755.

ALMEIDA, M. et al. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. **AIDS**, v. 19, p. 261-271, 2005.

ALOMAN, C.; FRIEDMAN, S. L.; MERAD, M. Dendritic cells in alcoholic liver injury and fibrosis. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 35, p. 776-781, 2011.

ALOMAN, C.; TACKE, F. Dendritic cells in liver fibrosis: conductor of the inflammatory orchestra? **Hepatology**, v. 51, p. 1070-1072, 2010.

ANTHONY, D. D. et al. Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. **J. Immunol.**, v. 172, p. 4907-4916, 2004.

AUFFERMANN-GRETZINGER, S.; KEEFFE, E. B.; LEVY, S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. **Blood**, v. 97, p. 3171-3176, 2001.

BAIN, C. et al. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, v. 120, p. 512-524, 2001.

BATTALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 209-218, 2005.

BLOIS, S. M. et al. Dendritic cells regulate angiogenesis associated with liver fibrogenesis. **Angio.** v. 17, p. 119-28, 2013.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, **Hepatites Virais**. Ministério da Saúde. 2012.

BOUSIER, J. et al. Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis C. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 21, p. 28-38, 2009.

BOWEN, D. G.; WALKER, C. M. The origin of quasispecies cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? **J. Hepatol.**, v. 42, p. 408-417, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. Brasília, 2008, p. 34-54.

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

CALLEJA, J. Peginterferon alpha-2a and ribavirin in patients with hepatitis C virus genotype 1 infection with persistently normal alanine aminotransferase levels. **J. Gastro. Hepatol.** v. 27, p. 1705-10, 2012.

CASTERA, L. Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease. **Best Pract. Gastroenterol.**, v. 25, p. 291-303, 2011.

CELLA, M. et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymphonodes produce large amounts of type I interferon. **Nat. Med.**, v. 5, p. 919-923, 1999.

CHANG, K. M. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin. Liver. Dis.**, v. 7, p. 89-105, 2003.

CHARPENTIER, C. et al. Predictive value of liver enzymes and inflammatory biomarkers for the severity of liver fibrosis stage in HIV/HCV co-infected patients. *Plos One*. v. 8, p. 1-4, 2013.

CHEENT, K.; KHAKOO, S. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. **Gut**. v. 60, p. 268-78, 2010.

CHOLET, F. et al. Factors associated with leaser steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 28, p. 272-278, 2004.

CICINNATI, V. R. et al. Altered chemotactic response of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from patients with chronic hepatitis C: role of alpha interferon. **J. Gen. Virol.**, v. 89, p. 1243-1253, 2008.

COOPER, M. A.; FEHNINGER, T. A.; CALIGURI, M. A. The biology of natural killer-cell subsets. **Trends Immunol.** v. 22, p. 633-40, 2001.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, p. 434-461, 2010.

DOGAN, U. B.; AKIN, M. S.; YALAKI, S. Alanine aminotransferase normalization at week 8 predicts viral response during hepatitis C treatment. **World J Gastroenterol.** v. 19, p. 8678-86, 2013.

DOHERTY, D. G.; O'FARRELY, C. Innate and adaptative lymphoid cells in the human liver. **Immunol. Rev.**, v. 174, p. 5-20, 2000.

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the Immunobiology of hepatitis C. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 71-99, 2007.

FAN, X. G. et al. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C vírus infection. **Mediators Inflamm.**, v. 7, p. 295-297, 1998.

FARCI, P. et al. Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. **Med. Sci.** v. 109, p. 1462-67, 2012.

FERLAZZO, G.; MÜNZ, C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 1333-1339, 2004.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites Virais: Aspectos da Epidemiologia e da Prevenção. **Rev. Bras. de Epidem.**, v. 7, n. 4, p. 473-87, 2004.

FLORHOLMEN, J. et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP) - 1α , MIP- 1β and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 204-209, 2010.

GAO, B.; RADAIEVA, S. Natural killer and natural killer T cells in liver fibrosis. *Biochim et Biophys Acta.* v. 1832, p. 1061-69, 2013.

GAO, B.; RADAIEVA, S.; JEONG, W. I. Activation of natural killer cells inhibits liver fibrosis: a novel strategy to treat liver fibrosis. **Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 1, p. 173-180, 2007.

GARCÍA-SAMANIEGO, J. et al. Factors associated with early virological response to peginterferon- α -2a/ ribavirin in chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol.** v. 19, p. 1943-52, 2013.

GIANINNI, C.; BRECHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 27-38, 2003.

GOLDEN-MASON, L.; ROSEN, H. R. Natural killer cells: primary target for hepatitis c virus immune evasion strategies? **Liver Transpl.**, v. 12, p. 363-372, 2006.

GONÇALVES, R. M. et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory t cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: do different parasite species elicit similar host responses? **Infect. Immun.**, v. 78, p. 4763-4772, 2010.

GOUTAGNY, N. et al. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. **J. Inf. Dis.** v. 15, p. 1951-8, 2003.

GOUTAGNY, N. et al. Quantification and functional analysis of plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 1646-1655, 2004.

GRAMENZI, A. et al., Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. **J. Viral. Hepat.** v. 12, p. 525-30, 2005.

GREMION, C.; CERNY, A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. **Rev. Med. Virol.**, v. 15, p. 235-268, 2005.

ISAGLUTIANS, M. G. Hepatitis C virus clearance the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 4, p. 168-183, 2003.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia**: o sistema immune na saúde e na doença. 6a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.

JI, X. et al. Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 37, p. 610-621, 2003.

KANG, W.; SHIN, E. C. Clinical implications of chemokines in acute and chronic hepatitis C virus infection. **Yonsei Med. J.**, v. 52, p. 871-878, 2011.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Distinct susceptibility of dendritic cell subsets to hepatitis C virus infection: a plausible mechanism of dendritic cell dysfunction. **J. Gastroenterol.**, v. 39, p. 811-812, 2004.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Intern. Med.**, v. 45, p. 183-191, 2006.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. **Hepatol Res.**, v. 37, p. 319-326, 2007.

KONDO, Y.; UENO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Dysfunction of immune system and host genetic factors in hepatitis C virus infection with persistent normal ALT. **Hepatitis Res. Treat.**, p. 1-7, 2011.

KONERMAN, M. A. et al. Fibrosis Progression in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting adults: prospective analysis of 435 liver biopsy pairs. **Hepatol.** v. 00, p. 1-9, 2013.

KOZIEL, M. J. Influence of HIV co-infection on hepatitis C immunopathogenesis. **J. Hepatol.**, v. 44, p. 14-18, 2006.

KUO, G. et al. Na assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 362-364, 1989.

KUSHNER, L. E. et al. Immune biomarker differences and changes comparing HCV mono-infected, HIV/HCV co-infected, and HCV spontaneously cleared patients. **Plos One**. v. 8, p. 1-17, 2013.

KUSHWAH, R.; HU, J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. **Immunology**, v. 133, p. 409-419, 2011.

LAI, W. K. et al. Hepatitis C is associated with perturbation of intrahepatic myeloid and plasmacytoid dendritic cell function. **J. Hepatol.**, v. 47, p. 338-347, 2007.

LAPORTE, J.; BAIN, C.; MAUREL, P. Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells. **Blood**, v. 101, p. 52-57, 2003.

LARRUBIA, J. R. et al. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol.** v. 14, p. 7149-59, 2008.

LARRUBIA, J. R.; BENITO-MARTÍNEZ, S.; CALVINO, M. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 7149-7159, 2008.

LIANG, T. J.; RECHERMANN, B.; SEEF, L. B. Pathogenesis natural history, treatment and prevention of hepatitis C. **Anna. Intern. Med.**, v. 132, p. 296-305, 2000.

LIN et al. CD56^{dim} and CD56^{bright} cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. **Clin. Exp. Immunol.** v. 137, p. 408-16, 2004.

LINDEBACH, B. D.; RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 433, p. 933-938, 2005.

LLOYD, A. R.; JAGGER, E.; POST, J. J. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p. 24-32, 2007.

LOSIKOFF, P. T.; SELF, A. A.; GREGORY, S. H. Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C. **Virulence**, v. 3, p. 1-11, 2012.

MAC DONALD, A. J. et al. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus infected persons. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 720-727, 2002.

MAC DONALD, K. P. A. et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. **Blood**, v. 100, p. 4512-4520, 2002.

MAECKER, H. T.; MCCOY, P. Nussenblatt. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. **Nat. Rev.**, v. 12, p. 191-200, 2012.

MELHEM, A. et al. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. **J. Hepatol.**, v. 45, p. 60-71, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hepatites Virais: o Brasil está Atento. 3 ed. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2008. p. 7.

MORGAN, E. et al. Cytometric Bead Array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clin. Immunol.** v. 110, p. 252-66, 2004.

MORISHIMA, C. et al. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect *ex vivo* cytolytic killing. **Hepatol.** v. 43, p. 573-80.

MOTENEGRO, L. et al. Virus C Hepatitis and Type 2 Diabetes: A cohort study in southern Italy. v. 108, p. 1108-11, 2013.

NAKAMURA, M. et al. Alanine aminotransferase elevation during peginterferon alpha-2a or alpha-2b plus ribavirin treatment. **Int. J. Med. Sci.** v. 10, p. 1015-21, 2013.

NEGRO, F. Mechanism and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 42, p. 6756-6765, 2006.

NEUMAN, M. G. et al. Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. **Clin. Biochem.** v. 34, p. 173-82, 2001.

NEUMAN, M. G. et al. Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. **J. Viral. Hepat.** v. 9, p. 134-40, 2002.

NEUMAN, M. G. et al. Markers of Inflammation and Fibrosis in Alcoholic Hepatitis and Viral Hepatitis C. **Int. J. Hepatol.**, p. 1-10, 2012.

NORRIS, S. et al. Selective reduction of natural killer cells and T cells expressing inhibitory receptors for MHC class I in the livers of patients with hepatic malignancy. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 52, p. 53-58, 2003.

NOTAS, G.; KISSELEVA, T.; BRENNER, D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. **Clin. Immunol.** v. 130, p. 16-26, 2009.

PILERI, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, p. 938-941, 1998.

POYNARD, T. et al. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **Lancet**, v. 349, p. 825-832, 1997.

RASHKIN, S. et al. T-helper cells and liver fibrosis in hepatitis C virus-monoinfected patients. **J. Viral Hepat.** v. 17, p. 222-26, 2010.

RIBEIRO, C. M. et al. Effects of synbiotic-based *Bifidobacterium animalis* in female rats experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 111-114, 2011.

ROBBINS, C. S.; SWIRSKI, F. K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 2685-2693, 2010.

ROQUE-CUÉLLAR, M. C. et al. Hepatitis C virus-specific cellular immune responses in virological responders with viral persistence in peripheral blood mononuclear cells. **Liver**, p. 1-9, 2013.

SANTOS, E. B.; CORREA, M. C. J. M. Abordagem dos pacientes co-infectados. In: SOCIEDADE PAULISTA DE INFECTOLOGIA. II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia da Hepatite C. São Paulo: Office Editora e Publicidade, 2004. p. 45-49.

SCHUPPAN, D.; KREBS, A.; BAUER, M. Hepatitis C and liver fibrosis. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 59-67, 2003.

SEMMO, N.; KLENERMAN, P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**, v. 28, p. 4831-4838, 2007.

SILVA, G. F. et al. Grading and Staging Chronic Hepatitis C and Its Relation to Genotypes and Epidemiological Factors in Brazilian Blood Donors. **The Brazilian J Inf Dis**, v. 9, n. 2, p. 142-9, abr. 2005.

SILVA, G. F. S. Human Platelet Antigen Genotype Is Associated With Progression of Fibrosis in Chronic Hepatitis C. **J Med Virol**, v. 84, p. 56–60, 2012.

SINN, D. H. et al. Disease progression in chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase levels. **World J Gastroenterol**. v. 14, p. 2256-61, 2013.

SKLAN, E. H. et al. Mechanisms of HCV survival in the host. **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 6, p. 217-227, 2009.

SOBUE, S. et al. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J. Gastroenterol.**, v. 36, p. 544-551, 2001.

SOLDEVILA, B. et al. A prospective study of T and B lymphocyte subpopulations CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4+CD25+CD127low/-FoxP3+ T cells in patient with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. **J. Viral Hepatitis**, v. 18, p. 384-392, 2011.

SRIVASTAVA, R. et al. Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. **J. Viral. Hepat.**, v. 15, p. 910-916, 2008.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 69-82, 2001.

SWIECKI, M. et al. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell number in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 208, p. 2367-2374, 2011.

SZABO, G.; DOLGANIUC, A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. **Immunobiology**, v. 210, p. 237-247, 2005.

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

TSUBOUCHI, E. et al. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. **J. Gastroenterol.**, v. 39, p. 754-762, 2004.

TSUI, J. et al. Risky alcohol Use and serum aminotransferase levels in HIV-infected adults with and without hepatitis C. **J. Stud. Alcohol. Drug**. p. 266-70, 2013.

WASMUTH, H. E.; TACKE, F.; TRAUTWEIN, C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 30, p 215-225, 2010.

WELLNITZ, S. et al. Binding of hepatitis C virus-like particles derived from infectious clone H77C to define human cell lines. **J Virol**, v. 76, p.1181-93, 2002.

WERTHEIMER, A. M.; BAKKE, A.; ROSEN, H. R. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. **Hepatology**, v. 40, p. 335-345, 2004.

XU, R.; ZHANG, Z.; WANG, F. S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. **Cell. Mol. Immunol.**, p. 1-6, 2011.

ZARIFE, M. A. S. et al. Increased frequency of CD56^{bright} NK-cells, CD3⁻CD16⁺CD56⁻ NK cells and activated CD4⁺ T-cells or B-cells in parallel with CD4⁺CD25^{high} T-cells control potentially viremia in blood donors with HCV. **J. Med. Virol.** v. 81, p. 49-59, 2009.

ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L. M.; TALAL, A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. **J. Viral. Hepat.** v. 14, p. 675-87, 2007.

ZIMMERMANN, H. W. et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14⁺CD16⁺ monocytes to inflammation and human liver fibrosis. **Plos One**, v. 5, p. 1-15, 2010.

