



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**ISABELA SILVA DE OLIVEIRA**

**RESPOSTA IMUNE CELULAR DE PORTADORES DE  
HEPATITE C ANTES E NA 12ª SEMANA DE TRATAMENTO  
COM INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA**

Salvador, BA  
2015

**ISABELA SILVA DE OLIVEIRA**

**RESPOSTA IMUNE CELULAR DE PORTADORES DE HEPATITE  
C ANTES E NA 12ª SEMANA DE TRATAMENTO COM  
INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Souza Atta  
Co-orientador: Prof. Ajax Mercês Atta

Salvador, BA  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,  
Sistema de Bibliotecas da UFBA

O48 Oliveira, Isabela Silva de,  
Resposta imune celular de portadores de hepatite C antes e na  
12ª semana de tratamento com interferon-alfa e ribavirina / Isabela  
Silva de Oliveira. - Salvador, 2015.  
62 f. ; il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Souza Atta.  
Coorientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia,  
2015.

1. Hepacivirus. 2. Interleucina-10. 3. Fator de crescimento  
transformador beta. 4. Crioglobulinas. 5. Células matadoras  
naturais. 6. Hepatite C crônica. I. Atta, Maria Luiza Brito de Souza.  
II. Atta, Ajax Mercês. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto  
de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 578:616.36-002



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DA DOUTORANDA **Isabela Silva de Oliveira**.

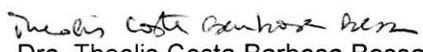
Aos dezenove dias do mês de agosto do ano de dois mil e quinze às quatorze horas no Auditório Ophélia Gaudenzi do terceiro andar no Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública a Banca Examinadora composta pelos Professores: **Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta orientadora, Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo, Dr. Carlos Roberto Brites Alves, Dra. Maria Olivia Amado Ramos Bacellar, Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa**, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: "**Resposta Imune Celular de Portadores de Hepatite C antes e na 12ª Semana de Tratamento com Interferon-Alfa e Ribavirina**" da doutoranda **Isabela Silva de Oliveira**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a Doutoranda teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, dezenove de agosto do ano de dois mil e quinze.

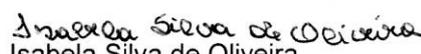
  
Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta  
Orientadora

  
Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo  
Banca Examinadora

  
Dr. Carlos Roberto Brites Alves  
Banca Examinadora

  
Dra. Maria Olivia Amado Ramos Bacellar  
Banca Examinadora

  
Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa  
Banca Examinadora

  
Isabela Silva de Oliveira  
Doutoranda

  
Dra. Silvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm  
ICS/UFBA

Apoio Financeiro:

Trabalho experimental desenvolvido com apoio financeiro do CNPq. Durante a realização do Doutorado em Imunologia a autora foi bolsista da CAPES.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que por sua presença e força, sempre me abençoa.

Ao Prof. Dr. Ajax Mercês Atta e à Profa. Dra. Maria Luiza Atta, pela orientação, pelo apoio e estímulo à minha formação, pela confiança depositada e, principalmente pela grande amizade construída nesses anos de agradável convivência;

Ao meu pai, Antônio Sergio de Oliveira, e a minha mãe, Elizabete Silva de Oliveira, pelo apoio incondicional na minha formação. Obrigada pela presença e por tudo que ainda, diariamente, me ensinam e ajudam;

À Farmacêutica Rosemeire Dourado e toda equipe da FARME do Hospital Manoel Victorino, pelo apoio na seleção dos pacientes;

Aos pacientes, que com toda boa vontade permitiram a coleta de seu sangue contribuindo com este estudo, sem os quais essa tese não seria possível.

Aos meus amigos do Laboratório LAPIM/DILDA, pelo convívio e amizade, e por tornarem esses anos mais alegres;

Ao Serviço de Imunologia do HUPES, que me auxiliou no manuseio do citômetro de fluxo e nas análises dos resultados de citometria, indispensáveis à realização deste trabalho;

A todos os colegas do laboratório da Faculdade de Farmácia;

Ao PPGIm, através dos professores e funcionários, pela formação, logística e apoio;

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A hepatite C crônica (HCC) é um problema de saúde mundial, sendo uma das principais causas de transplantes de fígado. A maioria dos indivíduos infectados desenvolve a infecção crônica. Muitos trabalhos têm relatado a ocorrência de desregulação na resposta imune durante a infecção pelo HCV, o que implica na persistência viral. Alguns mecanismos de escape foram sugeridos, como: mascaramento de epítomos, interferência viral nas vias de sinalização de IFN e da resposta imune inata, exaustão e anergia de células T, supressão de resposta imune por ação das células T regulatórias ou ação de citocinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune celular em portadores de hepatite C crônica antes e na 12<sup>a</sup> semana de tratamento com interferon- $\alpha$  mais ribavirina. Este trabalho foi dividido em dois artigos. No primeiro artigo foi investigada a frequência de subpopulações de linfócitos no sangue periférico de portadores de HCC não tratados e após 12 semanas de tratamento antiviral com IFN- $\alpha$  e ribavirina. Uma elevada frequência de células B e frequências baixas de células T CD8<sup>+</sup> e células NK foram encontrados nos indivíduos não tratados, mas não houve alteração nas frequências de células T CD4<sup>+</sup> e células Tregs. Porém, portadores de HCC que tiveram positividade para crioglobulinas possuíam baixa frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em comparação aos pacientes sem essas manifestações extra-hepáticas. Não houve diferença na frequência das subpopulações de linfócitos entre os portadores de HCC antes e na 12<sup>a</sup> semana do tratamento duplo, mas houve aumento da frequência de células NK em pacientes com resposta virológica precoce. No segundo trabalho foi avaliada a produção das citocinas imunorregulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e as relacionadas à resposta antiviral (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de portadores de HCC estimuladas com fitohemaglutinina e antígenos do HCV (core, NS3, NS4 e NS5), antes e na 12<sup>a</sup> semana de tratamento antiviral com interferon e ribavirina. Foi demonstrado que o estímulo das CMSP desses pacientes com antígeno HCV-core causou um aumento na produção de IL-2, redução na produção de IFN- $\gamma$  e produção aumentada de IL-10. Antígenos HCV-NS3 e HCV-NS5 estimularam apenas a produção de IL-10. Os antígenos do HCV não estimularam a produção de TGF- $\beta$  pelas CMSP, e houve uma relação entre os níveis desta citocina e a carga viral do HCV dos pacientes antes do tratamento. Conclui-se que a resposta imune nos portadores de HCC está alterada, demonstrado pela diminuição na frequência de células CD8<sup>+</sup> e NK, e pela aumentada produção de IL-10, baixa produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  provocada pelos antígenos virais.

**Palavras-chave:** antígenos do HCV. IL-10. TGF- $\beta$ . Crioglobulinas. Células NK. Hepatite C crônica

## ABSTRACT

Chronic hepatitis C (HCC) is a global health problem and a cause of liver transplants. Most infected individuals develop chronic infection. Altered immune response to hepatitis C virus (HCV) infection can be demonstrated in patients with chronic hepatitis C (CHC), which implies the viral persistence. Some escape mechanisms have been suggested, such as: masking epitopes, viral interference in the IFN signaling pathway and innate immune response, exhaustion and anergy of T cells response, suppression of immune response by action of regulatory T cells or action of cytokines. The aim of this study was to evaluate the cellular immune response in patients with chronic hepatitis C before and after 12 weeks of treatment with interferon- $\alpha$  plus ribavirin. This study has been divided into two papers. The first paper investigated the frequency of blood lymphocyte subsets in untreated HCV patients and after 12 weeks of antiviral treatment with IFN- $\alpha$  plus ribavirin. A high frequency of B cells and low frequencies of both CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells were found in untreated patients, but there was no change in the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells and Treg cells. However, patients with cryoglobulinemia had a lower frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells compared to patients without these extrahepatic manifestations. There was no difference in the frequency of blood lymphocyte subsets among patients with HCC before and after 12 weeks of antiviral treatment, but there was an increase in the frequency of NK cells in patients with early virological response. The second study evaluated the production of immunoregulatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) and associated antiviral response (IL-2 and IFN- $\gamma$ ) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CHC patients stimulated with Phytohemagglutinin (PHA) and HCV antigens (core, NS3, NS4 e NS5), before and at 12 weeks of antiviral treatment with interferon plus ribavirin. It has been shown that stimulation of the PBMC of patients with HCV core antigen caused an increase in IL-2 production, reduction in IFN- $\gamma$  and increased in IL-10 production. HCV-NS3 e HCV-NS5 antigens only stimulated IL-10 production. The HCV antigens did not stimulate TGF- $\beta$  production. There was a relationship between the levels of this cytokine and the HCV viremia of the patients before treatment. In conclusion, the immune response in patients with HCC is disrupted, demonstrated by decrease in the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells, and the increased production of IL-10, low IL-2 and IFN- $\gamma$  production induced by the viral antigens.

**Keywords:** HCV antigens. IL-10. TGF- $\beta$ . Cryoglobulins. NK cells. Chronic hepatitis C.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **CAPÍTULO 1 - Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin**

Figure 1. Flow cytometry analysis of peripheral blood lymphocyte subsets performed in chronic hepatitis C patients and healthy individuals. 30

Figure 2. Proportion of blood lymphocytes subtypes in 20 control healthy individuals (BC, CD4-C, CD8-C, NK-C, Treg-C) and in 26 untreated HCV patients (B-T0, CD4-T0, CD8T0, NK-T0 and Treg-T0). Box and whiskers represent the median, interquartile range (25% e75%) and maximum and minimum. (B=B cell, CD4 =CD4<sup>+</sup>Tcell, CD8¼CD8<sup>+</sup>T cell, NK = NK cell and Treg =CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg cell). 30

Figure 3. Frequency of Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) in the peripheral blood of chronic hepatitis C patients having cryoglobulinemia (Positive, n =13) and without this cryoprecipitate (Negative, n =13), before treatment. Horizontal bars represent the means. 31

Figure 4. Treg/NK cell ratio in 20 control healthy individuals and 26 untreated hepatitis C patients before treatment (T0). Horizontal lines represent the medians. 31

Figure 5. Treg/NK cell ratio in untreated HCV patients that were negative (n = 13) or positive (n =13) for the presence of cryoglobulinemia. 31

### **CAPÍTULO 2 - Alta produção de interleucina-10 em pacientes com resposta virológica precoce ao tratamento de hepatite C crônica com interferon-γ /ribavirina**

Figura 1. Produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com HCC. 48

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin**

Table 1. Demographic and clinical findings in 26 patients with chronic hepatitis C (CHC) before antiviral treatment with Interferon-a plus ribavirin (T0).	29
Table 2. Laboratory findings in 19 patients with chronic hepatitis C (CHC) before (T0) and after 12-weeks treatment (T12).	30

### **CAPÍTULO 2 - Alta produção de interleucina-10 em pacientes com resposta virológica precoce ao tratamento de hepatite C crônica com interferon- $\gamma$ /ribavirina**

Tabela 1 - Características clínicas de 15 portadores de HCC antes da terapia antiviral com interferon- $\alpha$ mais ribavirina e resposta virológica após 12 semanas do tratamento	46
Tabela 2 – Dados laboratoriais de 15 portadores de HCC antes e na 12 <sup>a</sup> semana de tratamento com interferon- $\alpha$ e ribavirina	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
ALT	Alanina animotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASMA	Anticorpo antimúsculo liso
CHC	Carcinoma hepatocelular
CLDN	Claudina
CM	Crioglobulinemia mista
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CRIO	Crioglobulinas
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAN	Fator antinuclear
FR	Fator reumatoide
HCC	Hepatite C crônica
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HVB	Vírus da hepatite B
ICOS	Coestimulador induzível
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IFR-3	Fator 3 Regulatório do Interferon
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IMC	Índice de Massa Corpórea
IPEX	Desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X
LiPA	<i>Line Probe Assay</i>
NK	Células Natural Killer
NKT	Células T invariantes Natural Killer
NOSA	Anticorpo não-órgão específico
NS3	Antígeno não-estrutural 3 do HCV
NS4	Antígeno não-estrutural 4 do HCV
NS5	Antígeno não-estrutural 5 do HCV
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PD-1	Receptor de morte celular programada-1
PHA	Fito-hemaglutinina
RN	Resposta nula
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
RVP	Resposta virológica precoce
RVS	Resposta virológica sustentada
SFB	Soro fetal bovino
SRBI	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo de I
T reg	Células T regulatórias
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação beta
Th	Célula T auxiliaadoras

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	12
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1	Vírus da Hepatite C	14
2.2	Epidemiologia	16
2.3	História Natural da infecção	17
2.4	Hepatite C Crônica	18
2.5	Tratamento Antiviral	19
2.6	Resposta Imune na Hepatite C	20
2.6.1	Resposta imune inata	20
2.6.2	Resposta imune adaptativa	22
2.6.3	Mecanismos de evasão da resposta imune	22
3.	<b>OBJETIVOS</b>	27

### **CAPÍTULO 1: Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin**

		28
	Introduction	28
	Material and methods	29
	Patients and controls	29
	Cryoglobulin and NOSA	29
	Blood lymphocytes	29
	Statistical analysis	29
	Results	29
	Clinical, virological, and demographic findings in untreated HCV patients	29
	Viral response at 12-weeks of treatment with IFN-a plus ribavirin	30
	Lymphocyte subsets in untreated HCV patients	30
	Lymphocyte subsets in treated HCV patients	31
	Discussion	31
	References	32

### **CAPÍTULO 2: Alta produção de interleucina-10 em pacientes com resposta virológica precoce ao tratamento de hepatite C crônica com interferon- $\gamma$ /ribavirina**

		34
1.	Introdução	36
2.	Materiais e métodos	37
2.1	Pacientes	37
2.2	Células mononucleares do sangue periférico	38
2.3	Avaliação virológica, histológica e bioquímica	38
2.4	Pesquisa de crioglobulinas e autoanticorpos não-órgão-específicos (NOSA)	39
2.5	Determinação dos níveis de citocinas	39
2.6	Análise estatística	39
3.	Resultados	39
3.1	Achados clínicos e demográficos	39
3.2	Produção de citocinas	40
4.	Discussão	40
5.	Referências	43

4	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	49
5	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50
8	<b>ANEXOS</b>	59
	Parecer do Comitê de Ética	59
	Termo de Consentimento livre e esclarecido	61

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O vírus da Hepatite C (HCV) tem como uma das suas principais características estabelecer uma infecção persistente na maioria dos indivíduos infectados. Cerca 80% dos indivíduos infectados desenvolvem uma infecção crônica. Nesses pacientes, os sintomas são leves, e podem levar décadas, antes das complicações da infecção tornarem-se aparentes. Esses pacientes também têm um risco aumentado de desenvolverem fibrose, cirrose e/ou carcinoma hepatocelular a longo prazo. A hepatite C crônica (HCC) é a primeira causa de transplante hepático no mundo (OMS).

A hepatite C crônica é um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) mais de 170 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, sem opção de uma vacina preventiva (ROSEN, 2011). A alta variabilidade genética do HCV permite a evasão da resposta do sistema imune do hospedeiro, tendo importante impacto na transmissão, progressão da doença e resultado na terapia antiviral (PRECIADO et al., 2014).

Os mecanismos que levam o HCV a desenvolver infecção crônica não são completamente compreendidos. Vários fatores virais e do hospedeiro têm sido propostos para explicar a falha na resposta imune que leva à persistência da infecção. Esses fatores incluem a ocorrência de mutações de escape imune do HCV, defeito na apresentação antigênica, exaustão de células TCD8 e TCD4, e supressão da resposta imune por células T regulatórias, interferência viral nas vias de sinalização do IFN e na resposta de células NK (SPAAN et al., 2012). O entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na persistência viral é importante para a melhoria das opções de tratamento e preventivas baseadas em respostas imunomodulatórias em pacientes infectados pelo HCV.

Além dos hepatócitos, o HCV pode infectar células B, células T, monócitos e células dendríticas, interferindo nas suas funções (KLENERMAN, THIMME; 2012). Além disso, diferentes achados laboratoriais sugerem que proteínas do HCV podem estar relacionadas com a supressão da resposta imunológica do hospedeiro, interferindo na função das células efetoras (TSENG, KLIMPEL; 2002; LI et al., 2005).

Alguns estudos indicam que as células Treg têm um papel na persistência viral por supressão da resposta de células T vírus-específica (BOETTLER et al., 2005; CABRERA et al., 2004; MIYAAKI et al., 2008). O mecanismo envolvido na função supressora não é conhecido, mas as ações de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  podem estar envolvidas.

Nos últimos anos, vem sendo estudado alguns aspectos das manifestações extra-hepáticas da hepatite C na nossa população: a presença de algum marcador de autoimunidade em cerca de 80% dos portadores da infecção crônica, sendo a crioglobulinemia a mais prevalente, seguido de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA), principalmente fator reumatoide e anticorpos antimúsculo liso (ATTA, PARANA, SOUZA-ATTA; 2010; CABRAL, 2011; RODRIGUES, 2012). Mais recentemente, nós observamos que o perfil de citocinas séricas nos portadores do HCV que apresentavam crioglobulinemia e NOSA foi representado por aumento de IL-2, IL-5 e BAFF, sem alteração nos níveis de IL-10 e IL-4 (ATTA et al., 2010).

Landau e colaboradores (2007) demonstraram que as manifestações autoimunes induzidas pelo HCV estão associadas com níveis mais baixos de células Treg, e que a resposta ao tratamento foi acompanhada pelo aumento dos níveis dessas células, o que não era observado nos pacientes sem manifestações de autoimunidade. Neste contexto, esses dados sugerem que as células Treg podem ter também um papel benéfico na infecção pelo HCV.

O presente estudo teve como objetivo investigar a frequência de subpopulações de linfócitos no sangue periférico de portadores de HCC não tratados e após 12 semanas de tratamento antiviral com IFN- $\alpha$  e ribavirina. As frequências das células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, TCD4, TCD8, NK e B foram determinadas por citometria de fluxo. Além disso, foi verificada a produção das citocinas imunorregulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e as antivirais (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de portadores da HCC estimuladas com fitohemaglutinina e antígenos do HCV (core, NS3, NS4 e NS5), antes e na 12<sup>a</sup> semana de tratamento antiviral duplo. A determinação dos níveis das citocinas foi realizada pelo método de ELISA. Os dados obtidos foram correlacionados com manifestações de autoimunidade nos pacientes.

A avaliação da carga viral na 12<sup>a</sup> semana de tratamento é um importante parâmetro para identificar pacientes precocemente que não responderão ao tratamento antiviral. Nesse momento, espera-se uma queda de  $2\log_{10}$  na carga viral ou a não detecção, que representa probabilidade de resposta virológica sustentada no final do tratamento. O perfil da subpopulação de linfócitos periféricos envolvidos com a resposta imune inata ou adaptativa desses indivíduos contra o HCV e produção de citocinas envolvidas na resposta antiviral, de pacientes em uso de terapia antiviral, poderá contribuir na compreensão do comportamento dessa infecção em nossa população distinta em relação à afrodescendência.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 VIRUS DA HEPATITE C

O vírus da Hepatite C (HCV) pertence ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae*. O HCV foi considerado o principal agente causador das hepatites não-A não-B pós-transfusão, e teve seu genoma identificado, pela primeira vez, em 1989 (CHOO et al., 1989). Em 1992, foi desenvolvido o primeiro teste para identificação do anticorpo contra o HCV (anti-HCV), aumentando a segurança em transfusões sanguíneas (LAUER; WALKER, 2001).

O HCV é um pequeno vírus de RNA, envelopado, com genoma de fita simples e polaridade positiva, medindo 9,6 Kb de comprimento (CHEVALIEZ, PAWLOTSKY et al., 2006). A fita simples de RNA possui aproximadamente 9.600 nucleotídeos, e codifica uma proteína viral com mais de 3000 aminoácidos. Após clivagem por proteases do hospedeiro e viral, esta proteína precursora é processada em dez proteínas, as estruturais e não estruturais, e o peptídeo p7. As proteínas estruturais são formadas pela proteína do core e as glicoproteínas do envelope 1 (E1) e 2 (E2); as proteínas não estruturais ou NS (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), que possuem atividades enzimáticas (CHEVALIEZ, PAWLOTSKY et al.; 2006).

A proteína do core tem como principal função a proteção do genoma viral com a formação do nucleocapsídeo. Além disso, interage com algumas proteínas celulares, interferindo em algumas funções celulares como transcrição de genes, metabolismo de lipídeos, apoptose e vias de sinalização celular (KEYVANI et al., 2012). Tem sido sugerida a participação da proteína do core na imunopatogênese da hepatite C. Através da sua interação com o receptor de complemento (gC1qR), a proteína do core foi relacionada com a supressão de resposta de linfócitos T, levando a desregulação de células TCD4<sup>+</sup> e supressão da função das células T CD8<sup>+</sup>, sendo considerada uma molécula imunomoduladora (KITTLESEN et al., 2000). Foi também sugerida sua participação na progressão da fibrose no fígado por sua interação com as células estreladas e as células de Kupffer (BATALLER, BRENNER; 2005).

As glicoproteínas do envelope (E1 e E2) são importantes para a fusão e entrada do vírus na célula hospedeira. A proteína E2 tem importante papel no início da infecção, pois pode se ligar ao receptor CD81, lipoproteína de alta densidade (HDL) e também o receptor *scavenger* (tipo B classe 1). E1 está envolvida na fusão da membrana viral ao citoplasma por

sua interação com a proteína do core (FLINT, MCKEATING; 2000; ROSA et al., 1996). E1 e E2 são altamente glicosiladas, contendo até 5 e 11 locais de glicosilação, respectivamente. Além disso, E2 contém regiões hipervariáveis com diferentes sequências de aminoácidos que podem variar em até 80% entre os genótipos do HCV e entre os subtipos do mesmo genótipo (WEINER et al., 1991).

Foi demonstrado que o p7 é uma proteína de membrana integral. Os estudos *in vitro*, sugeriram que p7 poderia funcionar como um canal de cálcio (GONZALEZ, CARRASCO; 2003); e parece ser essencial, porque as mutações ou deleções suprimiram a transfecção intra-hepática do HCV (SAKAI et al., 2003).

NS2 é uma proteína transmembrana essencial para o ciclo de replicação do vírus *in vitro* ou *in vivo*. A porção C-terminal da proteína NS2, juntamente com a proteína NS3, forma uma autoprotease NS2-3. Além disso, a proteína NS2 interage com outras proteínas não estruturais e pode estar envolvida na montagem de partículas de vírus (KIM et al., 1996).

NS3 é parte de uma poliproteína com três atividades enzimáticas: serinaprotease, NTPase e RNA helicase. A NS3 serinaprotease requer NS4A como cofator, e é responsável pelo processamento proteolítico de outras proteínas não estruturais, sendo importante para o ciclo de vida do HCV e para a patogênese da infecção (KEYVANI et al., 2012). Foi mostrado *in vitro* que o NS3-4A antagoniza a via do Fator 3 Regulatório do Interferon (IRF-3) dependente de RNA, que é importante na indução da resposta antiviral do interferon (FOY et al., 2003); dessa forma, podendo levar resistência à ação dos IFN do tipo I. Sendo assim, a protease NS3-NS4A é um dos alvos virais para a terapêutica anti-HCV, como o Boceprevir e Telaprevir.

NS4B é uma proteína de membrana integral hidrofóbica. Sua função é para servir como uma âncora na membrana para o complexo de replicação, sendo considerado o local para replicação do HCV nas células infectadas (MORADPOUR, PENIN; 2013).

A proteína NS5A, uma proteína altamente fosforilada, e a RNA polimerase-dependente de RNA (NS5B), são responsáveis pela replicação do HCV. Esta enzima não possui atividade de correção, sendo propensa a erros durante a replicação, e responsável pela grande variabilidade genética do genoma do HCV e à dificuldade no desenvolvimento de uma vacina eficaz. Porém, a proteína NS5B tem uma região altamente conservada entre as quasiespécies virais e genótipos virais (DUBUISSON, 2007). O Sofosbuvir, um fármaco de ação direta anti-HCV, inibidor da polimerase NS5B, foi aprovado pela ANVISA em 2015 e mostrou taxa de resposta virológica sustentada de aproximadamente 90% (EASL, 2015).

O HCV não é um vírus hepatotrópico restrito. Outras células e tecidos também podem ser infectados, como as células epiteliais, linfócitos B, células dendríticas, monócitos, células de linfonodos e do trato digestivo (DUSTIN; RICE, 2007).

O ciclo de vida do vírus é iniciado quando partículas do HCV se ligam às células do hospedeiro através de uma interação específica entre as glicoproteínas de envelope e um receptor celular. Os receptores e correceptores do hospedeiro mais comuns são glicosaminoglicanos, CD81, receptor *scavenger* classe B tipo de I (SRBI), os membros da família claudina (CLDN1, 6 e 9) e as lectinas ligadoras de manose DC-SIGN e L-SIGN. Depois, o genoma viral é liberado a partir do nucleocapsídeo e traduzido por proteínas virais não estruturais. A fita de RNA recém-sintetizada é encapsulada com a proteína do core. O brotamento viral ocorre mais provavelmente no complexo de Golgi-Retículo Endoplasmático.

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com dados do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais (BRASIL, 2010), foram confirmados no Brasil 69.952 casos de hepatite C no período de 1999 a 2010. As maiores taxas foram verificadas nas regiões sul e sudeste. Na Bahia, verificou-se uma taxa de 2,4 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2010).

O vírus da hepatite C é transmitido principalmente por via parenteral: procedimentos cirúrgicos, odontológicos, transfusão de sangue e hemoderivados, o uso de drogas endovenosas, hemodiálise, realização de tatuagem e “piercing”. Outros meios possíveis de transmissão estão relacionados com o uso de objetos como lâminas de barbear ou depilar, escovas de dente e instrumentos para pedicure/manicure. Após a diminuição do risco de transmissão por transfusão sanguínea, 60 a 70% dos casos novos relacionam-se com o uso de drogas endovenosas (SHEPARD et al., 2005).

No Brasil, observa-se que a maioria dos casos está relacionada ao uso de drogas (18%), à transfusão de sangue e/ou hemoderivados (16%) e à transmissão sexual (9%), mas também casos de transmissão desconhecidos ou ignorados são verificados (43%) (BRASIL, 2010).

O HCV possui seis genótipos principais, de patogenicidade semelhante, e dezenas de subtipos que diferem na distribuição geográfica e na resposta à terapia antiviral (DUSTIN; RICE, 2007; BUKH et al., 1995). Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial. No Brasil,

prevalecem em ordem decrescente de importância os genótipos 1, 3 e 2, sendo o genótipo 1 mais resistente ao tratamento (FOCACCIA et al., 2004). As altas taxas de mutações do HCV e os numerosos subtipos virais são algumas das razões para a dificuldade no desenvolvimento de uma vacina eficaz.

### 2.3 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO

O espectro de manifestações clínicas da infecção pelo HCV inclui a fase aguda e a doença crônica. A fase aguda é frequentemente assintomática, levando à infecção crônica em cerca de 80% dos casos. A hepatite C aguda sintomática pode ser observada em 15-30% dos infectados, geralmente são sintomas leves e inespecíficos, como letargia e mialgia, mas a icterícia também pode ser observada. Níveis mais altos de ALT são observados em infecções agudas sintomáticas do que naquelas assintomáticas.

Cerca de 20% dos pacientes infectados eliminam o vírus espontaneamente. A complexa relação entre fatores do hospedeiro e do vírus provavelmente afeta a definição da persistência ou eliminação viral. Alguns fatores do hospedeiro estão relacionados com a resolução da infecção na fase aguda, como gênero feminino, forte e ampla resposta imune e fatores genéticos. O polimorfismo do gene IL28B tem uma forte associação com a eliminação do HCV (TILLMANN et al., 2010). Esse gene codifica a citocina IL-28 (IFN lambda III), importante na resposta antiviral. Na infecção aguda, o genótipo IL28B não favorável (rs12979860) é menos relacionado com a eliminação viral do que indivíduos com o genótipo CC (THOMAS et al., 2009). Também, foi mostrado que pacientes com o genótipo CC responderam 2 vezes mais ao tratamento com interferon e ribavirina do que aqueles com genótipos não-CC. Acredita-se que a variação genética influencia a resposta imune inata (GE et al., 2009) através da produção de IFN.

A HCC é definida pela persistência do vírus por mais de 6 meses. As manifestações da infecção crônica pelo HCV abrangem desde um estágio assintomático a cirrose e carcinoma hepatocelular, e geralmente evolui de forma lentamente progressiva. Aproximadamente 20-30% de indivíduos cronicamente infectados desenvolvem cirrose após 20-30 anos (CHEN; MORGAN, 2006).

## 2.4 HEPATITE C CRÔNICA

Geralmente, a hepatite C é diagnosticada em sua fase crônica. Como os sintomas são inespecíficos ou inexistentes, a doença pode evoluir durante décadas sem diagnóstico, este ocorre frequentemente após teste sorológico de rotina ou mesmo na doação de sangue (THOMAS et al., 2000).

Vários fatores estão implicados no desenvolvimento e evolução mais grave da infecção crônica pelo HCV, incluindo a idade do paciente no momento da infecção; alcoolismo; coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) ou o vírus da hepatite B (HBV) e o estado imunológico.

Na maioria dos portadores do HCV, as primeiras duas décadas, após a transmissão, frequentemente evoluem com ausência de sinais ou sintomas. Os níveis séricos da enzima alanina aminotransferase (ALT) apresentam elevações intermitentes (DUSTIN; RICE, 2007). Em casos mais graves, ocorre progressão para cirrose com alterações sistêmicas e hipertensão portal (ALAZAWI et al., 2010). Na ausência de tratamento, ocorre a cronificação em 60 a 85% dos casos; 20% dos casos podem evoluir para cirrose, e 1 a 5% dos pacientes desenvolvem carcinoma hepatocelular, com indicação para o transplante (CHARLTON, 2001).

Dentro das manifestações clínicas da hepatite C crônica estão incluídas as manifestações extra-hepáticas, que geralmente não são autolimitadas e contribuem de forma importante para a morbidade e mortalidade da infecção viral persistente (MAYO, 2003). Essas manifestações afetam cerca de 40% dos portadores crônicos e, muitas delas, estão relacionadas com linfoproliferação e/ou autoimunidade (LANDAU et al., 2007; HIMOTO; MASAKI, 2012); originadas pela disfunção de linfócitos B: crioglobulinemia mista (CM), vasculite sistêmica, síndrome de Sjögren e linfoma de células B não-Hodgkin.

Na Bahia, foi verificado que marcadores de autoimunidade podem ser encontrados em alta prevalência, atingindo cerca de 80% dos portadores do HCV, principalmente crioglobulinas (ATTA et al., 2009). Em pacientes sintomáticos, as manifestações extra-hepáticas devem ser consideradas, pois nesses pacientes justifica-se o tratamento independentemente do resultado da histologia hepática. Pacientes com manifestações renais graves da crioglobulinemia devem receber tratamento imunossupressor adequado (BRASIL, 2010).

## 2.5 TRATAMENTO ANTIVIRAL

O objetivo do tratamento é controlar o dano hepático pela inibição da replicação viral, impedindo a progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular (SHEPHERD et al., 2004). A biópsia hepática é o principal parâmetro da evolução da infecção. O escore de fibrose METAVIR é o mais amplamente validado na literatura, e é o principal critério para a indicação de tratamento farmacológico.

Outro importante parâmetro usado durante o tratamento é a carga viral, usada como um preditor de resposta virológica. O tratamento é considerado efetivo quando há resposta virológica sustentada, que é negatificação da carga viral mantida por 6 meses após término do tratamento. Assim, aumenta-se a possibilidade de regressão das lesões histológicas, diminuição do risco de carcinoma hepatocelular (CHC), o controle das manifestações extra-hepáticas e a diminuição do risco de transmissão da doença (DEUTSCH, HADZIYANNIS; 2008).

No Brasil está disponível para o tratamento, o interferon convencional e a ribavirina e o interferon-peguilado alfa-2a e alfa-2b. O interferon alfa é uma citocina característica da resposta imune inata do hospedeiro humano. A adição de uma molécula de polietilenoglicol à molécula do interferon alfa interfere na farmacocinética, prolongando a ação, elevando a velocidade de absorção, aumentando sua meia-vida e reduzindo o *clearance* da droga. A ribavirina é um antiviral análogo de nucleosídeo, utilizado por via oral, com mecanismo de ação antiviral direto contra vírus de RNA e DNA. A ribavirina é convertida por enzimas celulares aos derivados de trifosfatos, responsáveis por inibir certas enzimas virais envolvidas na síntese do ácido nucleico viral (FELD; HOOFNAGLE, 2005).

Nos últimos anos, ensaios clínicos têm mostrado que os inibidores de protease são eficazes para o tratamento do genótipo 1 do HCV (BACON et al., 2011). Boceprevir e Telaprevir foram os primeiros inibidores de proteases usados no tratamento do HCV e foram incorporados ao SUS em 2012. O mecanismo de ação é a inibição da enzima protease NS3-4 do HCV, agindo diretamente sobre o HCV, bloqueando sua replicação. Ambos são utilizados associados com interferon-peguilado e ribavirina, constituindo uma terapia tripla naqueles pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV (BRASIL, 2012).

Três novos medicamentos de ação direta para tratamento do HCV foram aprovados pela ANVISA em 2015: Sofosbuvir, um inibidor da polimerase do HCV; Simeprevir, um inibidor da protease NS3-NS4; e Daclatasvir, um inibidor da NS5A. A combinação de

medicamentos de ação direta com ou sem ribavirina, ou em regimes livres de IFN, apresentaram uma taxa de 90% de resposta virológica sustentada para o genótipo 1 (BRASIL, 2015).

O esquema terapêutico dependerá principalmente do genótipo do HCV. Até 2013, no Brasil, o esquema recomendado para o tratamento de pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV é a associação de interferon-peguilado e ribavirina, por 48 a 72 semanas. O esquema recomendado para o tratamento da hepatite C crônica pelos genótipos 2 ou 3 era a associação de interferon convencional e ribavirina, durante 24 semanas. Outros aspectos clínicos devem ser observados, como a existência de fatores preditores de baixa resposta virológica, quando o esquema é a associação de interferon-peguilado e ribavirina, durante 24 a 48 semanas (BRASIL, 2011).

Cerca de 40 a 50% dos pacientes com genótipo 1 apresentam uma resposta virológica sustentada ao tratamento com interferon-peguilado combinado com ribavirina. Já os pacientes com genótipos 2 e 3 respondem numa taxa de aproximadamente 80%. Pacientes que apresentem manifestações extra-hepáticas relacionadas ao HCV, como crioglobulinemia, podem ser tratados independentemente do resultado da biópsia (BRASIL, 2011).

Alguns fatores estão relacionados com falha na RVS, como: gênero masculino, HCV de genótipo 1, carga viral elevada pré-tratamento, fibrose avançada, índice de massa corpórea (IMC) elevado, presença de resistência insulínica e coinfeção com HIV e HBV (ROSEN, 2011).

O interferon e a ribavirina estão associados com alguns efeitos adversos. Esses efeitos colaterais são responsáveis por 10 a 20% de abandono prematuro de tratamento e, em 20 a 30%, indicam a necessidade de redução de dose, reduzindo as chances de RVS (ROSEN, 2011).

## 2.6 RESPOSTA IMUNE NA HEPATITE C

### 2.6.1 Resposta imune inata

Nos hepatócitos, TLR-3 (Toll like receptor-3), PKR (protein-kinase R) e RIG-I (retinoic-acid-inducible gene I) são os principais receptores de reconhecimento do HCV durante a entrada e replicação na célula infectada. Isso inicia a cascata de sinalização

envolvida na secreção de IFN tipo I. A ligação de IFN aos seus receptores é responsável pela indução de centenas de genes estimulados por IFN (ISGs) nas células infectadas e vizinhas, o que pode limitar a replicação do HCV e da transmissão célula a célula (HEIM, THUMME; 2014).

O HCV, ao infectar os hepatócitos, ativa mecanismos de reconhecimento imune inato através de TLRs, RIG-I, e PKR que ativam cascatas de sinalização levando à produção de IFN do tipo I e tipo III, e indução de vários ISGs antivirais nos hepatócitos infectados. Os ISGs expressados durante a infecção do HCV levam a produção de moléculas antivirais, mas também de proteínas que mostraram estarem envolvidas na promoção da replicação viral *in vitro*, como ISG15 e USP18 (WIELAND et al., 2014). Além disso, foi demonstrado que há um aumento na expressão de ISGs no início da infecção viral concomitante ao aumento da carga viral, porém a maioria dos isolados do HCV é resistente a essa resposta imune inata (HORNER; GALE, 2013).

As células NK são consideradas uma das principais células efetoras da imunidade contra o vírus HCV. Principalmente, porque constituem cerca de 30% dos linfócitos do fígado. As células NK intra-hepáticas são ativadas por IFN e reconhecem e eliminam os hepatócitos infectados, gerando corpos apoptóticos contendo antígenos do HCV. Estes corpos apoptóticos são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos, como as células de Kupffer e células dendríticas que processam e apresentam os antígenos às células T CD4 e TCD8, via MHC classe I e MHC classe II. Hepatócitos infectados também apresentam antígenos do HCV processados via moléculas do MHC de classe I, e ativam células T CD8 vírus-específicas, que contribuem para eliminar mais hepatócitos infectados e mais geração de corpos apoptóticos contendo os antígenos virais (AHLENSTIEL, 2013).

Além dos hepatócitos infectados, as células de Kupffer e as células dendríticas podem secretar IFN tipo I e do IFN tipo III, induzindo a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas para o recrutamento de células T HCV-específicas. Os interferons tipo I também ativam células NK, que provocam danos aos hepatócitos infectados, iniciando a hepatite. A destruição de hepatócitos, por sua vez, estimula células dendríticas na promoção da secreção de IFN- $\gamma$  por células NK e NKT. IFN- $\gamma$  ativa macrófagos hepáticos no aumento da inflamação local (HIROISHI et al., 2008).

### 2.6.2 Resposta imune adaptativa

A imunidade mediada por célula envolve a participação de células T CD8+, os linfócitos T citolíticos (CTLs), e linfócitos T auxiliares (Th) CD4+; este é considerado mecanismo chave para resolução da infecção pelo HCV. Foi observado que os indivíduos infectados pelo HCV e que curam espontaneamente desenvolvem resposta de célula T CD4+, eficiente e multiespecífica. Por outro lado, uma resposta de célula T CD4+, transitória e limitada, relaciona-se com evolução para hepatite C crônica (REHERMANN, NASCIMBENI, 2005; DUSTIN; RICE, 2007). Assim, a geração de respostas de célula T CD8+ e células T CD4+, quando vigorosas e específicas para múltiplos antígenos estão associadas com eliminação espontânea do vírus (KANTO; HAYASHI, 2006). Já níveis persistentemente altos de antigenemia do HCV podem contribuir para uma exaustão imune, que se caracteriza por uma resposta inicial, porém limitada, de células CD4+ e CD8+ (DUSTIN; RICE, 2007).

As respostas imunes de células T CD4 e T CD8 HCV-específicas aparecem tardiamente, cerca de 6-8 semanas após o início da infecção. Este início tardio da resposta de células T HCV-específica pode ser atribuído à capacidade do vírus de interferir na resposta imune inata, interferindo na maturação de células dendríticas ou processamento e apresentação de antígenos. O surgimento de resposta de células T CD8 vírus específicas e a secreção de IFN- $\gamma$  está ligada cineticamente à diminuição na carga viral (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014).

### 2.6.3 Mecanismos de evasão da resposta imune

A infecção pelo HCV torna-se crônica na maioria dos pacientes. Dessa forma, é possível que o vírus module o sistema imune do hospedeiro; porém os mecanismos responsáveis pela persistência do HCV não são ainda completamente entendidos (DUSTIN, 2014).

Alguns mecanismos foram propostos para tentar relacionar a falha na resposta imune do hospedeiro e a persistência viral na hepatite pelo HCV, como: mutações em regiões imunogênicas do HCV, exaustão de células T efectoras como consequência da continua exposição à alta carga viral, defeito na apresentação antigênica, supressão da resposta por proteínas virais, defeito na maturação de linfócitos T e supressão da resposta imune pelas

células T regulatórias (Treg) (DUSTIN; CASHMAN; LAIDLAW, 2014; SPAAN et al., 2012).

Proteínas virais têm sido relacionadas com evasão de resposta ao IFN tipo I. As proteínas NS3-4A, core, E2 e NS5 interferem nas vias de reconhecimento e sinalização de indução de IFN (HORNER; GALE, 2013). Além disso, tem sido mostrado que os ISGs permanecem em alta expressão mesmo em pacientes com infecção crônica, sendo relacionado à baixa resposta ao tratamento antiviral. É sugerido que a infecção viral sustentada em conjunto com a alta expressão de ISGs, torna as células refratárias ao estímulo externo de indução do IFN (ABDEL-HAKEEM, SHOUKRY; 2014).

Durante a infecção pelo HCV, foi observada frequência diminuída das células NK no sangue periférico e no fígado, com aumento da distribuição de células NK CD56<sup>bright</sup>. As células NK CD56<sup>bright</sup> são uma subpopulação de células NK menos maduras com função de produção de citocinas imunorregulatórias. O HCV interfere na função de células NK por algumas maneiras. A ligação da proteína do E2 do envelope viral com o receptor CD81 sobre as células NK bloqueia a produção de IFN- $\gamma$  e a liberação de grânulos citotóxicos. Mas também, na infecção crônica, há aumento da produção de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  por células NK (HOLDER et al., 2014). Além disso, foi mostrado que o core do HCV induz a expressão do HLA-E sobre os hepatócitos, que é um ligante para o receptor inibitório NKG2A das células NK, interferindo na função dessas células (SÈNE et al., 2010).

O fracasso da resposta imune de células T específicas é causado principalmente pela exaustão de células T e ao aparecimento de mutações de escape em epítomos alvos, com a evolução de quasispécies virais. O HCV tem elevada taxa de replicação e a falta de capacidade de revisão durante a replicação, permite um escape viral das respostas imune humoral e celular, levando à infecção persistente. Desenvolvimento de mutações em epítomos restritos ao MHC de classe I, alvos de células T CD8<sup>+</sup> estão associados com persistência, provando que as células T CD8 sofrem uma pressão seletiva (TIMM et al., 2004).

Uma característica da infecção crônica pelo HCV é a presença de células TCD8<sup>+</sup> HCV-específicas funcionalmente deficientes, com a incapacidade de secretar citocinas antivirais, como IFN- $\gamma$ , ou incapacidade proliferativa (HEIM; THIMME, 2014). A exaustão de células T é caracterizada por uma modulação de receptores inibitórios, como aumento da expressão da molécula inibitória PD-1 e uma baixa expressão de CD127 (RADZIEWICZ et al., 2007). Foi mostrado que células TCD8<sup>+</sup> HCV-específicas intra-hepáticas com expressão de células PD-1 são susceptíveis a apoptose (KROY et al., 2014).

O HCV provoca anergia de células T HCV-específicas pela indução de moléculas coestimulatórias negativas. Essas células efetoras são caracterizadas pela perda da capacidade proliferativa e produção de citocinas Th1, e conseqüente incapacidade de eliminar hepatócitos infectados. As células T que passam pela exaustão, perdem primeiramente a sua capacidade para produzir IL-2, uma citocina relacionada com a proliferação; e em seguida, pela perda sequencial de citotoxicidade e produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (WHERRY, 2011).

Infecção persistente pelo HCV também afeta as respostas das células T CD4<sup>+</sup>. Ao contrário do que ocorre com epítomos para células T CD8, mutações de escape são incomuns para epítomos restritos ao MHC classe II, sugerindo que este é um mecanismo improvável de falha de célula T CD4. Mas, as respostas de células T CD4<sup>+</sup> específicas, fracas e disfuncionais têm sido relatadas em infecção crônica (FLEMING et al, 2010). Na infecção crônica, essas células perdem sua capacidade proliferativa e produção de citocinas, principalmente IL-2, e diminuem sua frequência em sangue periférico.

A participação de anticorpos neutralizantes é controversa no controle da infecção, algumas evidências mostram que podem bloquear a entrada do vírus na célula hospedeira, e impedir que mais hepatócitos sejam infectados. A maioria dos pacientes infectados pelo HCV produzem anticorpos contra epítomos para as proteínas estruturais e não estruturais, mas a maior parte não possui atividade antiviral relevante e são importantes para os testes diagnósticos (DUSTIN; CASHMAN; LAIDLAW, 2014).

O HCV escapa da imunidade humoral pela evolução de quasiespécies, mascarando epítomos alvos por glicosilação das proteínas do envelope, ao associar-se com partículas de lipoproteínas, protegendo o vírus da ação dos anticorpos neutralizantes. Além disso, o HCV pode se disseminar por transmissão entre as células vizinhas, evitando a exposição aos anticorpos circulantes (DUSTIN; CASHMAN; LAIDLAW, 2014).

Alguns autores têm avaliado o papel de células Treg na infecção pelo HCV. Pesquisas inicialmente investigaram o possível papel das células Treg na supressão de resposta imune de células T efetoras e na persistência viral. McDonald *et al.* (2002) isolaram clones de células T regulatórias produtoras de IL-10 de pacientes com infecção crônica, porém essas células não foram isoladas de indivíduos com infecção controlada. Outros estudos também mostraram que pacientes com infecção persistente têm aumento na frequência de células com marcadores fenótipos típicos de Treg, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> e CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, e que essas células diminuem a atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas para o HCV (BOETTLER et al., 2005; CABRERA et al., 2004). Por outro lado, deficiência quantitativa de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> foi observada em indivíduos com HCV associado com manifestações de

autoimunidade. Boyer et al. (2004) demonstraram que pacientes com vasculite crioglobulinêmica têm quantidade reduzida de células Treg em sangue periférico quando comparados com indivíduos cronicamente infectados pelo HCV, mas sem manifestações de autoimunidade.

Em um grande estudo de seguimento de 131 portadores do HCV, foram avaliados os níveis de Treg em grupo de pacientes com crioglobulinemia sintomática, tanto durante como após tratamento com interferon- $\alpha$  peguilado e ribavirina. Foi demonstrado que manifestações de autoimunidade induzidas pelo HCV estão associadas com níveis mais baixos de Treg (LANDAU *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo, foi observado que a resposta ao tratamento foi acompanhada por um aumento nos níveis de células Treg, com relação oposta em pacientes com infecção crônica pelo HCV sem manifestação de autoimunidade. Esses autores propõem que as células Treg podem ter um papel duplo na infecção crônica pelo HCV, tanto impedindo a eliminação viral, como limitando a lesão tecidual autoimune. Porém, mais estudos são necessários para definir mecanismos pelos quais as células T regulatórias podem influenciar o curso da infecção e interferir na eliminação viral (DUSTIN; CASHMAN; LAIDLAW, 2014).

Outros estudos têm verificado a frequência de células T regulatórias intra-hepáticas em portadores do HCV. Foi demonstrado aumento do número de células T  $CD4^+CD25^+FoxP_3^+$  em biópsia de fígado de portadores do HCV, e que as células Treg foram mais numerosas nos indivíduos com fibrose limitada, mostrando o papel supressor sobre as células efectoras envolvidas no dano celular (CLAASSEN et al., 2011). Posteriormente, foi mostrado o aumento da frequência de células Treg  $CD4^+CD25^+FoxP_3^+$  intra-hepáticas, durante a terapia antiviral com interferon mais ribavirina, e que o número das células Treg permaneciam aumentados com o sucesso terapêutico, indicando que as células Treg têm importante papel na imunidade de pacientes previamente infectados pelo HCV (CLAASEN et al., 2011).

A secreção de citocinas imunorregulatórias está relacionada com a infecção crônica pelo HCV, persistência viral e disfunção de células T  $CD8^+$ . Durante a infecção aguda pelo HCV, os níveis elevados de IL-10 estão associados com a progressão para infecção crônica (FLYNN et al., 2010). Na HCC, foi verificada a supressão de IFN- $\gamma$  no fígado com a proliferação de células T  $CD8^+$  HCV-específicas produtoras de IL-10. A IL-10 secretada por monócitos e células NK foi também relacionada com a supressão de células T, em resposta ao estímulo de peptídeos do HCV (SÈNE et al., 2010). Além disso, foi mostrado que as células T  $CD8^+$  intra-hepáticas HCV-específicas e produtoras de IL-10 evitavam dano hepático durante

a infecção crônica (ABEL et al., 2006). Ainda, o TGF- $\beta$  está também envolvido na supressão da resposta imune antiviral, sendo mostrado que o bloqueio da secreção de TGF- $\beta$  resultou num aumento da produção de IFN- $\gamma$  por células T CD8<sup>+</sup> HCV-específicas (ALATRAKCHI et al., 2007). O aumento da secreção de IL-10 e TGF- $\beta$  tem dupla função na infecção crônica, suprimindo a resposta imune com persistência viral como também diminuindo o dano hepático.

Dessa forma, o HCV pode escapar da resposta imune, por interferir com a via de sinalização de IFN, inibindo funções das células NK, mutações de escape de epítomos alvos de células imunes, ou exaustão de células T CD8 e T CD4 HCV-específicas, através de regulação positiva de moléculas de exaustão como PD-1 e indução de células Tregs que podem atenuar as respostas HCV-específicas através da secreção das citocinas imunorregulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ .

A persistência do HCV na maioria dos indivíduos infectados está relacionada com falhas na resposta imune do hospedeiro.

Alguns estudos mostraram que células T regulatórias têm um papel na persistência viral por supressão da resposta de células T vírus-específica, cujo mecanismo envolvido na função supressora não é conhecido, porém vários fatores estariam implicados, como a ação de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (BOETTLER et al., 2005; CABRERA et al., 2004; MIYAAKI et al., 2008)

Estudos anteriores do nosso grupo têm documentado alta prevalência de marcadores de autoimunidade na HCC, sendo a crioglobulinemia a mais prevalente, seguido de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA). Porém, diferente do observado em outras regiões geográficas, as manifestações clínicas de autoimunidade são pouco descritas nos pacientes (ATTA et al., 2009; ATTA et al., 2008; SOUSA-ATTA et al., 2006).

Também, documentamos que o perfil de citocinas séricas nos portadores de HCC que apresentavam crioglobulinemia e NOSA foi representado por aumento de IL-2, IL-5 e BAFF, sem alteração nos níveis de IL-10 e IL-4 (ATTA et al., 2010).

Em seguimento a esses estudos, e devido às influências de fatores étnicos e ambientais na apresentação clínica da HCC, a avaliação da resposta imune celular desses indivíduos em uso de terapia antiviral, poderá contribuir na compreensão do comportamento dessa infecção em nossa população.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune celular de portadores de hepatite C crônica, com e sem manifestações de autoimunidade, antes e durante o tratamento antiviral com interferon e ribavirina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quantitativamente os linfócitos T, B, NK e Treg do sangue periférico de portadores do HCV, antes e na 12<sup>a</sup> semana do tratamento antiviral e controles sadios.
- Avaliar a resposta funcional de células mononucleares de sangue periférico *ex vivo*, através da produção de citocinas imunorregulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e as relacionadas à resposta antiviral (IL-2, IFN- $\gamma$ ), frente a antígenos do core e proteínas não estruturais (NS3, NS4 e NS5) do HCV.
- Avaliar os resultados obtidos com manifestações de autoimunidade nos pacientes.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

- As frequências das células B, T (CD3, CD4, CD8 e Treg) e NK foram similares nos portadores de HCC brasileiros independentemente do tratamento antiviral. Porém a infecção pelo HCV foi relacionada com aumento na frequência de células B, e diminuição na frequência de células CD8<sup>+</sup> e NK, em relação aos indivíduos saudáveis; estando associada com resposta imune celular funcionalmente alterada observada na infecção.
- Os portadores de HCC e com RVP desenvolveram significativa produção de IL-10, baixa produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , e produção aumentada e indiferenciada de TGF- $\beta$ , esta última associada à carga viral, induzidas por peptídeos do HCV.
- A redução na frequência da população das células T regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> em portadores de HCC brasileiros está associada com o desenvolvimento de crioglobulinemia, sem alterações nas populações de linfócitos B, T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) e NK.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, M. et al. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.44, p.1607–1616, 2006.

ABDEL-HAKEEM, M.S.; SHOUKRY, N.H. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. **Frontiers in Immunology**, v.5, p. 274, 2014.

AHLENSTIEL, G. et al. Early changes in natural killer cell function indicate virologic response to interferon therapy for hepatitis C. **Gastroenterology**, v.141, p. 1231-9, 2011.

ALATRAKCHI, N. et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. **Journal of Virology**, v.81, p.5882–5892, 2007.

ALAZAWI, M. et al. Natural history of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection: a systematic review. **Journal of Hepatology**, v.52, p. S402, 2010.

ANSALDI, F. et al. Hepatitis C virus in the new era: perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v.20(29), p.9633-52, 2014.

ATSUKAWA, M., et al. Ribavirin downmodulates inducible costimulator on CD4+ T cells and their interleukin-10 secretion to assist in hepatitis C virus clearance. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27(4), p.823-31, 2012.

ATTA, A.M. et al. Antiphospholipid antibodies in Brazilian hepatitis C virus carriers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p. 489-492, 2008.

ATTA, A.M. et al. Serum cytokine profile in hepatitis C virus carriers presenting cryoglobulinaemia and non-organ-specific autoantibodies. **Microbial Pathogenesis**, v.48(2), p.53-6, 2010.

ATTA, A.M.; PARANA, R.; SOUSA ATTA, M.L.B. Autoimmunity in hepatitis C virus (HCV) carriers. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 13-14 2010.

BACON, B.R. et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **New England Journal of Medicine**, v.364(13), p.1207–17, 2011.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, p. 209–218, 2005.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v.24(2), p.289-93, 1996.

BOETTLER, T. et al. T cells with a CD4CD25 regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8 T cells during chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Virology**, v.79, p. 7860–7, 2005.

BOYER, O. et al. CD4CD25 regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. **Blood**, v.103, p. 3428–30, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico: hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério do Brasil. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Inibidores de Protease (Boceprevir e Telaprevir) para o tratamento da Hepatite Crônica C. Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC – 01. Ministério da Saúde, 2012.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Seminars in Liver Disease**, v.15, p.41-63, 1995.

CABRAL, M.S. Especificidade de anticorpos antimúsculo liso em portadores de hepatite crônica pelo vírus C. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

CABRERA, R. et al. An immunomodulatory role for CD4CD25 regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 40, p.1062–71, 2004.

CHARLTON, M. Hepatitis C infection in liver transplantation. **American Journal of Transplantation**, v.1, n. 3, p. 197-203, 2001.

CHEN, S.L.; MORGAN, T.R. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. **International Journal of Medical**, v. 3(2), p.47-52, 2006.

CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKY, J.M. et al. Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v.3(2), p.35–40, 2006.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, 1989.

CLAASEN, M.A.A. et al. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. **Journal of Hepatology**, v.52, p.315-321, 2011.

CLAASEN, M.A.A. et al. Retention of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in the liver after therapy-induced Hepatitis C virus eradication in Humans. **Journal of Virology**, p. 5323-5330, 2011.

CORADO, J et al. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v.109(3), p.451-7, 1997.

CROTTA, S. et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. **Journal of Experimental Medicine**, v.195(1), p.35-41, 2002.

DEUTSCH, M.; HADZIYANNIS, S.J. Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update. **Journal of Viral Hepatitis**, v.15(1), p.2-11, 2008.

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p.2406-2415, 2007.

DUSTIN, L. B.; CASHMAN, S. B.; LAIDLAW, S. M. Immune control and failure in HCV infection--tipping the balance. *Journal of leukocyte biology*, v. 96, n. 4, p. 535-48, 2014.

DUSTIN, L.; RICE, C. Flying Under the Radar: The immunobiology of Hepatitis C. **Annual Review of Immunology**, v.25, p. 71-99, 2007.

EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Journal of Hepatology* 2015.

FABRIS, M. et al. B-Lymphocyte stimulator (BLyS) up-regulation in mixed cryoglobulinaemia syndrome and hepatitis-C virus infection. **Rheumatology**, v.46, p.37-43, 2007.

FAUVELLE, C. et al Hepatitis C virus vaccines--progress and perspectives. **Microbial Pathogenesis**, v.58, p.66-72, 2013.

FELD, J.J.; HOOFNAGLE, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v.436, p. 967-972, 2005.

FERNANDEZ-PONCE, C., et al. CD4+ primary T cells expressing HCV-core protein upregulate Foxp3 and IL-10, suppressing CD4 and CD8 T cells. **PLoS One**, v.9(1), p.e85191, 2014.

FLEMING, V.M. et al. Virological footprint of CD4+ T-cell responses during chronic hepatitis C virus infection. **Journal of General Virology**, v.91, p.1396-1406, 2010.

FLINT, M., MCKEATING, J.A. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 10, p.101-17, 2000.

FLYNN, J.K. et al. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users. **Journal of Viral Hepatitis**, v.18, p.549-561, 2010.

FOCACCIA, R. et al. Demographic and Anthropometrical Analysis and Genotype Distribution of Chronic Hepatitis C Patients Treated in Public and Private Reference Centers in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8(5), p. 348-355, 2004.

FOY, E. et al. Regulation of Interferon Regulatory Factor-3 by the Hepatitis C Virus Serine Protease. **Science**, v. 300, p.1145-1148, 2003.

GE, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, p. 399–401, 2009.

GUO, F., et al. CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. **Journal of Immunology**, v.181(4), p.2285-91, 2008.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, p. 553–562, 2013.

HALL, C.H. et al. HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta. **PLoS One**, v.5(8), p.e12154, 2010.

HEIM, M. H.; THIMME, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S14–S25, nov. 2014.

HIMOTO, T.; MASAKI, T. Extrahepatic Manifestations and Autoantibodies in Patients with Hepatitis C Virus Infection. **Clinical and Developmental Immunology Article**, v. 2012, p.1-11, 2012.

HIROISHI, K.; TAKAYOSHIITO, T.; IMAWARI, M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, p.1473–1482, 2008.

INAGAKI, Y.; OKAZAKI, I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. **Gut**, v.56(2), p.284-92, 2007

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **The Japanese Society of Internal Medicine**, p. 183-191, 2006.

KAPLAN, D.E. et al. Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, 48(6), p.903-13, 2008.

KHALIQ, S.; LATIEF, N.; JAHAN, S. Role of different regions of the hepatitis C virus genome in the therapeutic response to interferon-based treatment. **Archives of Virology**, v.159(1), p.1-15, 2014

KEYVANI, H. et al. Hepatitis C Virus - Proteins, Diagnosis, Treatment and New Approaches for Vaccine Development. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Vol 13, 2012.

KIM, J. L. et al. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. **Cell**, v.87, p343-355, 1996.

KITLSEN, D.J. et al. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 106, p.1239–1249, 2000.

KLENERMAN, P.; THIMME, R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. **Gut**, v. 61, n. 8, p. 1226–34, 2012.

KROY, D.C. et al. Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. **Gastroenterology**, v.146, p.550-561, 2014.

LAN, R.Y.; SELMI, C.; GERSHWIN, M.E. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). **Journal Of Autoimmunity**, v.31(1), p.7-12, 2008.

LANCASTER, T. et al. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v.9(1), p.18-28, 2002.

LANDAU, D.A. et al. Correlation of Clinical and Virologic Responses to Antiviral Treatment and Regulatory T Cell Evolution in Patients With Hepatitis C Virus–Induced Mixed Cryoglobulinemia Vasculitis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n 9, p. 2897–2907, 2008.

LANDAU, D.A. et al. The pathophysiology of HCV induced B-cell clonal disorders. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, p.581-587, 2008.

LAUER, G. M; WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 1, p. 41–52, 2001.

LEE, M.H. et al. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v.20(28), p.9270-80, 2014.

LI, S. et al. Defining target antigens for CD25+ FOXP3 + IFN-gamma- regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. **Immunology & Cell Biology**, 85(3), p.197-204, 2007.

LI, S. et al. Hepatitis C virus-specific T-cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis. **Hepatology**, v.56(6), p.2094-105, 2012.

LI, X.D. et al. Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v.102(49), p.17717-22, 2005

LUNEMANN, S et al. Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.209(9), p.1362-73, 2014.

MACDONALD, 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.720–7, 2002.

MAREK, B. et al. TGF-beta1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF-beta1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.30(3), p.271-7, 2005.

MAYO, M.J. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 325, p.135–48, 2003.

McCOY, J.P. Handling, storage and preparation of human blood cells. **Current Protocols in Cytometry**, v. 5, p. 5.1.1-5.1.13, 1998.

MEIER, U.C. et al. Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. **Journal of Virology**, v.79, p.12365-74, 2005.

MIYAAKI, H. et al. Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients. **Liver International**, p. 1478-3223, 2008.

MORADPOUR, D.; PENIN, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.369, p.113-42, 2013.

NEUMANN-HAEFELIN, C. et al. Host and viral factors contributing to CD8+ T cell failure in hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v.13(36), p.4839-47, 2007.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature Reviews Immunology**, v.7(6), p.425-8, 2007.

OKAZAKI, T.; NAGAI, T.; KANNO, T. Gel-diffusion procedure for the detection of cryoglobulins in serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, p.1558-9, 1998.

PETROVIC, D. et al. Hepatitis C virus targets the T cell secretory machinery as a mechanism of immune evasion. **Hepatology**, v.53(6), p.1846-53, 2011.

PRECIADO, M.V. et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v.20(43), p.15992–16013, 2014.

RADZIEWICZ, H. et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. **The Journal of Virology**, v.81, p.2545-2553, 2007.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p.215-229, 2005.

RODRIGUES, Jonatas da Silva. Avaliação do efeito da terapia antiviral sobre a expressão de marcadores laboratoriais de autoimunidade em portadores da infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ROSA, D. et al. Activation of naïve B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.102(51), p.18544-9, 2005.

ROSEN, H.R. Chronic hepatitis C infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 364(25), p.2429-38, 2011.

ROSENTHAL, E.; CACOUB, P. Extrahepatic manifestations in chronic hepatitis C virus carriers. **Lupus**, v.24(4-5), p.469-82, 2015.

SAADOUN, D. et al. Hepatitis C-associated mixed cryoglobulinaemia: a crossroad between autoimmunity and lymphoproliferation. **Rheumatology (Oxford)**, v.46, p.1234-42, 2007.

SAKAY, A. et al. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p.11646-11651, 2003.

SEMMO, N. et al. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatology**, v. 14, p.492-502, 2007.

SEMMO, N. et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. **Hepatology**, v.41(5), p.1019-28, 2005.

SEMMO, N.; KLENERMAN, P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v.13(36), p.4831-8, 2007.

SÈNE, D., et al. Hepatitis C virus-associated B-cell proliferation — the role of serum B lymphocyte stimulator (BLyS/BAFF). **Rheumatology**, v.46, p.65–69, 2007.

SÈNE, D., et al. Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. **PLoS pathogens**, v.6(11),p.e1001184, 2010

SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER, M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p.558–67, 2005.

SHEPHERD, J. et al. Pegylated IFN -2a and -2b in combination with ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 8, n. 39, 2004.

SOUSA, G.M. et al. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. **Cytokine**, v.60(1), p.138-42, 2012.

SOUSA, G.M. et al. Autoimmunity in hepatitis C virus carriers: Involvement of ferritin and prolactin. **Autoimmunity Reviews**. v. 10. p. 210–213. 2011.

SOUSA-ATTA, M.L.B. et al. Autoimmune aspects of hepatitis C in Bahia (Brazil). **Journal of Clinical Rheumatology**, v.12, p. S6-S6, 2006.

SPAAN, M., JANSSEN, H.L., BOONSTRA, A. Immunology of hepatitis C virus infections. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 26(4), p.391-400, 2012.

STURM, N. et al. Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. **The Journal of Hepatology**, v.53(1), p.25-35, 2010.

- SUNDSTRÖM, S. et al. Hepatitis C virus core protein induces an anergic state characterized by decreased interleukin-2 production and perturbation of mitogen-activated protein kinase responses. **Journal of Virology**, v.79(4), p.2230-9, 2005.
- TANIGUCHI, H. et al. Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. **Journal of Medical Virology**, v.72(1), p.52-9, 2004.
- THOMAS, D. L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, v. 461, p. 798–801, 2009.
- THOMAS, D. L. et al. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. **The Journal of the American Medical Association**, v. 284, p. 450-6, 2000.
- TILLMANN, H. L. et al. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. **Gastroenterology**, v. 139, p.1586-92, 2010.
- TIMM, J. et al. CD8 Epitope Escape and Reversion in Acute HCV Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v.200, p.1593-1604, 2004.
- TSENG, C.T.; KLIMPEL, G.R. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. **Journal of Experimental Medicine**, v.195(1), p.43-9, 2002.
- VERGANI, D.; MIELI-VERGANI, G. Autoimmune manifestations in viral hepatitis. **Seminars in Immunopathology**, v.35(1), p.73-85, 2013.
- WARD, S.M., et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. **Journal of Hepatology**, v.47(3), p.316-24, 2007.
- WHERRY, E.J. et al. T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v.12, p.492-499, 2011.
- WIELAND, S. et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. **Hepatology**, v.59, p.2221-30, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Hepatitis C – 2002. Geneva: WHO, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>>.
- YONEDA, S., et al; Nagano Interferon Treatment Research Group. Association of serum cytokine levels with treatment response to pegylated interferon and ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v.203(8), p.1087-95, 2011.
- ZHAI, N., et al. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. **Cellular & Molecular Immunology**, 2014.
- ZIGNEGO, A.L. et al. Italian Association of the Study of Liver Commission on Extrahepatic Manifestations of HCV infection. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection:

a general overview and guidelines for a clinical approach. **Digestive and Liver Disease**, v.39(1), p.2-17, 2007.

## 6 ANEXOS

## Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: Células T regulatórias na hepatite viral C crônica
---

Pesquisador Responsável Isabela Silva de Oliveira
---

Data da Versão 04/11/2010
---------------------------

Cadastro 103
--------------

Data do Parecer 26/05/2011
----------------------------

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais
--

## Objetivos do Projeto

## OBJETIVO GERAL

Investigar a frequência e função de células T regulatórias em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C, com e sem manifestações de autoimunidade, antes, durante e após tratamento.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar quantitativamente os linfócitos T, B e NK do sangue periférico de portadores do HCV, antes e nas semanas 4 e 12 pós tratamento e controles sadios.
2. Determinar a frequência de células T regulatórias CD4+CD25+FoxP3 nesses indivíduos, nos períodos referidos acima.
3. Comparar o número das células Treg CD4+CD25+FoxP3+ nos portadores do HCV antes, 4 e 12 semanas do tratamento antiviral.
4. Determinar os níveis séricos das citocinas IL-2, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  nestes indivíduos.
5. Avaliar a resposta funcional de células T regulatórias ex vivo, através da produção das citocinas IL-2, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ , frente a antígenos do core do HCV.
6. Correlacionar os resultados obtidos com manifestações de autoimunidade nos pacientes.

## Sumário do Projeto

Trata-se de estudo que visa avaliar a frequência das células T regulatórias em indivíduos portadores de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, sua relação com a presença de marcadores de autoimunidade e resposta ao tratamento.

Neste estudo serão incluídos 20 indivíduos de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Complexo Hospitalar HUPES, diagnosticados clinicamente e sorologicamente para hepatite C (ELISA de 3ª geração), demonstração de RNA viral no sangue, genotipagem, carga viral e histopatologia de biópsia hepática. Serão selecionados inicialmente indivíduos sem tratamento prévio antiviral, e que serão avaliados após 4 e 12 semanas do início do tratamento antiviral. Serão adotados os seguintes critérios de exclusão: co-infecções virais por HIV, HTLV e vírus da hepatite B ou presença de outras enfermidades crônicas.

O grupo controle será representado por 20 doadores sadios de sangue, pareados por sexo, e de idade mais próxima possível à do grupo alvo.

As amostras serão coletadas antes do início do tratamento e durante o tratamento antiviral (4 e 12 semanas).

As análises estatísticas serão realizadas utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., USA).

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	



Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Comentário
Tamanho de amostra	Total 20 Na Instituição 20
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

<b>Aprovar</b>
----------------

Comentários Gerais sobre o Projeto

**Projeto Aprovado.**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e ao término do estudo.

  
 ROBERTO BADARÓ, MD PHD  
 Coordenador CEP  
 CHUPES

Página 2-2  
Versão 01/2004

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da Pesquisa:** Células T regulatórias na hepatite viral C crônica

**Investigador:** Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, telefone 71 3283-6972.

**Objetivos e antecedentes:** Trata-se de estudo que visa avaliar a expressão e frequência de células T regulatórias em sangue periférico de indivíduos portadores da hepatite viral C, como possível interferente da resposta imunológica ao vírus e à resposta ao tratamento, que será desenvolvido com indivíduos incluídos nos protocolos de tratamento no Ambulatório de Assistência Farmacêutica do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, da Universidade Federal da Bahia. Neste estudo também será utilizado um grupo controle, formado por indivíduos sadios. Estes últimos só participarão do procedimento 1, descrito abaixo.

**Procedimentos:** Se eu concordar em participar deste estudo, acontecerá o seguinte:

1. Retirada de uma pequena quantidade do meu sangue, cerca de 20 mililitros, através de coleta realizada em uma das veias do meu antebraço, para que sejam realizados exames laboratoriais de autoimunidade (reação imunológica produzida no meu organismo contra diversos componentes do meu próprio corpo), exames hematológicos (hemograma e determinação das subpopulações de linfócitos) e bioquímicos (enzimas hepáticas, creatinina).
2. Depois de iniciado o meu tratamento, recomendado pela equipe médica responsável pelo meu acompanhamento clínico, devo comparecer na 4ª e na 12ª semana (1 mês e 3 meses, respectivamente) no endereço da Rua Barão de Jeremoabo, s/nº, Faculdade de Farmácia, bairro de Ondina (tel.: 71 – 3283-6972), onde terei novamente meu sangue coletado, cerca de 15 mililitros, para que sejam repetidos os exames laboratoriais de autoimunidade, exames hematológicos (hemograma e determinação das subpopulações de linfócitos) e bioquímicos (enzimas hepáticas e creatinina), para avaliação da resposta que estou apresentando aos medicamentos que estou usando.

**Benefícios:** Posso não ter benefícios diretos da participação nesta pesquisa, como também não receberei nenhum auxílio financeiro por esta minha atitude de participar dela. O único benefício que terei será a avaliação laboratorial, sem nenhum custo, a qual poderá ou não causar novas condutas clínicas e/ou tratamentos pela equipe médica responsável que me acompanha.

**Riscos:** Nesta pesquisa não usarei nenhum outro medicamento ou produto. Sei, e também fui informado (a) que as coletas do meu sangue não oferecem nenhum risco para minha saúde, assim como não poderá causar nenhuma reação adversa futura ao meu organismo. Haverá apenas um desconforto causado pela agulha durante os procedimentos de coleta de sangue, que não dura mais que um minuto. Eventualmente podem ocorrer hematomas. Caso a formação do hematoma seja identificada durante a punção, deve-se retirar imediatamente o torniquete e a agulha. É necessária uma compressão local durante pelo menos dois minutos. O uso de compressas frias pode auxiliar na atenuação da dor local. O hematoma desaparece naturalmente. O procedimento de dobrar o braço após a retirada da agulha e/ou carregar objetos relativamente pesados logo após a coleta contribui para a formação do hematoma mesmo após uma coleta de sangue bem sucedida.

**Confidencialidade:** Os resultados dos exames de sangue realizados durante o estudo serão enviados à equipe médica que me acompanhará durante o meu tratamento, aos quais terei acesso se for minha vontade. Com exceção dessa liberação de resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para fins de pesquisa, cujos resultados obtidos neste estudo (de todos os pacientes juntos, sem que nenhum seja identificado individualmente) serão publicados em congressos e revistas médicas, o que permitirá avanços no conhecimento da hepatite C crônica no Brasil, ajudando

outros pacientes como eu. Minha identidade e privacidade serão mantidas em segredo de acordo com a lei de Pesquisa em Seres Humanos.

**Questões:** \_\_\_\_\_, colaborador da pesquisa, discuti essas informações comigo, oferecendo-se para responder minhas dúvidas. Caso eu tenha perguntas adicionais, poderei ligar para o telefone \_\_\_\_\_, ou a Dra. Maria Luiza Atta, coordenadora do estudo, pelo telefone 3283-6972.

**Direito de recusa ou desistência:** Minha participação no estudo é totalmente voluntária, sendo eu livre para recusar a tomar parte ou abandonar a pesquisa a qualquer momento sem afetar ou pôr em risco meu futuro atendimento médico.

**Consentimento:** Concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia do presente termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

Salvador, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

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

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_