



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**



**CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO  
CELULAR E PERFIL DE CITOCINAS EM DOADORES DE  
SANGUE INFECTADOS COM O VÍRUS DA HEPATITE C**

**DANIEL BARROS DE CASTRO**

**MANAUS, 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM PATOLOGIA TROPICAL**

**DANIEL BARROS DE CASTRO**

**CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO  
CELULAR E PERFIL DE CITOCINAS EM DOADORES DE  
SANGUE INFECTADOS COM O VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração Etiopatogênese, Clínica e Ações Básicas de Saúde.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Malheiro

**MANAUS, 2010**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Castro, Daniel Barros de

**C355C** Caracterização de moléculas de adesão celular e perfil de citocinas em doadores de sangue infectados com o vírus da hepatite C / Daniel Barros de Castro. ó Manaus, 2010.

83f. il. color.

Dissertação (mestrado em Patologia Tropical) ó Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Malheiro

1. Doadores de sangue 2. Hepatite C 3. Adesão celular I Malheiro, Adriana (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 2007 616.36-002(811.3)(043.3)

**DANIEL BARROS DE CASTRO**

**CARACTERIZAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO  
CELULAR E PERFIL DE CITOCINAS EM DOADORES DE  
SANGUE INFECTADOS COM O VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração Etiopatogênese, Clínica e Ações Básicas de Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Malheiro  
Universidade Federal do Amazonas  
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cristina dos Santos, Membro Interno  
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Flamir da Silva Victoria, Membro Externo  
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

## **DEDICATÓRIA**

*À minha mãe, fonte de força e norte da minha vida.*

*õNavegar é preciso,  
Viver não é preciso.ö*

**Castro Alves**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa, Tatiane Amabile, pelo incentivo e apoio incondicional a todas as minhas conquistas e pela satisfação com vitórias minhas mais do que com as próprias.

À minha família pela compreensão, apoio e incentivo ao meu sucesso pessoal e profissional.

À Dra. Adriana Malheiro pela sua valiosa orientação, confiança e compreensão, sem os quais este trabalho nunca teria sido possível.

À Dra. Kátia Torres pelo apoio e incentivo.

Um especial agradecimento à Dra. Lee Chen Chen pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e estímulo.

Um especial agradecimento ao meu grande amigo Victor Landeiro pelo apoio e incentivo.

A todos os colegas de laboratório pelo relevante apoio, não medindo esforços para me ajudar e incentivar a concluir este projeto.

Aos diretores e amigos da Fundação de Vigilância em Saúde pela compreensão nas minhas ausências durante a realização deste trabalho.

À Fundação HEMOAM pelo apoio técnico e estrutural.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A hepatite C é um grande problema de saúde pública atual, com aproximadamente 170 milhões de pessoas infectadas no mundo todo. O HCV é um agente infeccioso altamente imunogênico levando ao desenvolvimento de uma intensa resposta imune humoral e celular. Entretanto, cerca de 80% dos pacientes evoluem para uma doença crônica, podendo desenvolver cirrose hepática ou câncer. A infecção das células pelo HCV rapidamente desencadeia eventos sinalizadores intracelulares que levam à produção de citocinas e a mudanças no padrão de expressão de moléculas de adesão celular, propiciando uma barreira à replicação e à disseminação viral. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a expressão de moléculas de adesão e o perfil de citocinas em sangue periférico de doadores de sangue da Fundação HEMOAM infectados pelo vírus da hepatite C. Para isso, foram analisadas amostras de sangue de 50 indivíduos que apresentaram reatividade nos teste da triagem sorológica para HCV e, como controle negativo, foram analisadas 53 amostras de doadores de sangue saudáveis. Para fenotipagem dos leucócitos quanto a expressão de moléculas de adesão celular as amostras foram marcadas com anticorpos monoclonais e analisadas por citometria de fluxo. A quantificação da concentração sérica das citocinas de perfil Th1, Th2 e Treg foi realizada por ELISA. A prevalência de infecção por HCV na população de doadores de sangue da Fundação HEMOAM, residentes em Manaus, no período de agosto/2009 a julho/2010, foi de 0,1%, sendo mais prevalente no grupo de primodoadores, quando comparado aos doadores de repetição. Foi observado que a expressão das moléculas de adesão celular em leucócitos no sangue periférico é influenciada pela infecção por HCV, o que resulta em alterações no padrão de recrutamento de leucócitos para o fígado e, conseqüentemente, altera o curso da doença. Há evidências de que a resposta imune contra o HCV, na população de doadores de sangue, apresente uma polarização para o perfil Th1, caracterizada por uma alta concentração de IL-12 e IL-10 no sangue periférico. A concentração de citocinas no sangue periférico de doadores infectados pelo HCV apresentou correlação com o padrão de expressão de moléculas de adesão celular dos leucócitos. Contudo, nossos resultados reforçam a importância da relação entre as moléculas de adesão celular, a produção de citocinas e a infecção pelo HCV.

Palavras Chave: Hepatite C, resposta imune, moléculas de adesão celular, citocinas.

## ABSTRACT

Hepatitis C is a major public health problem today, with approximately 170 million people infected worldwide. HCV is a highly immunogenic infectious agent leading to the development of an intense humoral and cellular response. However, about 80% of patients progress to a chronic disease may develop cirrhosis or liver cancer. The HCV infection of cells rapidly triggers intracellular signaling events leading to cytokine production and changes in the pattern of expression of cell adhesion molecules, providing a barrier to replication and viral spread. The aim of this study was to characterize the expression of adhesion molecules and cytokine profile in peripheral blood from blood donors of the Foundation HEMOAM HCV positive. For this, we analyzed blood samples from 50 individuals who were reactive in serological screening test for HCV, and as a negative control, we analyzed 53 samples of healthy blood donors. For analysis of expression of cell adhesion molecules in leukocytes, the samples were stained with monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry. Quantification of serum cytokine Th1, Th2 and Treg profile was performed by ELISA. The prevalence of HCV infection in the population of blood donors of the Foundation HEMOAM living in Manaus, from August/2009 to July/2010, was 0.1% and was greater prevalent in the group of first-time blood donors, compared to repeat blood donors. It was observed that the expression of cell adhesion molecules on leukocytes in peripheral blood is influenced by HCV infection, resulting in changes in the pattern of leukocyte recruitment to the liver and thus alters the course of the disease. There is evidence that the immune response against HCV in the population of blood donors, provide a toward Th1 profile, characterized by a high concentration of IL-12 and IL-10 in peripheral blood. The concentration of cytokines in peripheral blood from donors infected with HCV correlated with the expression pattern of cell adhesion molecules of leukocytes. However, our results reinforce the importance of the relationship between cell adhesion molecules, cytokine production and HCV infection.

Keywords: hepatitis C, immune response, cell adhesion molecules, cytokines.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Prevalência de HCV estimada por região .....	14
<b>Figura 2</b>	Partícula viral do HCV formada pelo envelope viral, glicoproteínas, nucleocapsídeo (Core) e RNA fita simples positiva .....	17
<b>Figura 3</b>	Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do Brasil .....	21
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática da história natural da hepatite C .....	23
<b>Figura 5</b>	Processo de adesão e transmigração de leucócitos dos vasos sanguíneos ao tecido infectado.....	31
<b>Figura 6</b>	Esquema da diluição seriada do padrão de citocinas, conforme recomendações do kit Opteia <sup>™</sup> Set Human (BD).....	39
<b>Figura 7</b>	Dot Blot da população de leucócitos segundo o tamanho ( <i>Forward Scatter</i> - FSC) e granulocidade ( <i>Side Scatter</i> - SSC).....	41
<b>Figura 8</b>	Sobreposição do histograma da intensidade de fluorescência da amostra sem marcador (controle) e da amostra com marcador .....	42
<b>Figura 9</b>	<i>Scatter dot plot</i> da razão média do número de células T CD4+/CD8+, classificado por grupo.....	53
<b>Figura 10</b>	<i>Scatter dot plot</i> da concentração de citocinas séricas, classificado por grupo.....	58
<b>Figura 11</b>	Correlação entre as intensidades de fluorescência (IF) de VLA-4 (CD11a) e os níveis séricos de IL-12 de indivíduos infectados pelo HCV.....	63

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b>	Tipos de selectinas, locais de expressão e ligantes .....	29
<b>Tabela 2</b>	Representantes das integrinas tipos 1 e 2, principais ligantes e funções ..	30
<b>Tabela 3</b>	Características dos marcadores de superfície celular.....	40
<b>Tabela 4</b>	Prevalência de reatividade para HCV em doadores de sangue da Fundação HEMOAM, considerando os diferentes testes diagnósticos.....	49
<b>Tabela 5</b>	Características demográficas e epidemiológicas dos indivíduos participantes do estudo classificado por grupo.....	51
<b>Tabela 6</b>	Comparação do número médio de células circulantes por mililitro de sangue periférico entre os grupos HCV reativo e Controle negativo.....	52
<b>Tabela 7</b>	Comparação dos níveis de expressão de moléculas de adesão celular em linfócitos do sangue periférico dos grupos HCV reativo e Controle negativo .....	54
<b>Tabela 8</b>	Comparação das concentrações de citocinas no sangue periférico entre os grupos HCV reativo e Controle negativo.....	57
<b>Tabela 9</b>	Correlação entre as intensidades de fluorescência (IF) de diferentes moléculas de adesão celular (MAC-1, LFA-1 e VLA-4) nas subpopulações de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> ).....	62
<b>Quadro 1</b>	Gradiente de temperatura no termociclador.....	43
<b>Quadro 2</b>	Sequencia de nucleotídeos dos iniciadores HC11 e HC18.....	44
<b>Quadro 3</b>	Programa utilizado no termociclador para a reação de amplificação por PCR.....	44
<b>Quadro 4</b>	Programa utilizado no termociclador <i>Mastercycler Gradient ó Eppendorf</i> para a primeira reação do Nested-PCR.....	45
<b>Quadro 5</b>	Sequência de nucleotídeos iniciadores P32, P36, P33 e P48.....	46
<b>Quadro 6</b>	Programa utilizado no termociclador para a segunda reação do Nested-PCR.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
+	Soma
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°C	Graus Cécius
μ	Micro
μg	Micro grama
μM	Micro molar
AC-1°	Anticorpo primário
AC-2°	Anticorpo secundário
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HBsAg	Anticorpos contra antígenos do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpos contra antígenos do vírus da hepatite C
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BDCA2	Blood dendritic cell antigen 2
BD	Becton, Dickinson
CA	Califórnia
CD	Grupos de diferenciação ( <i>Clusters of differentiation</i> )
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos
cDNA	Ácido desoxirribonucleosídeo complementar
CEP	Comitê em Ética em Pesquisa
DC	Célula Dendrítica
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
dNTP	Dideoxynucleotídeo trifosfato
dsRNA	Ácido ribonucleico de fita dupla ( <i>double stranded RNA</i> )
E1	Proteína 1 do Envelope do HCV
E2	Proteína 2 do Envelope do HCV
EDTA	etilenodiaminotetraacetato
ELISA	Teste Imunoenzomático ( <i>enzyme-linked immunosorbant assay</i> )
FITIC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FL	Fluorescência
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gravidade
GlyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
HBV	Vírus da Hepatite B

<b>HCC</b>	Carcinoma Hepato Celular
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HEMOAM</b>	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>HIV-1</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HTLV</b>	Vírus T-linfotrópico humano
<b>IF</b>	Intensidade de fluorescência
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>kb</b>	Kilo base
<b>KC</b>	Células de Kupfer
<b>kD</b>	Kilo Dalton
<b>LFA-1</b>	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>Linf.</b>	Linfócitos
<b>L-SIGN</b>	<i>Liver/lymphnode-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin</i>
<b>M</b>	Molar
<b>MAC</b>	Molécula de Adesão Celular
<b>MDC</b>	Células Dendríticas Mielóides
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MHC</b>	Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade
<b>Min.</b>	Minutos
<b>MIP</b>	Proteína Inflamatória de Macrófago
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mL</b>	Micro litros
<b>mM</b>	Mili molar
<b>M-MLV</b>	Leucemia Murina de Moloney
<b>N</b>	Normal
<b>NCR</b>	Região não codificadora ( <i>Noncoding Region</i> )
<b>NJ</b>	<i>New Jersey</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NKT</b>	<i>Natural Killer T</i>
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>NS2</b>	Proteína Não Estrutural 2 do HCV
<b>NS3</b>	Proteína Não Estrutural 3 do HCV
<b>NS4A</b>	Proteína Não Estrutural 4A do HCV
<b>NS4B</b>	Proteína Não Estrutural 4B do HCV
<b>NS5A</b>	Proteína Não Estrutural 5A do HCV
<b>NS5B</b>	Proteína Não Estrutural 5B do HCV
<b>NTPase</b>	Nucleosil Trifosfato Hidrolase
<b>ORF</b>	<i>Open Read Frame</i>
<b>PBS</b>	Solução Salina Tamponada de Fosfato
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDC</b>	Células Dendríticas Plasmocitóides
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>

<b>pg</b>	Picogramas
<b>PMN</b>	Leucócitos Polimorfonucleares
<b>PPT</b>	<i>Plasma Preparation Tube</i>
<b>PSGL-1</b>	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
<b>RIBA</b>	<i>Recombinant Immunoblotting Assays</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>RT</b>	Transcriptase reversa
<b>s</b>	Segundos
<b>SAv-HRP</b>	Estreptoavidina ...
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SSC</b>	<i>Side Scartter</i>
<b>ssRNA</b>	Ácido Ribonucléico de fita simples ( <i>single stranded RNA</i> )
<b>ssRNA+</b>	Ácido Ribonucléico de fita simples e polaridade positiva
<b>TC</b>	<i>Tri-color</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGF</b>	Fator de Crescimento Transformante
<b>Th</b>	<i>T-helper</i>
<b>TLR</b>	Receptores <i>Toll-like</i>
<b>TMA</b>	Amplificação Mediada por Transcrição
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>Tregs</b>	T-Regulatórias
<b>î</b>	<i>Team</i>
<b>U</b>	Uracila
<b>UDI</b>	Usuários de Drogas Injetáveis
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
<b>VDRL</b>	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
<b>VLA</b>	<i>Very Late Antingens</i>
	Alfa
	Beta
	Gama
2	Qui-quadrado

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Epidemiologia da Hepatite C</b> .....	14
<b>1.2 Vias de transmissão</b> .....	15
<b>1.3 O vírus da Hepatite C</b> .....	16
<b>1.4 Genótipos virais do HCV</b> .....	20
<b>1.5 História natural e quadro clínico da hepatite C</b> .....	22
<b>1.6 Imunopatogênese do HCV</b> .....	24
1.6.1 Entrada e replicação do HCV nas células hospedeiras .....	24
1.6.2 Resposta imune inata e adaptativa .....	24
1.6.3 Recrutamento de leucócitos para o tecido infectado .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>2.1 Geral</b> .....	34
<b>2.2 Específicos</b> .....	34
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	35
<b>3.1 Delineamento do Estudo</b> .....	35
<b>3.2 Aspectos éticos e de biossegurança</b> .....	35
<b>3.3 Casuística, população de estudo e critérios de inclusão e exclusão</b> .....	35
<b>3.4 Coleta, processamento e armazenamento de material biológico</b> .....	36
<b>3.5 Triagem e confirmação para o HCV</b> .....	37
<b>3.6 Ensaaios laboratoriais</b> .....	38
3.6.1 Quantificação de citocinas circulantes em sangue periférico .....	38
3.6.2 Caracterização das subpopulações de leucócitos e das moléculas de adesão celular .....	40
3.6.3 Teste de Amplificação de Ácido Nucléico .....	42
3.6.3.1 Extração de RNA .....	42
3.6.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) .....	43
3.6.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	43
3.6.3.4 <i>Nested</i> -PCR .....	45
<b>3.7 Análise e interpretação de dados</b> .....	47
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>4.1 Caracterização das Subpopulações de Leucócitos e das Moléculas de Adesão Celular</b> .....	52
<b>4.2 Perfil de Citocinas em Sangue Periférico</b> .....	56
<b>4.3 Correlação entre Moléculas de Adesão Celular e Citocinas</b> .....	60
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>APÊNDICES</b> .....	70

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia da Hepatite C

A hepatite causada pelo vírus C constitui um grave problema mundial de saúde pública que resulta em uma evolução da doença que pode variar desde a eliminação viral até o desenvolvimento de doenças de fígado terminais ou carcinoma hepatocelular. Estima-se que, aproximadamente, 170 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV), o que corresponde a aproximadamente 3% da população mundial (figura 1) (LAVANCHY, 2009). Destes, aproximadamente 80% apresentam infecção crônica, servindo como um reservatório para transmissão a outras pessoas, podendo desenvolver fibrose no fígado, cirrose ou carcinoma hepatocelular (KANTO; HAYASHI, 2006).

Dados do Ministério da Saúde e da Organização Mundial de Saúde apontam a que a infecção pelo HCV abrange 2% dos brasileiros, o que equivale a aproximadamente 3 milhões de pessoas (MEMON; MEMON, 2002). Trabalhos realizados na região Amazônica, apontam variações entre 0 e 3,6 % na prevalência do HCV (SOUTO et al. 1996; SOUTO et al. 1999; PAULA et al. 2001).

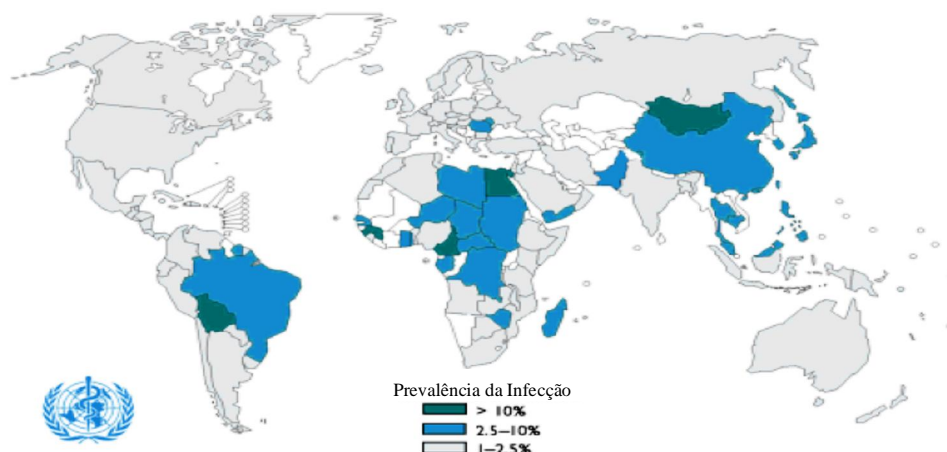


Figura 1. Prevalência de HCV estimada por região. Fonte: *The Global Burden of Hepatitis C Working Group, 2004*

## 1.2 Vias de transmissão

O HCV é encontrado em elevadas concentrações no sangue periférico do indivíduo infectado, sendo transmitido principalmente por exposição ao sangue contaminado e seus derivados (ROSEN; GRETCH, 1999; STRAUSS, 2001; WONG; LEE, 2006; DUSCHEIKO, 2007). As principais vias de disseminação do HCV são: parenteral, que consiste em transfusão de sangue e derivados, agulhas contaminadas e de materiais odontológicos não descartáveis, materiais cortantes, seringas e hemodiálise; sexual, por meio de sêmen, saliva, secreção vaginal, contendo partículas virais; e materno-fetal, quando, durante o nascimento, o bebê é contaminado por mãe recém infectada ou portadora crônica (CAVALHEIRO, 2004).

As transfusões sanguíneas foram por muito tempo a principal via de transmissão do HCV. Com a implementação das diretrizes de triagem de doadores de sangue e a disponibilização de kits comerciais para detecção de anticorpos anti-HCV em bancos de sangue, houve a diminuição progressiva dos casos de hepatite pós-transfusionais, a partir de 1993. Com a redução da incidência de casos de hepatite pós-transfusionais, os usuários de drogas injetáveis (UDI) constituíram-se no principal grupo de risco no mundo, com incidência e prevalência crescentes, assumindo proporções de até 90% de positividade neste grupo (MCCRUDEN et al., 1996).

A infecção pelo HCV também é comum em pacientes submetidos à hemodiálise, apresentando prevalência que variam de 3,4% em pacientes hemodialisados da Holanda, a mais de 70% no Oeste da Europa (SCHNEEBERGER et al., 2000; VLADUTIU et al., 2000). Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa encontrou uma soroprevalência de 13,9 %, de HCV positivos, na população de hemodialisados na Clínica Renal de Manaus (MAIA et al., 2009). Embora as taxas de incidência de HCV neste grupo de pacientes estejam em declínio, devido às rigorosas medidas de controle de higiene adotadas pelos centros de diálise,



pacientes hemodialisados são de extrema importância para a infecção pelo HCV, uma vez que surtos esporádicos podem ocorrer nestes centros.

Embora a transmissão intrafamiliar não seja bem documentada, vários estudos relatam casos de transmissão sexual, vertical e relacionamento familiar com soropositivos como fontes de contaminação (CHIARAMONTE et al., 1996; MASTROMATTEO et al., 2001; KEISERMAN et al., 2003; CAVALHEIRO, 2004). O risco de transmissão perinatal de mães portadoras de HCV é considerado baixo (<6%), porém alguns estudos apontam que este risco aumenta quando a mãe é co-infectada com HIV (ZEIN, 1997).

Existem, ainda, outros fatores considerados de risco para a infecção pelo HCV. A utilização de agulhas de acupuntura, tatuagens, colocação de *piercing*, encarceramento e serviço militar tem sido avaliados em estudos de caso-controle de infecção aguda (ALTER et al., 1999; ALTER, 2002).

### **1.3 O vírus da hepatite C**

A identificação do agente etiológico da hepatite C deveu-se aos estudos da *Chiron Corporation* e do *Center of Disease Control and Prevention* (CDC) norte americano. Embora sua existência fosse reconhecida desde a década de 70, somente em 1989 que Choo e colaboradores, com o uso de técnicas de biologia molecular, conseguiram isolar antígenos que reagiam contra o soro de pessoas infectadas com a hepatite não-A não-B.

O HCV é um vírus emergente, classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, membro da família *Flaviviridae* (SHUKLA et al., 1995). A partícula viral, medindo de 55 a 65nm de diâmetro, é formada por um envelope lipídico, onde se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2, um capsídeo protéico formado pela proteína viral Core e o Genoma viral constituído por

ácido ribonucléico linear, de fita simples e de polaridade positiva (ssRNA+), conforme esquema da figura 2 (STRAUSS, 2001).

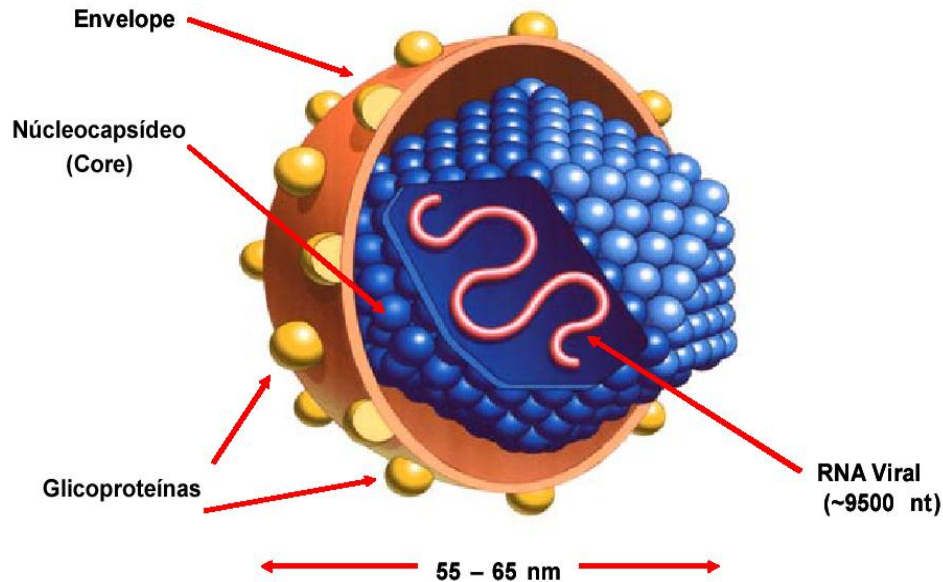


Figura 2. Partícula viral do HCV formada pelo envelope viral, glicoproteínas, nucleocapsídeo (*Core*) e RNA fita simples positiva. Fonte: James, 2001, modificado.

O genoma viral é constituído por uma fita simples e de sentido positivo de RNA, com aproximadamente 9,6 kilobases, organizado em uma região 5' não-codificadora (5'NCR), uma região que possui uma única fase de leitura (ORF-*Open Read Frame*) que codifica uma grande poliproteína e uma região 3' não-codificadora (3'NCR) (TAYLOR; SHI, 2000; TAN; KATZE, 2001).

A região 5'NCR é altamente conservada entre diferentes isolados de HCV distribuídos ao longo do mundo e, por este motivo, consiste na região de escolha para o diagnóstico do HCV por técnicas de biologia molecular (MORADPOUR; BLUM, 2004; PENIN, 2004; BRASS et al, 2006).

A região 3'NCR consiste de uma pequena região variável de 40 nucleotídeos, uma sequência poli(U)/polipirimidinas, seguido por uma sequência de 98 nucleotídeos que também é altamente conservada entre diferentes genótipos do HCV. Acredita-se que a região 3'NCR

tenha um papel importante na iniciação da replicação do genoma viral (MORADPOUR; BLUM, 2004).

A *ORF* do genoma do HCV codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que, ao ser processada por proteases celulares e virais, formará proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais do HCV compreendem o core e as glicoproteínas E1 e E2, além das proteínas F e p7. As proteínas NS2, NS3, NS4 e NS5 representam as não estruturais (MORADPOUR; BLUM, 2004; PENIN, 2004).

O core é uma proteína ligante de RNA com propriedades químicas básicas que forma o nucleocapsídeo viral. Estudos relatam que esta proteína interage com várias proteínas celulares e afeta algumas funções das células do hospedeiro como a transcrição gênica, metabolismo de lipídeos, o processo de apoptose e também várias vias de sinalização celular. Tem sido associada também com a indução de esteatose e com o carcinoma hepatocelular (BRASS et al., 2006).

As glicoproteínas do envelope E1 e E2 são proteínas transmembranas com regiões C-terminal hidrofóbicas. E1 e E2 formam heterodímeros ligados não covalentemente que se acredita representarem os blocos construtores do envelope viral (PENIN, 2004; BRASS et al., 2006).

A proteína não estrutural NS2 do HCV apresenta atividade de protease zinco dependente. A clivagem da junção NS2/3 é realizada pela atividade autoproteásica da NS2 e do terceiro N-terminal da NS3. Embora a atividade de protease NS2-3 seja essencial para a replicação *in vivo*, ainda não está claro se a proteína NS2 possui alguma atividade após separação da NS3 (PAWLOTSKY, 2004; BRASS et al., 2006).

A NS3 é uma proteína multifuncional possuindo atividades de helicase e NTPase (Nucleosil Trifosfato Hidrolase), desempenhando um papel crucial durante a replicação viral. A NS3 quando complexada com a NS4 é responsável pela clivagem das outras proteínas não

estruturais do vírus (PAWLOTSKY, 2004). A atividade enzimática de NTPase/helicase da NS3 parece ser indispensável para a replicação do RNA viral, sugerindo que ele atue desenrolando RNAs intermediários dupla fita replicativos, eliminando estruturas secundárias no RNA ou separando o genoma das proteínas ligantes de ácidos nucleicos (BRASS et al., 2006).

A região NS4 compreende duas proteínas: a NS4A, que atua como co-fator de NS3 e participa da hiperfosforilação da proteína NS5A (TANJI et al., 1995), e a NS4B, que é uma proteína integral de membrana e tem um papel essencial na formação do complexo de replicação viral, atuando como estrutura de fixação na membrana do retículo endoplasmático (PAWLOTSKY, 2004; BRASS et al., 2006), além de ter sido identificada como fator de inibição da atividade antiviral de INF- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) (XU et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que a NS5A tem um importante papel na regulação da NS5B através de um mecanismo ainda desconhecido (PAWLOTSKY, 2004). Entretanto, a NS5A parece ter outras propriedades adicionais, como a inibição da atividade antiviral do interferon, ativação transcricional e envolvimento na regulação da proliferação celular e das vias de ativação celulares (PAWLOTSKY, 2004).

A enzima chave da replicação que promove a síntese de novos genomas de RNA é a NS5B RNA polimerase (PAWLOTSKY, 2004). A organização estrutural dessa polimerase é semelhante a uma forma de mão direita, em que os subdomínios da enzima estão organizados ao redor do sítio ativo (BRASS et al., 2006). A replicação ocorre via síntese de uma fita de RNA complementar de polaridade negativa usando o genoma viral como molde, seguido da subsequente síntese de RNA genômico, a partir da fita negativa intermediária (MORADPOUR; BLUM, 2004; PENIN, 2004; BRASS et al., 2006).

#### 1.4 Genótipos virais do HCV

Devido ao grande número de mutações no genoma, estimada em  $10^{-3}$  substituições de nucleotídeos ao ano, o HCV apresenta grande heterogeneidade de tipos ou genótipos (GIANNINI; BRÉCHOT, 2003). Esta variabilidade é atribuída, sobretudo, à baixa fidelidade da enzima RNA-polimerase RNA-dependente que não possui atividade corretiva, permitindo, assim, a geração de variantes virais. Outros fatores, como a tentativa de escape da vigilância do sistema imunológico do hospedeiro e a alta taxa de replicação, demonstrada em estudos de cinética viral (ZEUZEM et al., 1996), podem, também, promover a elevada diversidade do HCV.

Estudos filogenéticos baseados na similaridade das seqüências, completa ou parcialmente conhecidas, dos isolados do HCV, indicam que existam pelo menos seis grupos distintos do vírus e mais de 50 subtipos. Os grupos são denominados por números (1 a 6) e os subtipos por letras minúsculas (a,b, c, etc). Possivelmente, após a análise completa de outras regiões do genoma dos isolados surgirão novos grupos e subgrupos (SIMMONDS et al, 2005).

Como consequência dessa diversidade genética, é conferido ao HCV a habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro, levando a altas taxas de infecção crônica. O conhecimento da variabilidade genética envolvida nas infecções é importante para compreender a evolução da doença, conduzir tratamento antiviral, monitorar estudos epidemiológicos, além de ter implicações importantes e decisivas no diagnóstico sorológico e molecular da infecção (CAMPIOTTO et al, 2005). A extensa heterogeneidade genética do HCV está relacionada ainda às dificuldades de desenvolvimento de vacinas e a deficiência na resposta terapêutica (NIH, 2002).

Os diferentes genótipos possuem importantes diferenças de distribuição geográfica (SY; JAMAL, 2006; ZEIN, 2000). Enquanto as formas 1a, 1b, 2a e 3a apresentam uma distribuição universal, os tipos 4, 5 e 6 parecem estar restritos a determinadas regiões (MELLOR et al., 1995; SIMMONDS, 2004). O genótipo 1 é o que mais prevalece mundialmente, sendo que sua freqüência varia de 40 a 80%, dependendo da região (CHOO et al., 1991; TAKADA et al., 1992; SIMMONDS et al., 1994).

No Brasil, a distribuição dos genótipos parece seguir o padrão (figura 3), sendo, o genótipo 1 o mais freqüente (64,9%), seguido do genótipo 3 (30,2%), 2 (4%), 4 (0,2) e o 5 (0,1%) (CAMPIOTTO et al., 2005). Na Região Norte, observou-se o predomínio do genótipo 1 (74,1%), seguido do genótipo 3 (24,7%) e o genótipo 2 (1,2%) (CAMPIOTTO et al, 2005). No estado do Amazonas, um estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, observou uma maior prevalência do genótipo 1 (87,1%), seguido do 3 (12,9%), em doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) (TORRES et al., 2009).

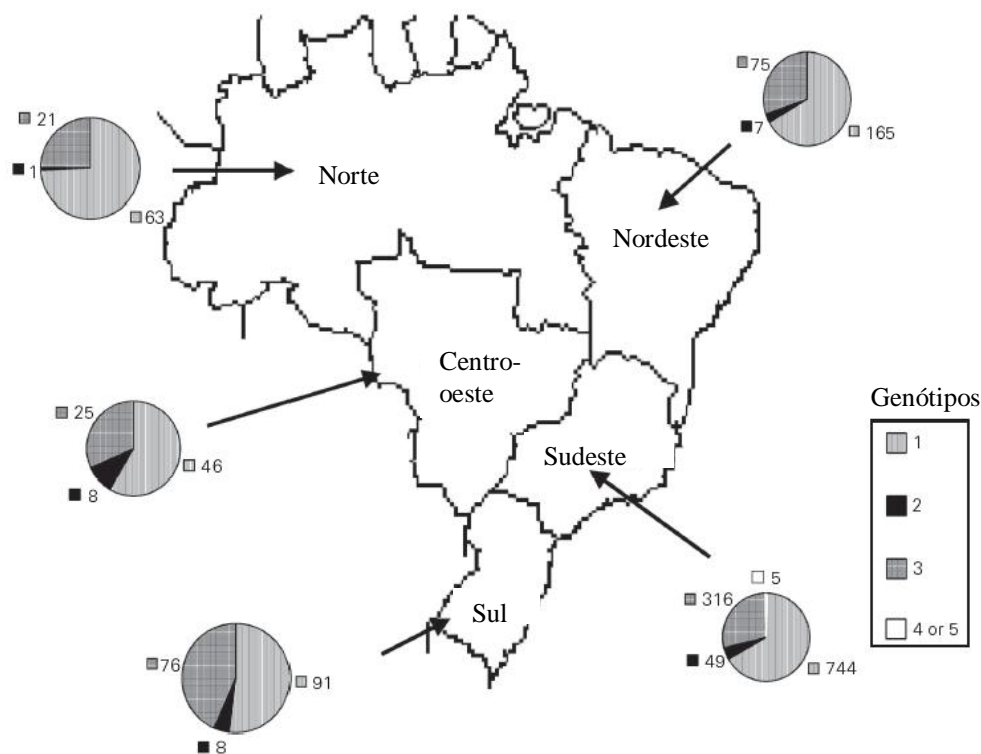


Figura 3. Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do Brasil. Apresenta o número absoluto de cada genótipo encontrado em cada região. Fonte: Campioto et al., 2005, modificado.

## 1.5 História natural e quadro clínico da hepatite C

A história natural da hepatite C é de difícil análise, pois tanto a fase aguda quanto o início da fase crônica, freqüentemente, são assintomáticas ou oligossintomáticas (LAUER; WALKER, 2001). Quando presentes na fase aguda, os sintomas se resumem aos de hepatite aguda ó icterícia, mal-estar, náusea.

Geralmente, apenas 15 a 25% das exposições ao HCV levam a uma infecção aguda resolvida (Figura 4) (GALE; FOY, 2005). Cerca de 80% dos indivíduos agudamente infectados falham em eliminar o vírus, desenvolvendo hepatite C crônica que uma vez estabelecida, a possibilidade de ocorrer eliminação do vírus espontaneamente é remota (KANTO; HAYASHI, 2006; PAWLOTSKY, 2003).

Os casos de hepatite C crônica são caracterizados por complicações a longo prazo, como a fibrose hepática, cirrose e o hepatocarcinoma (ALTER et al., 1992; LAUER; WALKER, 2001). Estima-se, ainda, que 20% dos pacientes portadores crônicos de HCV desenvolverão cirrose hepática após 20 anos de doença e que estes apresentam um risco anual de 1 a 4% para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (EASL, 1999; CALABRESE et al., 2004). O quadro clínico se torna mais evidente no início da fase crônica, com o surgimento de disfunção hepática, hipertensão portal, coagulopatias e hemorragias.

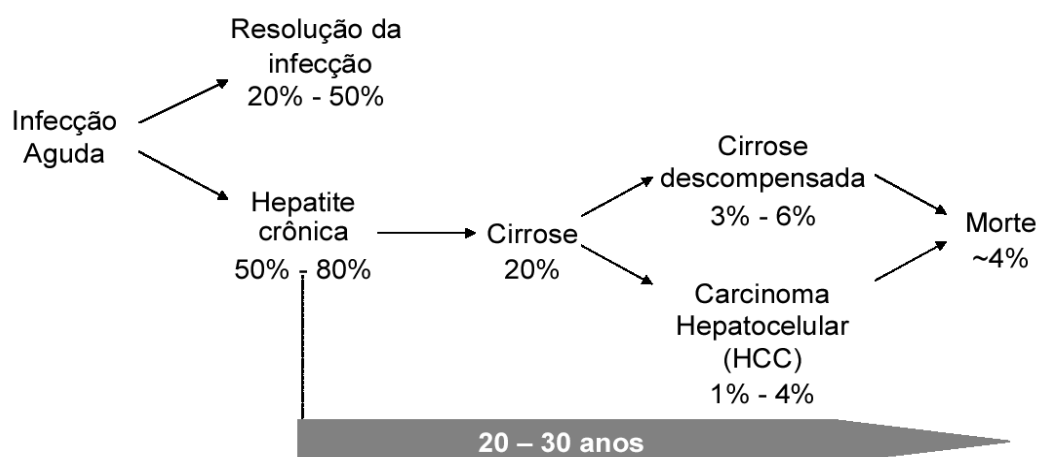


Figura 4. Representação esquemática da história natural da hepatite C. Fonte: Pawlotsky, 2004, modificado.

Evidências apontam que o desfecho da infecção pelo HCV é determinado pela interação entre o vírus e o sistema imunológico do hospedeiro, o qual responde com mecanismos efetores celulares, humorais e com citocinas, processos que, na maioria das vezes, são ineficazes para erradicar a infecção (NELSON, 2001). Existem, ainda, outros fatores que favorecem a progressão clínica da hepatite, tais como o consumo de álcool, indivíduos do sexo masculino, co-infecção com HIV-1 ou HBV e contrair o HCV em idade avançada (LAUER; WALKER, 2001).

Além da doença hepática, há importantes manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV, sendo a maioria destas síndromes associadas a estados autoimunes ou linfoproliferativos, provavelmente em consequência da replicação do HCV em células linfóides (LAUER; WALKER, 2001). Dentre estas manifestações, as mais comuns são o desenvolvimento de vasculites no tecido cutâneo, fenômeno de Raynaud, púrpuras, porfíria cutânea tardia, manifestações neurológicas, desordens auto-imunes como doenças do colágeno, Síndrome de Sjogren, tireoidites, glomerulonefrites membrano-proliferativas, poliarterite nodosa, crioglobulinemia mista e também a associação com vários auto-anticorpos teciduais (CACOUB et al. 1994; GUMBER; CHOPRA, 1995; PAWLOTSKY et al. 1995; CACOUB et al. 2000; RAMOS-CASALS et al. 2005).



## **1.6 Imunopatogênese do HCV**

### **1.6.1 Entrada e replicação do HCV nas células hospedeiras**

Os mecanismos pelos quais o HCV entra nos hepatócitos e em outras células suscetíveis ainda são pouco conhecidos, principalmente devido a escassez de sistemas de cultura celular que possibilitem estudar a infecção por esse vírus. Estudos sugerem que a fase inicial de infecção pelo HCV envolve a interação da glicoproteína E2 do envelope viral com receptores celulares como: CD81 (PILERI et al., 1998; ZHANG et al., 2004), receptor *scavenger* de classe B tipo I (SCARSELLI et al., 2002), DC-SIGN (LOZACH et al., 2003; POHLMANN et al., 2003) e L-SIGN do fígado e linfonodos (LOZACH et al., 2003; GARDNER et al., 2003).

### **1.6.2 Resposta imune inata e adaptativa**

A primeira linha de defesa do hospedeiro é constituída pela imunidade inata que, por meio de barreiras físicas, componentes celulares e componentes solúveis, é responsável por eliminar patógenos como vírus, bactérias ou fungos (STEINMAN; HEMMI, 2006; PAWLOTSKY, 2006). As células que participam da resposta imune inata incluem os monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), leucócitos polimorfonucleares (PMN), células natural killer (NK) e células natural killer T (NKT), as quais são equipadas com receptores que reconhecem os patógenos (STEINMAN; HEMMI, 2006). Monócitos, macrófagos e leucócitos PMN atuam como efetores e reguladores do processo inflamatório devido sua capacidade de capturar os patógenos e produzir espécies reativas de oxigênio e

citocinas pró-inflamatórias. As DCs são especializadas na apresentação de antígenos e na indução da ativação de células T por meio da expressão de moléculas co-estimulatórias e da produção de citocinas, enquanto as células NK promovem interação com as células infectadas pelo vírus, linfócitos T e DCs. (KAISHO; AKIRA, 2000; STEINMAN; HEMMI, 2006).

A infecção de células pelo HCV rapidamente desencadeia eventos sinalizadores intracelulares que levam à produção de interferon (IFN) tipo I e a um estado celular antiviral que age como uma barreira inicial à replicação e à disseminação do vírus. Os receptores que desempenham este papel são: os receptores de reconhecimento de padrão, receptores Toll-like (TLRs) e receptores para RNA helicase.

A dimerização dos TLRs, induzida pelos ácidos nucléicos virais, permite o acoplamento de proteínas adaptadoras citoplasmáticas, que, por sua vez, promovem a ativação de uma cascata de proteínas cinases, culminando na ativação e localização dos fatores de transcrição nuclear de IFN tipo I e citocinas inflamatórias (SZABO; DOLGANIUC, 2008). Os interferons tipo I (INF- $\alpha$  e INF- $\beta$ ) são citocinas que bloqueiam a replicação viral nas células.

Evidências sugerem que o HCV pode interferir na ativação do sistema imune inato em múltiplos níveis. As proteínas não estruturais do HCV, particularmente NS3-4A e 4B, são capazes de interagir com várias moléculas adaptadoras do hospedeiro e possivelmente bloquear as vias de produção de INF tipo I (PAWLOTSKY, 2004; XU et al., 2009).

Além do processo de reconhecimento de patógenos invasores, as células dendríticas apresentam a importante função de ativação das células T naive para inicialização da resposta imune adaptativa. A população de células dendríticas inclui: as células dendríticas mielóides (MDCs), as células dendríticas derivadas de monócitos (DCs) e as células dendríticas plasmocitóides (PDCs) (CAO; LIU, 2007).

As PDCs são as principais produtoras de IFN- $\gamma$  e são especificamente especializadas na detecção de ácidos nucleicos virais por meio da expressão de TLR7 (CAO; LIU, 2007). Vários estudos têm demonstrado decréscimo na frequência de PDCs circulantes, reduzida produção de IFN- $\gamma$  e baixa capacidade de ativação de células T em pacientes com hepatite C (DOLGANIUC et al., 2006; YONKERS et al., 2007). Curiosamente, as moléculas CD123 e BDCA2, marcadores de PDCs, são expressas em altos níveis no fígado de pacientes infectados com HCV, indicando que estas células são seqüestradas para o fígado infectado (DOLGANIUC et al., 2006).

Embora os efeitos da infecção pelo HCV sobre as células dendríticas permaneçam desconhecidos, existem claras evidências que as proteínas derivadas do HCV, expressas *in vivo*, são capazes de afetar suas funções imunes (HIASA et al., 2004; ALOMAN et al., 2007).

As células NK constituem uma importante linha de defesa contra patógenos e usualmente tornam-se ativadas na fase inicial da infecção viral. A ativação das células NK exerce um papel essencial no recrutamento de células T HCV-específicas e eliminação de hepatócitos infectados diretamente por citólise ou indiretamente pela secreção de citocinas, que induzem um estado antiviral nas células do hospedeiro. Assim, elas seriam importantes para limitar a replicação viral naquele órgão, ainda que também pudessem contribuir para o dano tecidual hepático durante a resposta imunológica (AHMAD; ALVAREZ, 2004).

No entanto, evidências apontam que células infectadas com HCV desencadeiam uma fraca ativação das células NK e NKT, sendo seus efeitos mais evidentes no momento em que se estabelece a resposta imune adaptativa. Foi observado que a interação da proteína E2 do vírus com o receptor CD81 de células NK inibe a ativação e função destas células, sugerindo que o HCV apresenta alternativas para escapar da defesa por células NK (CROTTA et al., 2002; CROTTA, et al., 2006).

Os principais componentes da resposta imune celular são as células T-*helper* (CD4<sup>+</sup>) e T-citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) que apresentam função reguladora e efetora, respectivamente. As células T participam na patogênese viral seja, diretamente, destruindo as células infectadas, ou indiretamente, produzindo fatores solúveis como citocinas e quimiocinas que contribuem para o processo inflamatório e/ou inibem a replicação viral.

Os linfócitos T *helper* são fundamentais na coordenação da imunidade celular contra patógenos intracelulares. Essas células reconhecem os peptídeos virais antigênicos ligados às moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe II na membrana das células apresentadoras de antígenos. As citocinas são fatores determinantes do perfil da resposta imune. Dependendo do tipo de citocina produzida, as células TCD4<sup>+</sup> são modificadas em Th1 (linfócitos T *helper*-1), com conhecida função citotóxica através da ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e produção de citocinas antivirais como IFN- $\gamma$ , IL-12 e inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, ou são diferenciadas em Th2 (linfócitos T *helper*-2), com função supressora sobre a resposta imune Th1 e produção de IL-4 que agem inibindo a secreção de IFN- $\gamma$  e IL-12 (FUKUDA; NAKANO, 2003).

Estudos sugerem que a resposta Th1 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> contra a fração NS3 do vírus e possivelmente a outras proteínas não estruturais do HCV (NS4 e NS5) contribuem para o sucesso da eliminação do vírus. Acredita-se, também, que a eliminação do vírus está associado a uma resposta intra-hepática multiespecífica e policlonal de linfócitos T CD8<sup>+</sup> contra o vírus, enquanto que a persistência viral tem sido relacionada, principalmente, à alta variabilidade do HCV que permite o surgimento de mutações de escape (COX et al., 2005; RAY et al., 2005; TIMM et al., 2004).

Células T regulatórias (Tregs) também são encontradas no fígado infectado, onde apresentam efeitos dualísticos: por um lado, suprime as células T CD8<sup>+</sup>, favorecendo a

replicação viral; por outro lado, suprime os efeitos colaterais da inflamação, reduzindo os danos no fígado na infecção crônica (GODKIN et al., 2008; RUSHBROOK et al., 2005).

Apesar da resposta imune celular parecer ser eficiente na eliminação do vírus, ainda não se conseguiu estabelecer qual a amplitude e o mecanismo da resposta inicial do sistema imune, frente ao reconhecimento do antígeno do HCV, que faz com que o curso da infecção siga em direção a cronicidade e não a cura (COX et al, 2005). Contudo, o desfecho da infecção pelo HCV evidentemente é determinado pela interação entre o vírus e o sistema imunológico do hospedeiro (NELSON, 2001). Este fato nos instiga à investigação minuciosa dos componentes e mecanismos envolvidos no direcionamento da resposta imune em pacientes infectados pelo HCV.

A resposta imune humoral é fundamental na neutralização de partículas virais livres e para impedir a entrada do vírus nas células não infectadas do hospedeiro (FUKUDA; NAKANO, 2003). Por outro lado, apesar da existência de anticorpos neutralizantes, como aqueles contra a região E2 HCV, a resposta humoral ainda é ineficiente, possivelmente pela rápida seleção de variantes de escape (CHANG, 2003) ou porque estes anticorpos falhem em induzir a eliminação do vírus (NELSON et al, 1997).

### **1.6.3 Recrutamento de leucócitos para o tecido infectado**

A infecção pelo HCV resulta no recrutamento e ativação de células inflamatórias para o fígado, aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de monócitos ou macrófagos. Vários mecanismos podem contribuir para este processo inflamatório, dentre os quais incluem a ativação de receptores de reconhecimento de padrão e a amplificação da produção de citocinas ativada por mediadores endógenos ou produtos protéicos virais (HEYDTMANN; ADAMS, 2009).

Duas famílias de moléculas de adesão atuam neste processo, as selectinas e as integrinas. A família das moléculas selectinas (Quadro 1) consistem em três proteínas distintas, mas estreitamente relacionadas, que medeiam a adesão de leucócitos às células endoteliais. As diferenças entre as três selectinas residem tanto na especificidade de ligação quanto na expressão tecidual. Entretanto, todas as três medeiam fixação de baixa afinidade rápida dos leucócitos ao endotélio, uma etapa inicial e importante no recrutamento dos leucócitos.

Tabela 1

Tipos de selectinas, seus locais de expressão e ligantes.

Selectina	Tamanho	Distribuição	Ligante
Selectina L (CD62L)	90-110 kD	Leucócitos (alta expressão em células T inativas, baixa expressão em células efectoras ativadas e de memória)	Sialil-Lewis X na GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1, PSGL-1
Selectina E (CD62E)	110 kD	Endotélio ativado por citocinas	Sialil-Lewis X em várias glicoproteínas, PSGL-1
Selectina P (CD62P)	140 kD	Grânulos de armazenamento e superfície do endotélio e plaquetas	Sialil-Lewis X na PSGL-1

Fonte: Abbas, 2008.

A super-família das integrinas (Quadro 2) consiste em cerca de 30 proteínas estruturalmente homólogas que promovem interações célula-célula ou célula-matriz. As integrinas são classificadas em várias subfamílias com base nas cadeias nos heterodímeros. Aquelas que contêm cadeia  $\alpha 1$  são também chamadas moléculas VLA (*Very Late Antigens*), pois foi demonstrado que cadeias  $\alpha 1 1$  e  $\alpha 2 2$  são expressas nas células T, 2 a 4 semanas após estimulação repetitiva *in vitro*. De fato, outras integrinas VLA, incluindo VLA-4, são expressas constitutivamente em algumas células T e rapidamente induzidas em outras. A VLA-4 é expressa somente em leucócitos e constitui uma das principais proteínas de

superfície que medeiam a adesão de linfócitos e outros leucócitos no endotélio, em locais próximos à inflamação (KINACHI, 2002).

As integrinas  $\alpha_2\beta_1$ , também conhecidas como a família LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*, também conhecida como integrina  $\alpha_1\beta_2$ ), desempenham papéis importantes na adesão de linfócitos com outras células, como APCs (Células Apresentadoras de Antígeno) e endotélio vascular.

Tabela 2

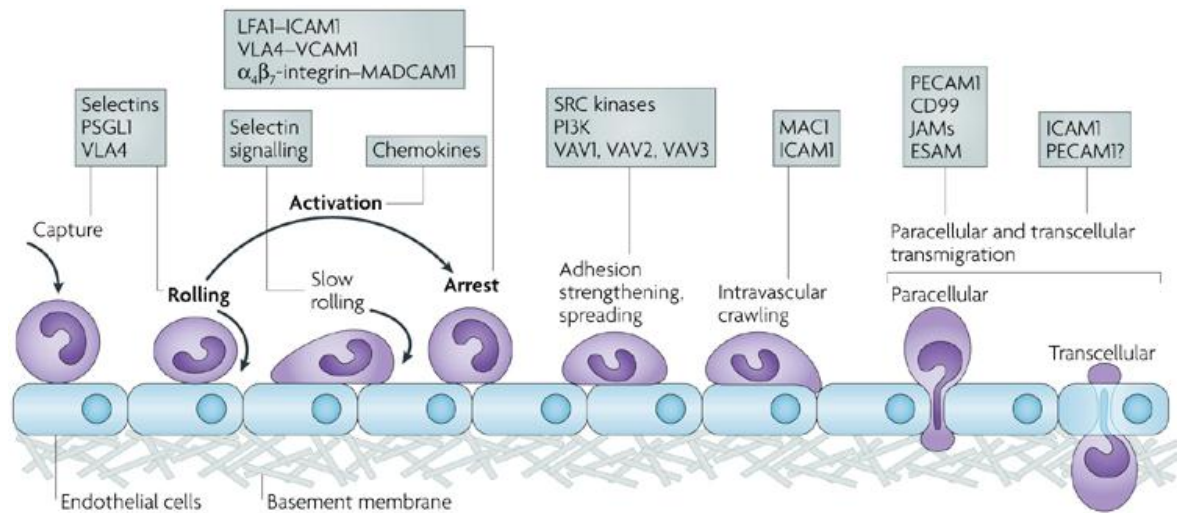
Representantes das integrinas tipos  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$ , principais ligantes e funções.

Subunidades	Nome	Principais Ligantes	Funções
1	1 VLA-1	Colágenos	Adesão célula-matriz.
	2 VLA-2	Colágenos	Adesão célula-matriz.
	3 VLA-3	Laminina	Adesão célula-matriz.
	4 VLA-4	VCAM-1, MadCAM-1.	Adesão célula-matriz; assentamento.
	5 VLA-5	Fibronectina.	Adesão célula-matriz.
	6 VLA-6	Laminina.	Adesão célula-matriz.
	7 CD49gCD29	Laminina.	Adesão célula-matriz.
	8 CD51CD29	Fibronectina.	Adesão célula-matriz.
	v CD51CD29	Fibronectina.	Adesão célula-matriz.
2	L CD11aCD18 (LFA-1).	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3.	Adesão do leucócito ao endotélio; adesão célula T ó APC.
	M CD11bCD18 (MAC-1).	iC3b, Fibronectina, Fator X, ICAM-1.	Adesão do leucócito e fagocitose; adesão célula-matriz.
	x CD11cCD18 (P150).	iC3b, Fibronectina	Adesão do leucócito e fagocitose; adesão célula-matriz.
	d CD11dCD18.	VCAM-1, ICAM-3.	Adesão do leucócito ao endotélio.

Fonte: Abbas, 2008.

O processo de adesão e migração dos leucócitos através da parede dos vasos sanguíneos envolve 8 etapas: Captura (*capture*), rolamento (*rolling*), rolamento lento (*slow rolling*), arrastamento (*arrest*), aderência e espalhamento (*adhesion strengthening e spreading*),

rastejamento intravascular (*intravascular crawling*) e migração paracelular e transcelular (Figura 5).



Nature Reviews | Immunology

Figura 5. Processo de adesão e transmigração de leucócitos dos vasos sanguíneos ao tecido infectado. Fonte: Ley et al., 2007.

O processo de captura é mediado pelas L-selectinas, P-selectinas e E-selectinas, as quais interagem com o ligante glicoprotéico P-selectina-1 (PSGL-1) e outros ligantes glicosilados (KANSAS, 1996; McEVER; CUMMINGS, 1997). PSGL-1 apresenta papel central como ligante para os três grupos de selectinas, embora tenha sido originalmente descrito como um ligante para P-selectina.

A ligação entre as L-selectinas e o PSGL-1, promove o processo de captura de leucócitos pelo epitélio vascular no local da inflamação. Sob as condições do fluxo sanguíneo, tais ligações são rompidas e novamente ligadas, promovendo o rolamento da célula sobre o epitélio vascular (ALON et al, 1995).

As integrinas também participam do processo de rolagem e medeiam a fixação do leucócito. DUNNE et al, (2002) demonstraram que quando camundongos são tratados com TNF, células epiteliais expressam E-selectinas, ocorre o aumento da expressão de ICAM-1, ao passo que é observada a redução na velocidade de rolagem dos neutrófilos. A redução da



velocidade de rolamento está associada não somente às E-selectinas, mas também se deve às integrinas 2, especialmente LFA-1 e MAC-1 (KUNKEL; LEY, 1996; JUNG et al, 1998; DUNNE et al, 2002).

O arrastamento de leucócitos é rapidamente desencadeado por citocinas e quimioatraentes, o qual é mediado pela ligação das integrinas dos leucócitos aos membros das superfamílias das imunoglobulinas, tais como ICAM-1 e VCAM-1, expressas nas células endoteliais (CAMPBELL et al, 1996; CAMPBELL et al, 1998). No processo inflamatório, células endoteliais são ativadas pelas citocinas inflamatórias, passando a expressar moléculas de adesão e secretar citocinas que são apresentadas para a superfície luminal (MIDDLETON et al, 1997). As citocinas desencadeiam cascatas de sinalização que podem regular distintas integrinas em diferentes subgrupos de leucócitos.

Um fenômeno crucial para ao arrastamento do leucócito induzido por citocinas é a modulação da afinidade das integrinas pelo seu ligante (KINASHI, 2005; CHAN et al, 2001; GIAGULLI et al, 2004). Apesar das integrinas serem expressas na maioria dos leucócitos, uma característica importante é sua capacidade de responder a sinais intracelulares, aumentando rapidamente sua avidéz pelos seus ligantes (KINACHI, 2002). A avidéz das moléculas de adesão mediadas por integrinas é considerado um evento celular macroscópico, dependente de duas características moleculares: a afinidade da integrina e a valência de ligação (CARMAN; SPRINGER, 2003; BAZZONI; HEMLER, 1998). O aumento da afinidade de ligação das integrinas corresponde a mudanças conformacionais em cada heterodímero de integrina, que desencadeia o aumento da energia de ligação e uma significativa diminuição na taxa de dissociação. Por outro lado, a valência corresponde à densidade de heterodímeros de integrinas por área da superfície da membrana plasmática das células envolvidas na adesão, o qual depende do nível de expressão de integrinas.

Sabe-se que além de mediar a adesão celular, as integrinas são capazes de gerar sinais intracelulares que regulam várias funções celulares, incluindo motilidade celular, proliferação e apoptose (GIAGULLI et al, 2006; SHATTIL, 2005). O ligante associado à integrina sofre mudanças conformacionais que provavelmente contribuem para a iniciação de uma cascata de sinalização *outside-in* (LIU et al, 2002).

A transmigração através das paredes dos vasos é a etapa final do processo de emigração do leucócito para os tecidos inflamados. Antes de atravessar a parede dos vasos, os leucócitos rastejam pela parede do vasos sanguíneo por meio da interação entre MAC-1 e ICAM-1, à procura do local ideal para a transmigração (SCHENKEL et al, 2004). Quando o processo de rastejamento não ocorre, a transmigração é realizada principalmente pela via transcelular, ao invés da via paracelular (PHILLIPSON et al, 2006).

O recrutamento de leucócitos é crucial na infecção por HCV, devido ao fato destas células atuarem na eliminação dos hepatócitos infectados por meio da apoptose. Este processo pode resultar em *clearance* viral ou em repetidos ciclos de inflamação e danos teciduais, acarretando a indução e substituição do tecido danificado pela fibrinogênese (GUIDOTTI; CHISARI, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Caracterizar a expressão de moléculas de adesão celular e o perfil de citocinas em sangue periférico de doadores de sangue da Fundação HEMOAM infectados pelo vírus da hepatite C.

### **2.2 Específicos**

- Caracterizar a expressão de moléculas de adesão de superfície celular LFA-1, VLA-4 e MAC-1, em subpopulações de leucócitos de sangue periférico;
- Descrever o perfil de citocinas em sangue periférico de candidatos à doação de sangue, infectados pelo HCV;
- Relacionar o perfil de citocinas ao padrão de expressão de moléculas de adesão celular em candidatos à doação de sangue, infectados pelo HCV.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Delineamento do Estudo**

Foi realizado um estudo observacional descritivo transversal.

#### **3.2 Aspectos éticos e de biossegurança**

O presente projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, sendo aprovado em 16 de fevereiro de 2009 (APÊNDICE A).

Foram seguidas rigorosamente todas as recomendações de biossegurança, bem como todos os cuidados para a preservação e confidencialidade das informações.

#### **3.3 Casuística, população de estudo e critérios de inclusão e exclusão**

Na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas ó HEMOAM são cadastrados anualmente cerca de 51.829 doadores de sangue referentes a todo o Estado do Amazonas, sendo que cerca de 44.663 (82,2 %) são provenientes de Manaus (dados não publicados obtidos do núcleo de estatística do HEMOAM, 2007).

Para este estudo foram selecionados doadores de sangue do sexo feminino ou masculino, acima de 18 anos, residentes em Manaus que apresentaram reatividade nos testes de triagem sorológica para anti-HCV. Foram excluídos os doadores com sorologia positiva para marcadores da Hepatite B (anti-HBc, HbsAg), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV- I e II), Doença de Chagas (teste ELISA), Sífilis (VDRL) e doadores que após a

repetição do teste anti-HCV (ELISA) com nova amostra, apresentaram resultado negativo para o parâmetro.

Os indivíduos enquadrados nos critérios de inclusão foram convocados pelo setor de Serviço Social do HEMOAM, para consulta médica, momento no qual o médico solicita a coleta de nova amostra, como de rotina, para a confirmação do resultado. Nesta ocasião o doador foi convidado a participar voluntariamente do projeto, após a apresentação dos objetivos e métodos desse estudo. Além de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B) o doador respondeu a um questionário epidemiológico (APÊNDICE C).

Para cada amostra coletada de doador infectado pelo vírus da hepatite C, foi coletada uma amostra de doador saudável para constituir o grupo controle. Para tanto, os doadores saudáveis foram convidados a participar do projeto como grupo controle, tendo seu consentimento registrado com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o grupo controle (APÊNDICE D).

### **3.4 Coleta, processamento e armazenamento de material biológico**

Após anti-sepsia de um dos antebraços ou fossas cubitais foi coletada uma amostra de 20 mL de sangue venoso periférico, distribuída em quatro tubos: 5 mL em um tubo PPT (*Plasma Preparation Tube*, Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA) para a realização dos testes de biologia molecular, 10 mL em dois tubos com etilenodiaminotetraacetato (EDTA) para processamento e análise dos demais testes previstos neste estudo e 5 mL em um tubo sem anticoagulante. Este último tubo foi identificado e encaminhado ao laboratório de sorologia para a realização dos testes confirmatórios (ELISA e Imunoblot) e cadastrado no sistema de banco de dados do HEMOAM.

Os tubos PPT contendo 5 mL de sangue para a realização dos procedimentos de biologia molecular foram centrifugados e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios no laboratório de pesquisa multidisciplinar do HEMOAM.

Os tubos com EDTA, contendo 5 mL de sangue total cada, foram imediatamente identificados e encaminhados ao laboratório de pesquisa multidisciplinar do HEMOAM para realização dos procedimentos destinados análise da expressão de moléculas de adesão celular por citometria de fluxo. Uma alíquota da porção plasmática destas amostras foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios de quantificação de citocinas, por ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*), no laboratório de pesquisa multidisciplinar do HEMOAM.

### **3.5 Triagem e confirmação para o HCV**

A triagem de rotina dos doadores de sangue realizada no laboratório de sorologia da Fundação HEMOAM utiliza o método ELISA de 3ª geração para detecção de amostras infectadas com o HCV. O *kit* utilizado (*Murex anti-HCV*, versão 4.0, *Abbott*) consiste na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos de superfície do vírus da hepatite (C, NS3, NS4 e NS5). A reação é considerada positiva quando a absorbância da amostra é superior ao valor do *cut-off*. Por medida de segurança transfusional, o resultado do teste é considerado indeterminado quando a absorbância obtida é até 10% abaixo do valor do *cut-off*.

Os resultados destes exames são confirmados após coleta de segunda amostra e realização de um novo teste ELISA de 3ª geração para anti-HCV e um Imunoblot, este último se baseia na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos do vírus da hepatite C. Para realização do imunoblot foi utilizado o *kit* CHIRON-RIBA HCV ® versão 3.0 *Strip Immunoblot Assay ó SIA*. O ensaio foi realizado conforme as recomendações do fabricante,

sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram duas ou mais bandas específicas contra os antígenos virais, indeterminadas as que apresentaram uma única banda e negativas aquelas onde nenhuma banda foi encontrada.

### **3.6 Ensaios Laboratoriais**

#### **3.6.1 Quantificação de citocinas circulantes em sangue periférico**

No soro do sangue periférico as citocinas foram dosadas por ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) no Laboratório de Pesquisa Multidisciplinar do HEMOAM, utilizando-se pares de anticorpos (Anticorpo Primário e Anticorpo Secundário) e respectivos padrões recombinantes obtidos comercialmente *Opteia<sup>Tm</sup> Set Human* (BD Biosciences. Pharmingen, San Diego, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante.

Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL/poço com Anticorpos de Captura (Anticorpo primário AC-Primário), diluído em tampão de ligação (Carbonato de Sódio 0,1 M, pH 9,6). A placa foi envolvida em papel alumínio e incubada por 12 horas, a 4°C. Após esse período de incubação, os poços foram aspirados e lavados 3 vezes com 300µL de tampão de lavagem (PBS 1X + 0,05% de Tween-20%). Concluída a última lavagem, as placas foram aspiradas e invertidas em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. Duzentos microlitros de diluente de ensaio (Solução Salina Tamponada de Fosfato - PBS 1X + 10% de Soro Bovino Fetal - SBF) foram acrescentados em cada poço e a placa foi envolvida em papel laminado e incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Durante essa incubação foram preparadas diluições seriadas de cada citocina, cujas concentrações seguiram as especificações do fabricante (figura 6). As diluições foram

realizadas em microtubos utilizando-se um volume inicial de 500  $\mu\text{L}$  no primeiro tubo e, em outros 7 tubos, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  da solução diluente. Depois de acrescentado o volume exigido de citocina no primeiro tubo, foram transferidos 250  $\mu\text{L}$  para o próximo tubo, agitando entre cada transferência, até a obtenção de uma curva de diluição seriada.

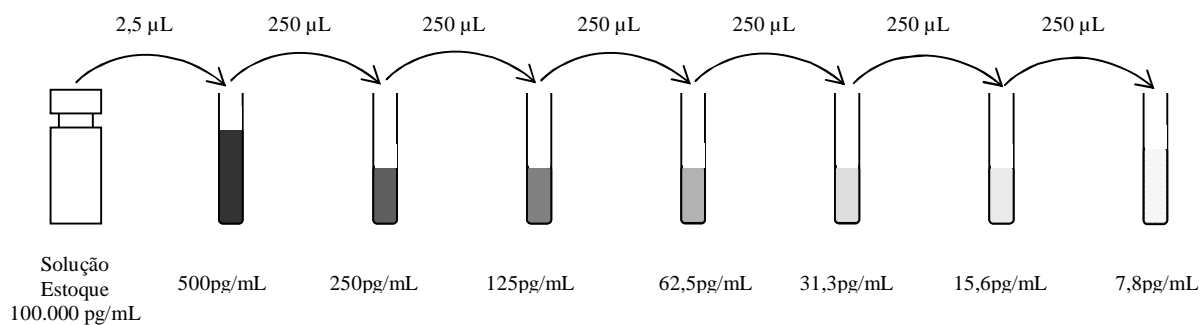


Figura 6. Esquema da diluição seriada do padrão de citocinas, conforme recomendações do kit *Opteia<sup>™</sup> Set Human* (BD). Fonte: Catálogo do kit *Opteia<sup>™</sup> Set Human* (BD)

Após o término do período de incubação, as placas foram aspiradas e lavadas novamente por 3 vezes, com 300  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e, em seguida, invertidas em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra, padrão de referência e solução diluente (PBS + 10% SBF, como controle negativo) dentro dos poços apropriados, a placa foi envolvida em papel alumínio e incubada a temperatura ambiente, por 2 horas. Após esta incubação, as placas foram aspiradas e lavadas com 5 ciclos de lavagens. Logo em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo de detecção associado à enzima (Anticorpo secundário + reagente SAV-HRP) para cada poço. Novamente, a placa foi envolvida em papel alumínio e incubada à temperatura ambiente, por 1 hora. As placas foram aspiradas e lavadas em 7 ciclos no total, deixando de molho por 30s em cada ciclo. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de substrato em cada poço, a placa foi envolvida em papel alumínio e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Para o bloqueio da reação foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2 N) em cada poço e realizada a leitura



da absorvância a 450 nm em aparelho da marca ASYS (*Microplate reader* v.1.14) em até 30 minutos após o término da reação.

### 3.6.2 Caracterização das subpopulações de leucócitos e das moléculas de adesão celular

Amostras de 50 µL de sangue venoso coletada com EDTA foram incubadas por 20 minutos, em temperatura ambiente, com anticorpos monoclonais. Os marcadores de superfície celular utilizados foram, anti-VLA-4, anti-LFA-1, anti-MAC-1, anti-CD8<sup>+</sup>, anti-CD4<sup>+</sup> e anti-CD3<sup>+</sup> (tabela 2). Após a marcação, foi acrescentado 2 mL de solução de lise, no qual as amostras ficaram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente, para eliminação das hemácias. Logo em seguida, foram lavadas com 2 mL de PBS 1X (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas por 7 minutos, a 1.800 g. Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante por inversão e adicionado 300 µL de PBS 1X. A leitura foi realizada imediatamente após a marcação das amostras, no laboratório de Citometria de Fluxo do HEMOAM, no aparelho *FACScalibur<sup>i</sup>* (*Becton Dickinson*), com sistema de detecção de quatro cores.

Tabela 3

Características dos marcadores de superfície celular.

NOME DO MARCADOR	TIPO DE FLUORESCÊNCIA	ISOTIPO	FABRICANTE	LOTE
<i>Anti-human CD11b (MAC-1)</i>	<i>R-Phycoerythrin Conjug. ó PE</i>	Mouse IgG1	<i>Caltag<sup>TM</sup> Invitrogen</i>	421549B
<i>Anti-Human CD49d (VLA-4)</i>	<i>R-Phycoerythrin Conjug. ó PE</i>	Mouse IgG1	<i>BD Biosciences</i>	20137
<i>Anti-human CD11a (LFA-1 )</i>	<i>R-Phycoerythrin Conjug. ó PE</i>	Mouse IgG1	<i>BioLegend</i>	B119504
<i>Anti-human CD8<sup>+</sup></i>	<i>Fluorescein - FITC</i>	Mouse IgG2a	<i>Caltag<sup>TM</sup> Invitrogen</i>	0900A
<i>Anti-human CD4<sup>+</sup></i>	<i>Fluorescein - FITC</i>	Mouse IgG2a	<i>Caltag<sup>TM</sup> Invitrogen</i>	1000D
<i>Anti-human CD3<sup>+</sup></i>	<i>Tri-Color -TC</i>	Mouse IgG2a	<i>Caltag<sup>TM</sup> Invitrogen</i>	432665A

A identificação das populações celulares de interesse foi realizada utilizando-se o programa *Cell-Questi* (Becton Dickinson). Primeiramente foi identificada a população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, utilizando gráficos *dot plot* onde a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes na obtenção do seu tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e granulosidade (*Side Scatter* - SSC), conforme a figura 7.

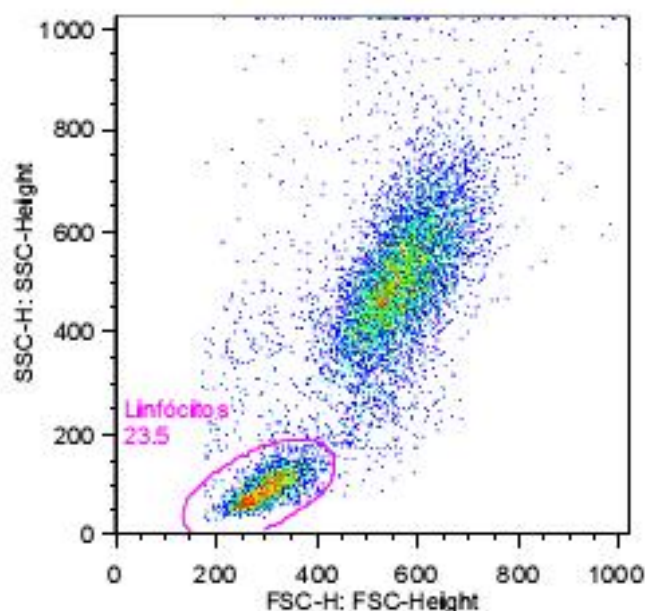


Figura 7. Dot Blot da população de leucócitos segundo o tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e granulosidade (*Side Scatter* - SSC).  
Fonte: *FlowJo Analysis Software*.

Após a seleção da população de interesse foi analisada a intensidade de fluorescência apresentada pelas células marcadas nessa região, através de histograma de fluorescência 1 (FL1). Foi definida como intensidade média de fluorescência, a diferença entre a média da intensidade de fluorescência da amostra com marcador, subtraída da média da intensidade de fluorescência da amostra sem o marcador (controle negativo), conforme apresentado na figura 8. Os resultados obtidos foram anexados na ficha de acompanhamento do paciente, padronizada para o estudo em causa.

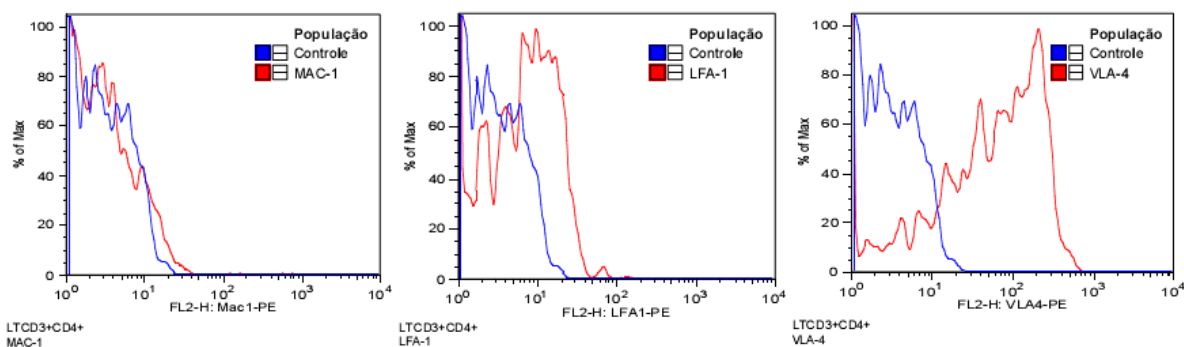


Figura 8. Sobreposição do histograma da intensidade de fluorescência da amostra sem marcador (controle) e da amostra com marcador. A. MAC-1; B. LFA-1; C. VLA-4. Fonte: *FlowJo Analysis Software*.

### 3.6.3 Teste de Amplificação de Ácido Nucléico

#### 3.6.3.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA-HCV, foram seguidas as instruções do fabricante de *QIAmp<sup>®</sup> Viral RNA Kit (Quiagen)*. Foi pipetado 560  $\mu\text{L}$  de solução buffer AVL já preparada, contendo  $\phi\text{RNA}$  carreador, dentro de microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se 140  $\mu\text{L}$  de soro no tubo de microcentrífuga com AVL/RNA carreador e os mesmos foram agitados por 15 segundos em vórtex. O material foi incubado a 37° C por 10 minutos e centrifugado novamente para remover gotas da tampa. Adicionou-se 560  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) no tubo, agitou-se no vórtex por 15 segundos e centrifugou-se novamente para remover gotas da tampa. Colocou-se a coluna fornecida pelo Kit em um microtubo de 2 mL e em seguida, aplicou-se 630  $\mu\text{L}$  da solução de etanol. A amostra foi centrifugada a 6.000 g por 1 minuto e colocada em outro tubo de 2 mL limpo. Então, a coluna foi aberta e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do buffer AW1 e centrifugou-se a 6.000 g por 1 minuto. A coluna foi colocada em outro tubo de 2 mL limpo, descartando-se o tubo contendo o filtrado. Após esta etapa, a coluna foi aberta e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do buffer AW2 e centrifugou-se a 20.000 g por 4 minutos. A coluna foi colocada em novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  do *buffer AVE* a 37°C. A coluna foi fechada e deixada em descanso por 60 segundos. Após esse tempo foi novamente

centrifugada a 6.000 g por 1 minuto e, finalmente, obtido o RNA viral que foi utilizado para a realização da síntese do DNA complementar (cDNA).

### 3.6.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada através da reação de Transcrição Reversa (RT), utilizando-se reagentes da *Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*. O volume final da reação foi de 40,1µL nas seguintes condições: Tampão PCR 1X sem Magnésio, 0,2mM de dNTP's, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10<sup>-3</sup> M de DTT, 2,5 µM de primer randômico PDN (6), 1 unidade de enzima inibidora de RNase, e 2,5 unidades de enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (M-MLV).

As amostras foram submetidas a gradiente de temperatura no termociclador *Veriti Thermal Cycler* ó *Applied Biosystems*, conforme o quadro abaixo:

Quadro 1

Gradiente de temperatura no termociclador.

Temperatura	Minutos
65° C	5 minutos
22° C	10 minutos
37° C	30 minutos
95° C	5 minutos

### 3.6.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores utilizados para a reação em cadeia da polimerase foram desenhados a partir da região conservada 5'NCR do genoma do HCV (SMITH et al., 1995). Após a etapa de síntese, o DNA complementar foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase

(PCR), utilizando-se reagentes da *Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*, nas seguintes condições: tampão PCR 1X, 0,16 mM de dNTP, 0,2 µM de cada iniciador HC11 e HC18 (Quadro 4); 1 unidade de *Taq* Platinum DNA polimerase; 0,1µg/µL de cresol red; 10 µL de cDNA, para uma reação com volume final de 50 µL. O programa que foi utilizado para a amplificação por PCR, no termociclador *Veriti Thermal Cycler ó Applied Biosystems*, está representado no quadro 5.

Quadro 2

Sequencia de nucleotídeos dos iniciadores HC11 e HC18

<b>Iniciadores</b>	<b>Sequência 5' 3'</b>	<b>Quantidade de bases</b>
HC 18	GGTGCACGGTCTACGAGACCT	21
HC 11	GGCGACACTCCACCATAGATCACT	24

Quadro 3

Programa utilizado no termociclador para a reação de amplificação por PCR.

Etapa 1	Desnaturação inicial por 5 minutos a 95° C
Etapa 2	Desnaturação por 30 segundos a 94° C
Etapa 3	Hibridização por 30 segundos a 55° C
Etapa 4	Extensão por 1 minuto a 72° C
Etapa 5	Repetição das etapas 2 a 4 por 50 ciclos
Etapa 6	72° C por 7 minutos

O produto amplificado pelos iniciadores HC11 e HC18 gera um fragmento de 331 pares de base da região 5'NTR do genoma do HCV.

### 3.6.3.4 *Nested-PCR*

Para amostras que não amplificaram através da técnica da reação em cadeia da polimerase com a utilização dos *primers* HC11 e HC18, foi realizada a técnica de *Nested-PCR*, como uma segunda estratégia devido á sua maior sensibilidade, utilizando-se reagentes da *Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*. O primeiro ciclo do *Nested-PCR* foi realizado nas seguintes condições: tampão PCR 1X, 0,16 mM de dNTP, 2,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada iniciadores P32 e P36 (Quadro 7), 1,25 unidades de Taq Platinum DNA polimerase; 0,1 µg/µL de cresol red; 10 mM de cDNA, para uma reação com volume final de 25µL. O programa utilizado para a amplificação por PCR, no termociclador *Veriti Thermal Cycler ó Applied Biosystems*, está representado no quadro 6.

Quadro 4

Programa utilizado no termociclador *Mastercycler Gradient ó Eppendorf* para a primeira reação do *Nested-PCR*.

Etapa 1	Desnaturação inicial por 5 minutos a 95° C
Etapa 2	Desnaturação por 30 segundos a 94° C
Etapa 3	Hibridização por 30 segundos a 55° C
Etapa 4	Extensão por 1 minuto a 72° C
Etapa 5	Repetição das etapas 2 a 4 por 50 ciclos
Etapa 6	72° C por 7 minutos

Após o término do primeiro ciclo do *Nested-PCR*, iniciou-se o segundo ciclo utilizando reagentes da *Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*, nas seguintes condições: tampão PCR 1X, 0,16 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada iniciador P33 e P48 (Quadro 7), 1,5 unidades de *Taq Platinum DNA polimerase*, 10 µL do produto amplificado no primeiro ciclo, para uma reação com volume final de 25 µL. O programa

utilizado para a amplificação por PCR, no termociclador *Veriti Thermal Cycler ó Applied Biosystems*, está representado no quadro 8.

Quadro 5

Sequencia de nucleotídeos iniciadores P32, P36, P33 e P48

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência 5' 3'</b>	<b>Quantidade de bases</b>
P32	CTGTGAGGAACTACTGTCTT	20
P36	ACTGCTAGCCGAGTAGTGTT	20
P33	TTCACGCAGAAAGCGTCTAG	20
P48	GGGTCCTTTCTTGGATCAAA	20

Quadro 6

Programa utilizado no termociclador para a segunda reação do Nested-PCR.

Etapa 1	Desnaturação inicial por 5 minutos a 95° C
Etapa 2	Desnaturação por 30 segundos a 94° C
Etapa 3	Hibridização por 30 segundos a 55° C
Etapa 4	Extensão por 1 minuto a 72° C
Etapa 5	Repetição das etapas 2 a 4 por 45 ciclos
Etapa 6	72° C por 7 minutos

O produto amplificado pelos iniciadores P32 e P36 gera um fragmento de 220 pares de base e, pelos iniciadores P33 e P48, um fragmento de 145 pares de bases da região 5'NTR do genoma do HCV.

Após o término da PCR, para a identificação das amostras positivas, o produto amplificado foi submetido á eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo Gel Red (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), na proporção de 10 µL: 50 mL de Agarose. Foi aplicado 5 µL de cada amostra e 1 µL do marcador de 50 pares de bases (*Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*).

### 3.7 Análise e interpretação de dados

Os dados foram tabulados e armazenados por meio do Software Microsoft Excel® (versão 2007 para Windows). As análises descritivas foram apresentadas em tabelas e gráficos de distribuição de frequências, elaboradas no software *GraphPad Prism* (Versão 5.01 para Windows). As análises inferenciais foram realizadas por meio do Software Livre R (versão 2.9.0 para Windows), utilizando pacotes estatísticos que permitem a execução de teste de  $\chi^2$  e de Fisher para a análise de variáveis categóricas, além de teste T ou de Mann-Whitney, para a análise de variáveis não-categóricas, conforme a distribuição dos dados seja normal ou não.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de realização do presente estudo, Agosto de 2009 a Julho de 2010, a Fundação HEMOAM recebeu 43.270 doações de sangue, provenientes de Manaus. Deste total, 120 amostras (0,28 %) apresentaram reatividade para anti-HCV nos testes de ELISA da triagem sorológica.

De acordo com os procedimentos de rotina estabelecidos no HEMOAM, os doadores que apresentam exames com reatividade na triagem sorológica são convocados, pelo Serviço Social, para consulta, na qual o médico solicita a coleta de uma nova amostra para realização dos exames confirmatórios. Este processo é de grande importância para o controle das doenças transmissíveis por hemoderivados, tais como a Hepatite C, pois quando há falhas nestes procedimentos, os doadores que não retornam ou não são contactados, por não terem conhecimento de sua provável infecção, ficam sem o devido atendimento/tratamento ou, ainda mais grave, podem transmitir a doença para outras pessoas.

Dos 120 doadores que apresentaram reatividade na triagem sorológica, apenas 50 (41,7 %) retornaram ao HEMOAM para consulta médica, durante o período do estudo. Segundo a Portaria Nº. 1.376/1993 compete ao órgão executor da atividade hemoterápica, neste caso a Fundação HEMOAM, convocar, orientar e encaminhar o doador com resultado sorológico não negativo, para serviços complementares de diagnóstico e tratamento. Nossos resultados apontam para uma deficiência no processo de convocação de doadores com sorologia reativa pela Fundação HEMOAM. Este fato pode estar relacionado ao cadastro incorreto destes doadores, que muitas vezes, informam contatos falsos, para evitar qualquer tipo de prestação de contas pelo serviço utilizado. Sugerindo, dessa forma, a necessidade de se procurar alternativas que permitam otimizar o processo de convocação de doadores.

Após a apresentação da proposta de pesquisa e assinatura do TCLE, os 50 indivíduos que apresentaram reatividade para anti-HCV na triagem sorológica, foram inseridos no estudo, compondo o grupo HCV reativo. Para efeitos de comparação, foram convidados a participar do estudo 53 doadores, que não apresentaram nenhum tipo de reatividade nos testes da triagem sorológica do HEMOAM, para constituírem o grupo controle negativo.

Dentre as 50 amostras que apresentaram reatividade no ELISA da triagem sorológica, 42 (84 %) foram reativas para anti-HCV nos ensaios confirmatórios para o ELISA de segunda amostra, enquanto que nos ensaios confirmatórios por imunoblot, 29 (58 %) apresentaram resultados indeterminados e 21 (42 %) confirmaram reatividade para HCV.

Além dos testes sorológicos confirmatórios realizados na rotina do HEMOAM, todas as 50 amostras HCV reativas foram submetidas à técnica de PCR e *Nested-PCR*. Por meio destas, foi possível amplificar fragmentos do genoma do HCV em 19 (38%) amostras.

Para a determinação da frequência de reatividade para o HCV nos diferentes ensaios diagnósticos foi calculada a população proporcional ao número de doadores que retornaram para realização dos ensaios confirmatórios. Dessa forma, foi estimada uma população proporcional de 18.029 doadores, que corresponde a 41,7 % do total de doadores (43.270) que compareceram na Fundação HEMOAM, no período do estudo. A tabela 4 apresenta o cálculo da prevalência de HCV em doadores de sangue, considerando cada teste diagnóstico.

Tabela 4

Prevalência de reatividade para HCV em doadores de sangue da Fundação HEMOAM, considerando os diferentes testes diagnósticos.

Ensaio	Frequência de reatividade	
	Soroprevalência	Percentual
<b>ELISA da triagem</b>	120/43.270	0,28 %
<b>ELISA confirmatório</b>	42/18.029*	0,23 %
<b>Imunoblot</b>	22/18.029*	0,12 %
<b>PCR/<i>Nested-PCR</i></b>	19/18.029*	0,10 %

\*População proporcionalmente estimada ao número de indivíduos incluídos neste estudo.

Nossos resultados são estatisticamente semelhantes aos encontrados por TORRES et al. (2009), que observaram uma soroprevalência de 0,26, 0,11 e 0,15 %, na população de doadores de sangue da Fundação HEMOAM, no período de setembro de 2005 a abril de 2007, diagnosticada por ELISA de triagem, imunoblot e PCR, respectivamente. Dados da literatura apontam significativas variações (0,01 a 20 %) na soroprevalência de anti-HCV na população de doadores de sangue de diferentes regiões do Brasil (GONÇALES, et al., 2000; PALTANIN; REICHE, 2002; ANDRADE et al., 2006; WENDEL et al., 2007; BARRETO et al., 2008). Estas variações de resultados se devem às diferenças metodológicas, tais como, o tipo de ensaio diagnóstico, bem como ao perfil social de cada região, o que determina populações mais vulneráveis ou não aos riscos de transmissão de doenças.

Pela análise comparativa dos dados demográficos dos indivíduos dos grupos analisados, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de sexo e estado civil ( $p > 0,05$ ). Os dados demográficos dos grupos analisados neste estudo estão descritos na tabela 5.

A comparação da média da idade entre os grupos demonstrou haver diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo controle negativo e o grupo HCV positivo ( $p < 0,05$ ), sendo superior neste último. Este perfil etário mais elevado é frequentemente observado em estudos transversais que investigam doenças crônicas, uma vez que em patologias crônicas como a Hepatite C, por exemplo, a doença pode ser detectada em indivíduos de uma faixa etária superior, mesmo que a infecção tenha ocorrido há vários anos.

Também houve uma associação entre o número de doações e o grupo estudado, indicando uma proporção maior de primo doadores nos grupos HCV reativo e HCV positivo, em relação ao controle negativo. Possivelmente esta diferença de proporção está relacionada ao perfil cultural da população que procura os bancos de sangue com a finalidade de realizar exames sem ônus, aumentando a probabilidade de se encontrarem amostras positivas em

primodoadores. Ou ainda, pelo fato dos doadores de repetição, que possuem uma maior internalização de valores morais, apresentarem um perfil de comportamento que diminui o contato com situações de risco como o uso de drogas, por exemplo (GODIN et al., 2007).

Tabela 5

Características demográficas e epidemiológicas dos indivíduos participantes do estudo classificado por grupo.

Parâmetros		Grupo HCV reativo*	Grupo HCV positivo**	Grupo Controle Negativo	<i>p-value</i> ***
<b>n</b>		50	19	53	-
<b>Sexo</b>	Masc.	27 (54 %)	9 (47 %)	34 (64 %)	0,180
	Fem.	23 (46 %)	10 (53 %)	19 (36 %)	
<b>Idade (MN± SD)</b>		33 ± 1,4	37 ± 2,47	30 ± 1,2	0,019
<b>Estado Civil</b>	Solteiro	31 (62 %)	11 (58 %)	31 (58 %)	0,841
	Casado	19 (38 %)	8 (42 %)	22 (42 %)	
<b>Primo doador?</b>	Sim	29 (58 %)	12 (63 %)	8 (15 %)	< 0,01
	Não	21 (42 %)	7 (37 %)	45 (85 %)	

\* Reativo na triagem por ELISA para anti-HCV.

\*\* Positivo na PCR para o genoma do HCV.

\*\*\* *p-value* do Teste Kruskal Wallis e pós-teste Comparação Múltipla de Dunn.

Nas próximas seções, apresentamos a análise das possíveis relações entre a expressão de moléculas de adesão celular e o perfil de citocinas comparativamente entre os grupos estudados. Ainda que o grupo denominado HCV reativo apresente indivíduos não infectados com o HCV, procuramos identificar um possível padrão de resposta imunológica característico deste grupo.

#### 4.1 Caracterização das Subpopulações de Leucócitos e das Moléculas de Adesão Celular

A maioria dos indivíduos infectados pelo HCV desenvolve uma hepatite crônica mediada pela própria resposta imune. A gravidade dos danos no fígado e o curso da doença variam consideravelmente entre as pessoas. Sabe-se que a resposta imune celular desempenha uma importante função na imunopatogênese da infecção pelo HCV, determinando se ocorrerá o processo de eliminação viral ou a cronificação da doença (BOETTLER et al., 2005). Analisando comparativamente o número de cada subpopulação de leucócitos do sangue periférico, observamos diferença estatística significativa para a população de monócito no grupo HCV reativo, quando comparado com o controle negativo. No entanto, não observamos diferença estatisticamente significativa entre as demais populações celulares nos diferentes grupos estudados (tabela 6).

Tabela 6

Comparação do número médio de células circulantes por mililitro de sangue periférico entre os grupos HCV reativo e Controle negativo.

População	Número médio de células / ml de sangue			<i>p-value*</i>
	Grupo HCV reativo	Grupo HCV positivo	Grupo Controle Negativo	
<b>Linfócitos Total</b>	2.175	2.370	2.270	0,617
<b>Linf. T CD4<sup>+</sup></b>	811	932	871	0,317
<b>Linf. T CD8<sup>+</sup></b>	560	533	605	0,539
<b>Razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup></b>	1,5	1,8	1,6	0,274
<b>Neutrófilos</b>	1166	1196	1259	0,705
<b>Monócitos</b>	25	21	29	0,011

\* *p-value* do Teste Kruskal Wallis e pós-teste Comparação Múltipla de Dunn.

Com relação à razão média de células T CD4<sup>+</sup>/ T CD8<sup>+</sup>, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Entretanto, na figura 9 podemos observar uma razão média de células T CD4<sup>+</sup>/ T CD8<sup>+</sup> maior no grupo HCV positivo. Observamos, ainda, que a razão de células T CD4<sup>+</sup>/ T CD8<sup>+</sup> é aumentada, principalmente

devido ao menor número de células T CD8<sup>+</sup> no grupo de indivíduos HCV positivos. Vários trabalhos têm demonstrado que pacientes infectados cronicamente com HCV apresentam deficiência na resposta de células T (KOZIEL, et al., 1992; REHERMANN et al., 1996; CHANG et al., 2001; WEDEMEYER et al., 2002; ULSENHEIMER et al., 2003). Segundo ABDEL-HAKEEM et al. (2010), a supressão do número de células T CD8<sup>+</sup> é fator determinante da persistência viral em indivíduos infectados pelo HCV cronicamente, quando comparado ao grupo indivíduos que apresentam eliminação espontânea do vírus.

Nossos resultados corroboram os dados da literatura que apontam para uma redução no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico em indivíduos infectados pelo HCV (LECHNER et al., 2000; GRUNER et al., 2000; GRUNER et al., 2001; THIMME et al., 2001; COX et al., 2005). Possivelmente, o recrutamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> para o fígado infectado pelo HCV, seja o principal responsável pela redução do número destas células no sangue periférico, conforme sugerido por HEYDTMANN et al. (2006) e observado em nossos resultados.

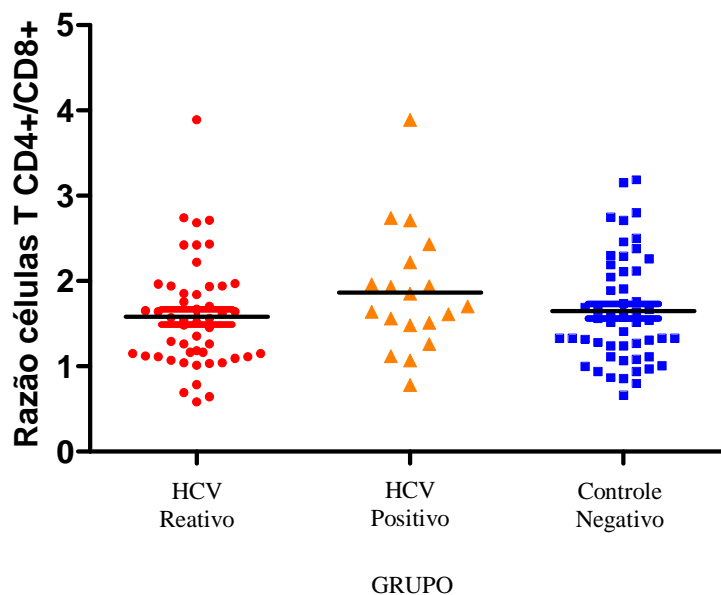


Figura 9. *Scatter dot plot* da razão média do número de células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, classificado por grupo. O traço horizontal mais escuro representa a média.

A recirculação de linfócitos do sangue periférico para os tecidos ocorre em condições normais como parte do processo de vigilância do sistema imune. Em resposta ao dano ou infecção, o recrutamento de linfócitos é aumentado e a natureza e distribuição do infiltrado determinará o curso e intensidade da inflamação. As moléculas de adesão celular apresentam uma importante função no recrutamento das células sanguíneas, pois estas permitem a interação entre os linfócitos circulantes e as células altamente especializadas do endotélio.

Para investigação dos mecanismos de recrutamento de linfócitos do sangue periférico para o fígado, em indivíduos infectados pelo HCV, caracterizamos o padrão de expressão das moléculas de adesão MAC-1, LFA-1 e VLA-4, em diferentes subpopulações de leucócitos circulantes. As comparações das intensidades de expressão das moléculas de adesão entre os grupos estudados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7

Comparação dos níveis de expressão de moléculas de adesão celular em linfócitos do sangue periférico dos grupos HCV reativo e Controle negativo.

População	Molécula de Adesão	Expressão de moléculas de adesão por intensidade de fluorescência (IF)			<i>p-value*</i>
		Grupo HCV reativo	Grupo HCV positivo	Grupo Controle Negativo	
Linf. T CD4 <sup>+</sup>	MAC1 (CD11b)	0,5	0,7	0,4	0,366
	LFA1 (CD11a)	9,8	10	12,1	0,020
	VLA4 (CD49d)	99,9	100	70,4	0,001
Linf. T CD8 <sup>+</sup>	MAC1 (CD11b)	2,4	2,1	1,9	0,772
	LFA1 (CD11a)	10,1	6,4	12,5	0,003
	VLA4 (CD49d)	107	100,8	83	0,007
Neutrófilos	MAC1 (CD11b)	64,5	80,5	66,1	0,871
	LFA1 (CD11a)	9,6	8,9	13,1	0,034
	VLA4 (CD49d)	4,2	4,5	4,2	0,082
Monócitos	MAC1 (CD11b)	58,1	53	56,6	0,967
	LFA1 (CD11a)	26,7	22,6	31,9	0,228
	VLA4 (CD49d)	143,4	148,7	119,1	0,021

\* *p-value* do Teste Kruskal Wallis e pós-teste Comparação Múltipla de Dunn.

Em condições de inflamação, as células endoteliais do fígado expressam P-selectinas, E-selectinas e VCAM-1, as quais não são detectadas em condições normais, neste grupo de células (ADAMS; SHAW, 1994; LALOR et al., 2002). Também tem sido observada a expressão aumentada de VLA-4 e LFA-1 em linfócitos infiltrados no fígado durante o processo de inflamação (MCNAB et al., 1996; YOONG et al., 1998). STEINHOFF et al. (1993), analisando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais do fígado, observaram que o processo inflamatório induzido por diferentes patologias, tais como a Hepatite C, influencia drasticamente no padrão de expressão destas moléculas.

Em nossos resultados observamos que a expressão de MAC-1, não foi estatisticamente diferente entre os grupos analisados (HCV reativo, HCV positivo e controle negativo). Há poucos dados na literatura relacionando a expressão de MAC-1 e a infecção por HCV. Estudos apontam que, em pacientes infectados pelo HCV, a concentração sérica de MAC-2BP é um importante prognóstico da gravidade/duração da doença, determinando, inclusive, a predisposição para o desenvolvimento de Carcinoma Hepatocelular (HCC) (KITTL et al., 2000; IACOVAZZI et al., 2008). Nossas observações apontam que a infecção pelo HCV não altera a expressão de MAC-1 em leucócitos do sangue periférico. Torna-se necessário a realização de novos estudos no sentido de elucidar o papel desta molécula na infecção pelo HCV.

Por outro lado, a expressão de LFA-1 e VLA-4 apresentaram significativas alterações em indivíduos infectados pelo HCV. Enquanto a concentração de LFA-1 foi menor nos linfócitos e neutrófilos do grupo de indivíduos infectados pelo HCV, a expressão de VLA-4 foi superior, em linfócitos e monócitos, neste mesmo grupo, quando comparado ao controle negativo.

Alguns autores demonstraram que a proteína-2 do envelope do HCV bloqueia a cascata de sinalização ativada por LFA-1, desencadeando deficiência no processo de



polarização e migração dos leucócitos através da parede dos vasos sanguíneos (VOLKOV et al., 2006).

Com base nos nossos resultados e nos dados da literatura há evidências de que a capacidade do HCV em interferir na expressão das moléculas de adesão sugere ser um importante mecanismo de escape viral.

#### **4.2 Perfil de Citocinas em Sangue Periférico**

Em geral, para que ocorra uma resposta imune efetiva contra a infecção pelo HCV é importante a ativação das células T por meio de células dendríticas pré-ativadas nos órgãos linfóides secundários. No processo infeccioso, a sinalização mediada por citocinas desempenha o papel de direcionar o tipo de resposta T *helper*. As citocinas que desencadeiam resposta do tipo Th-1, incluem IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$ , estão envolvidas principalmente na imunidade mediada por células e apresentam uma função importante na proteção contra patógenos intracelulares, como o HCV, por exemplo. As citocinas do tipo Th-2, tais como IL-4, IL-5, IL-6, regulam a resposta imune humoral; seus efeitos podem ser benéficos contra agentes extracelulares, mas frequentemente estão associados à progressão das doenças causadas por patógenos intracelulares (SHER; COFFMAN, 1992; PAUL; SEDER, 1994; SARIH et al., 1996).

Ao longo do processo evolutivo, o HCV desenvolveu habilidades no sentido de promover a infecção bloqueando a propagação dos sinais inflamatórios, interferindo, dessa maneira, a ativação completa da resposta imune (WILLBERG et al., 2003; DUSTIN; RICE, 2007). Para elucidar os mecanismos imunológicos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV, foram analisadas as concentrações de diferentes citocinas circulantes em indivíduos infectados por este vírus e não infectados (grupo controle).

Dentre as citocinas analisadas, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de IL-12 e IL-10 circulantes, sendo estas mais elevadas nos grupos de indivíduos infectados, conforme descrito na Tabela 8 e Figura 10.

Tabela 8

Comparação das concentrações de citocinas no sangue periférico entre os grupos HCV reativo e Controle negativo.

Citocina	Níveis de Citocinas (pg/ml)			<i>p-value</i> *
	Grupo HCV reativo	Grupo HCV positivo	Grupo Controle Negativo	
<b>IL1</b>	0	0	0	0,973
<b>IL4</b>	0	0	0	1,000
<b>IL5</b>	0	0	0	0,955
<b>IL6</b>	4,2	5,0	3,7	0,070
<b>IL8</b>	14,3	15,3	12,8	0,767
<b>IL10</b>	5,5	6,8	0	0,006
<b>IL12</b>	168	175,9	100,4	0,001
<b>TNF-</b>	0	0	0	0,777
<b>TGF-</b>	2.614	2.551	2.692	0,807
<b>IFN-</b>	4,7	6,4	5,7	0,594

\* *p-value* do Teste Kruskal Wallis e pós-teste Comparação Múltipla de Dunn.

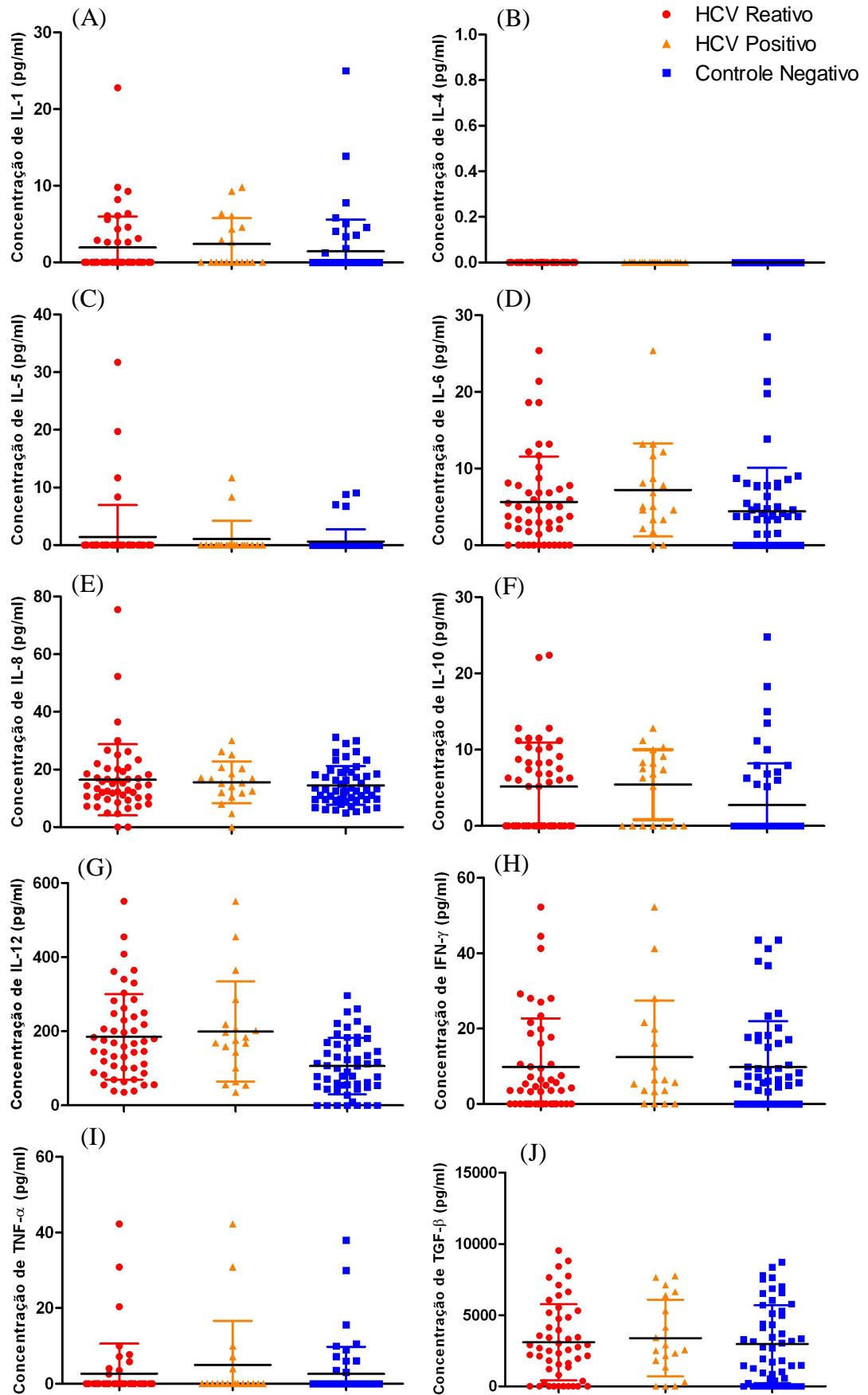


Figura 10. Scatter dot plot da concentração de citocinas séricas, classificado por grupo. O traço horizontal mais escuro representa a média. A- IL-1; B- IL-4; C- IL-5; D- IL6; E- IL-8; F- IL-10; G- IL-12; H- IFN- $\gamma$  ; I- TNF- $\alpha$  ; J- TGF- $\beta$  .

Como discutido anteriormente, a IL-12, citocina que induz um perfil de resposta Th-1, é responsável pela proliferação de células T e ativação de células NK, além de ser uma indutora de produção de IFN- $\gamma$ , fundamental para defesa contra patógenos intracelulares. Nossos resultados corroboram as informações descritas por QUIROGA et al. (1998), que observaram concentrações de produção de IL-12 mais elevadas em pacientes com Hepatite C crônica, em comparação a indivíduos saudáveis. A indução da resposta Th1, observada em indivíduos infectados pelo HCV pode ser considerada como uma tentativa do hospedeiro em inibir a infecção viral e, posteriormente, erradicar o vírus. Contrariamente, outros grupos têm observado uma menor produção de IL-12 em pacientes com Hepatite C crônica, relacionando isto às estratégias de escape do vírus (SARIH et al., 2000; LANCASTER et al., 2002). Possivelmente, as diferenças metodológicas têm contribuído para as discrepâncias descritas sobre o direcionamento da resposta Th1/Th2 em indivíduos infectados pelo HCV. De fato, conforme observado em nossos resultados, os trabalhos que quantificaram a produção de citocinas em sangue periférico (por ex. soro ou sobrenadante de cultura de PBMC) observaram um aumento na produção de IL-12, enquanto que, os grupos que determinaram as concentrações de citocinas produzidas pelas células T residentes do fígado descreveram uma deficiência na resposta Th1 (SARIH et al., 2000; LANCASTER et al., 2002).

Vários trabalhos apontam que os níveis de citocinas detectados no sangue periférico representam uma resposta sistêmica e não necessariamente o resultado da expressão da produção local de citocinas no fígado (FAN et al., 1998). Considerando as contradições relatadas nos dados da literatura referentes à polarização da resposta imune na Hepatite C, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que realizem a determinação simultânea da concentração destas citocinas, tanto no fígado quanto em sangue periférico.

Neste estudo não foi observado aumento significativo na concentração das citocinas IL-4, IL-5 e IL-6, no sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV. Possivelmente a

elevada concentração de IL-12 observada nestes indivíduos, seja determinante para a supressão das citocinas com perfil de resposta Th2.

Apesar da maior concentração de IL-12 no grupo HCV positivo, em relação ao controle negativo, não foi observado um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , cujas concentrações permaneceram semelhantes entre todos os grupos estudados. Curiosamente, a concentração sérica de IL-10, uma citocina regulatória da expressão da resposta Th1, foi mais elevada no grupo HCV positivo, quando comparado com o controle negativo. OSNA et al. (1997), observaram que a deficiência na produção de IFN- $\gamma$  em pacientes com Hepatite C crônica é consequência das altas concentrações de produção de IL-10. PIAZZOLA et al. (2000), demonstraram que células do sangue periférico de pacientes infectados pelo HCV, quando estimulados em cultura, produzem altas concentrações de IL-12 e IL-10, em concordância com nossos resultados. A produção de IFN- $\gamma$  é induzida quando são acrescentados ao meio de cultura, anticorpos neutralizantes monoclonais anti-IL-10. Nossos resultados corroboram os dados da literatura, evidenciando que a atividade regulatória da IL-10 sobre a resposta Th1, em indivíduos infectados pelo HCV, ocorre, principalmente, quando há um aumento desta citocina, inibindo a produção de IFN- $\gamma$ , mesmo quando há alta concentração de IL-12. Estes dados sugerem um mecanismo que favorece a cronificação da doença, com a persistência do vírus no local da infecção ou nas células do sangue periférico.

#### **4.3 Correlação entre Moléculas de Adesão Celular e Citocinas**

O importante papel das citocinas na indução da expressão das moléculas de adesão celular e, tendo em vista a observação, em nossos resultados, do aumento de IL-12 e IL-10, em pacientes infectados pelo HCV, foi analisada a correlação entre o aumento na concentração destas citocinas e a expressão de moléculas de adesão.

A análise de correlação bivariada da intensidade de fluorescência (IF) das moléculas de adesão celular expressas nas subpopulações de leucócitos (monócitos, neutrófilos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) demonstrou haver diferentes associações, conforme apresentado na tabela 9.

Nossos resultados demonstram haver correlações significativas entre as intensidades de expressão das moléculas de adesão das diferentes populações de leucócitos, no grupo de indivíduos saudáveis (controle negativo). Observamos ainda, que as correlações encontradas apresentam um valor de  $r$  positivo, indicando uma relação direta entre as intensidades de expressão das diferentes moléculas de adesão, ou seja, quanto maior a intensidade de expressão de uma determinada molécula de adesão, maior será a expressão das demais moléculas de adesão, num mesmo indivíduo. Estes dados corroboram as informações da literatura que demonstram a necessidade de uma coordenada cascata de sinalizações que levam à expressão e ativação dos diferentes tipos de moléculas de adesão, durante o processo de recrutamento de leucócitos para o tecido infectado (SPRINGER, 1995). Este processo envolve eventos moleculares sequenciais que iniciam-se basicamente com a captura e ligação de baixa afinidade, mediadas pelas selectinas, VLA-4 e LFA-1, a ativação, mediada por quimiocinas e o fortalecimento da adesão mediado pelas integrinas e posterior migração dos leucócitos.

No grupo de indivíduos infectados pelo HCV, foi observado um menor número de correlações significativas entre as intensidades de expressão das diferentes moléculas de adesão. Estes dados sugerem que a infecção pelo HCV interfere no processo de recrutamento de leucócitos para o fígado infectado, modificando o padrão de expressão de moléculas de adesão celular, que deixam de apresentar correlações entre si. Possivelmente, este mecanismo esteja relacionado com uma estratégia utilizada pelo HCV para interferir na resposta imune e evadir da defesa do hospedeiro.

Tabela 9

Correlação entre as intensidades de fluorescência (IF) de diferentes moléculas de adesão celular (MAC-1, LFA-1 e VLA-4) nas subpopulações de leucócitos (neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>).

Correlação <i>p</i> -value ( <i>r</i> )		Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>			Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>			Neutrófilos			Monócitos		
		MAC-1	LFA-1	VLA-4	MAC-1	LFA-1	VLA-4	MAC-1	LFA-1	VLA-4	MAC-1	LFA-1	VLA-4
Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	MAC-1	-	0,011* (0,34)	0,003* (0,40)	0,003* (0,39)	0,061* (-0,14)	0,624 (0,25)	<0,001* (0,54)	0,003 (0,40)	0,041* (0,28)	0,003* (0,39)	0,021* (0,32)	0,041* (0,28)
	LFA-1	0,253 (0,28)	-	0,001* (0,45)	0,094 (0,26)	<0,001* (0,23)	0,040* (0,50)	<0,001* (0,50)	<0,001* (0,73)	0,048* (0,25)	<0,001* (0,55)	<0,001* (0,72)	0,024* (0,31)
	VLA-4	0,897 (-0,03)	0,289 (0,26)	-	0,073 (0,07)	0,001* (0,55)	<0,001* (0,76)	0,028* (0,30)	0,003* (0,40)	<0,001* (0,56)	0,042* (0,27)	0,050* (0,27)	<0,001* (0,65)
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	MAC-1	0,001* (0,76)	0,126 (0,36)	0,652 (-0,11)	-	0,021* (0,01)	0,447 (0,11)	<0,001* (0,47)	0,106 (0,22)	0,578 (0,08)	0,001* (0,43)	0,010* (0,35)	0,472 (0,10)
	LFA-1	0,750 (-0,08)	0,124 (0,37)	0,378 (0,21)	0,737 (0,08)	-	0,049* (0,27)	0,002* (0,41)	<0,001* (0,52)	0,367 (0,13)	0,001* (0,42)	<0,001* (0,48)	0,760 (0,04)
	VLA-4	0,411 (-0,02)	0,699 (0,09)	0,002* (0,66)	0,518 (-0,16)	0,248 (0,28)	-	0,011* (0,35)	0,001 (0,42)	<0,001* (0,50)	0,001* (0,42)	0,006* (0,37)	<0,001* (0,62)
Neutrófilos	MAC-1	0,6013 (-0,13)	0,403 (-0,20)	0,791 (0,06)	0,819 (0,06)	0,210 (0,30)	0,151 (0,34)	-	<0,001* (0,66)	0,258 (0,16)	<0,001* (0,89)	<0,001* (0,71)	0,001* (0,43)
	LFA-1	0,286 (-0,26)	0,441 (-0,19)	0,468 (0,18)	0,673 (-0,10)	0,188 (0,32)	0,104 (0,38)	0,001* (0,74)	-	0,015* (0,33)	<0,001* (0,60)	<0,001* (0,74)	0,001* (0,42)
	VLA-4	0,177 (-0,32)	0,705 (-0,09)	0,016* (0,54)	0,395 (-0,21)	0,802 (0,06)	0,061 (0,44)	0,132 (0,36)	0,015 (0,55)	-	0,021* (0,21)	0,15 (0,33)	<0,001* (0,59)
Monócitos	MAC-1	0,542 (0,18)	0,863 (-0,05)	0,594 (0,16)	0,273 (0,31)	0,117 (0,44)	0,604 (0,15)	0,001* (0,79)	0,061 (0,52)	0,887 (0,04)	-	<0,001* (0,82)	<0,001* (0,53)
	LFA-1	0,770 (-0,09)	0,680 (0,12)	0,427 (0,23)	0,736 (0,10)	0,017* (0,62)	0,280 (0,31)	0,028* (0,58)	<0,001* (0,89)	0,233 (0,34)	0,015* (0,63)	-	<0,001* (0,55)
	VLA-4	0,852 (0,05)	0,259 (0,32)	0,191 (0,37)	0,409 (0,24)	0,387 (0,25)	0,542 (0,18)	0,102 (0,45)	0,003* (0,72)	0,021* (0,61)	0,154 (0,40)	0,001* (0,77)	-
HCV POSITIVO (n=19)													

CONTROLE NEGATIVO (n=53)

\* Correlação significativa (p<0,05)

A análise de correlação entre a expressão de moléculas de adesão e a concentração sérica de citocinas, nos indivíduos infectados pelo HCV do presente estudo, corrobora a hipótese de uma resposta imune polarizada para o perfil Th1. Tem sido documentado que as integrinas podem influenciar na polarização da resposta em Th1/Th2 (CLARK; BRUGGE, 1995). MITTELBRUNN et al. (2004) observaram que VLA-4 promove a polarização da resposta Th1 em linfócitos T virgens. Apesar de não ter apresentado correlação entre a expressão de VLA-4 e o aumento na concentração de IL12, foi observado uma maior expressão destas moléculas no grupo de indivíduos HCV positivos.

No estudo desenvolvido por EMOTO et al. (2003) foi observado que na infecção por *Listeria monocytogenes* há uma polarização da resposta imune para o tipo Th1, caracterizada por alta concentração de IL-12 e ausência de LFA-1. A análise de correlação entre a expressão de LFA-1 e a concentração sérica de IL-12 em indivíduos infectados pelo HCV demonstrou uma relação inversamente proporcional ( $r = -0,64$ ), conforme apresentado na figura 11.

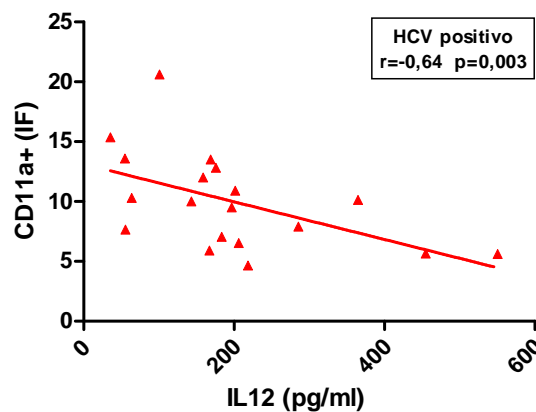


Figura 11. Correlação entre as intensidades de fluorescência (IF) de VLA-4 (CD11a) e os níveis séricos de IL-12 de indivíduos infectados pelo HCV.

Considerando que foi observada alta concentração de IL-12 e baixa expressão de LFA-1, nossos dados sugerem, mais uma vez, que a infecção pelo HCV esteja induzindo uma polarização para a resposta imune Th1, mesmo na ausência de IFN- $\gamma$ . A ausência de detecção



de IFN- pode ser devido ao tempo de infecção dos indivíduos, a ausência de sintomas clínicos aparentes ou outras variáveis que não foram abordadas em nosso estudo. Desta forma, novos estudos deverão ser feitos para melhor compreendermos os mecanismos envolvidos na resposta imune frente ao HCV.

As demais citocinas analisadas, possivelmente devido sua menor interferência na história natural da Hepatite C, uma vez que não apresentaram diferenças significativas entre os indivíduos HCV positivos e saudáveis, não apresentaram correlação com os níveis de expressão de moléculas de adesão. Contudo, nossos resultados reforçam a importância da relação entre as moléculas de adesão celular, a produção de citocinas e a infecção pelo HCV.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

1. A prevalência de infecção por HCV na população de doadores de sangue da Fundação HEMOAM, residentes em Manaus, no período de agosto/2009 a julho/2010, permanece semelhante aos dados obtidos por TORRES et al. (2009), que avaliou este indicador no período de setembro de 2005 a abril de 2007; sendo mais prevalente no grupo de primodoadores, quando comparado aos doadores de repetição;

2. A expressão das moléculas de adesão celular em leucócitos no sangue periférico é influenciada pela infecção por HCV, o que resulta em alterações no padrão de recrutamento de leucócitos para o fígado e, conseqüentemente, determina o desfecho da Hepatite C;

3. Há evidências de que a resposta imune contra o HCV, na população de doadores de sangue, apresente uma polarização para o perfil Th1, caracterizada por um aumento na concentração de IL-12 e IL-10 no sangue periférico;

4. A concentração de citocinas no sangue periférico de doadores infectados pelo HCV está relacionada à alteração no padrão de expressão de moléculas de adesão celular dos leucócitos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K. **Imunologia celular e molecular**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ADAMS, D.H.; SHAW, S. Leucocyte endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. **Lancet.**, v.343, p. 831-6. 1994.
- AHMAD, A.; ALVAREZ, F. Role of Nk and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. **J. leukoc. Biol.**, v. 76, n. 4, p. 743-59, 2004.
- ALOMAN, C.; GEHRING, S.; WINTERMEYER, P.; et al. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. **Gastroenterology**, v.132, n.2, p.698-708, 2007.
- ALON, R.; HAMMER, D. A.; SPRINGER, T. A. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. **Nature**, v. 374, p. 539-542, 1995.
- ALTER MJ, MARGOLIS HS, KRAWCZYNSKI K, JUDSON FN, MARES A, ALEXANDER WJ, HU PY, MILLER JK, GERBER MA, SAMPLINER RE, ET AL. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. **N. Engl. J. Med.**, v.327, n.27, p.1899-905, 1992.
- ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin. Liver Dis.*, v.15, n.1, p. 5-14, 1995.
- ALTER, M.J. Prevention of spread of hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n.5 Suppl 1, p.S93-98, 2002.
- ALTER, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; NAINAN, O.V.; MCQUILLAN, G.M; GAO, F.; MOYER, L.A.; KASLOW, R.A.; MARGOLIS, H.S. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. **N. Engl. J. Med.**, v.341, n.8, p.556-62, 1999.
- ANDRADE, A.F.B; OLIVEIRA-SILVA, M.; SILVA, S.G.C. Seroprevalence of hepatitis B and C vírus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 673-676, 2006.
- BARRETO, A.M.E.C.; TAKEI, K.; SABINO, E.C. Cost-effective analysis of idfferent algorithms for the dianosis of hepatitis C virus infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 126-134, 2008.
- BAZZONI, G.; HEMLER, M. E. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 306-314, 1998.

BOETTLER, T.; SPANGENBERG, C; NEUMANN-HAEFELIN, C.; PANTHER, E.; URBANI, S.; FERRARI, C.; BLUM, H.E.; Von WEIZSACKER, F.; THIMME, R. T Cells with a CD4+ CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during Chronic Hepatitis C virus infection. **Journal of Virology**, v. 79, no. 12, p. 7860-7867, 2005.

BRASS, V.; MORADPOUR, D.; BLUM, H.E. Molecular Virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 Update. **Int J Med Sci.**, v.3, n.2, p.29-34, 2006.

CACOUB, P.; LUNEL-FABIANI, F.; MUSSER, L.; PERRIN, M.; FRANGEUL, L.; LEGER, J.M.; HURAU, JEAN-MARIE; PIETTE, JEAN-CHARLES; GODEAU, P. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. **Am J Med.**, v.96, p. 124-132, 1994.

CACOUB, P.; CRISTOPHE, R.; ROSENTHAL, E.; COHEN, P.; LOURY, I.; LOUSTAUD-RATTI, V.; YAMAMOTO, A.M.; CAMPROUX, A.C.; HAUSFATER, P.; MUSSET, L.; VEYSSIER, P.; RAGUIN, G.; PIETTE, J.C. Extrahepatic Manifestations associated with hepatitis C virus infection: A prospective multicenter study of 321 patients. **Medicine**. v.79, n.1, p.47-56, 2000.

CALABRESE, L.H; ZEIN, N.; VASSILOPOULOS, D. Safety of antitumour necrosis factor (anti-TNF) therapy in patients with chronic viral infections: hepatitis C, hepatitis B, and HIV infection. **Ann. Rheum. Dis.**, v.63, Suppl 2, p.ii18-ii24, 2004.

CAMPBELL, J. J. *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. **Science**, v. 279, p. 3816384, 1998.

CAMPBELL, J.J.; QIN, S.X.; BACON, K.B.; MACKAY, C.R.; BUTCHER, E. C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors. Differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. **J. Cell Biol.**, v. 134, p. 2556266 1996.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.R; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.M.B.; COELHO, H.S.M.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C. e BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.**, v.38, n.1, p.41-9, 2005.

CAO, W.; LIU, Y.J. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. **Curr Opin Immunol.**, v.19, n.1, p.24630, 2007.

CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 5476556, 2003.

CAVALHEIRO, N.P. Hepatitis C: Transmission between couples. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, n.2, p. 86, 2004.

CHAN, J.R.; HYDUK, S.J.; CYBULSKY, M.I. Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte  $\alpha 4$  integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 11496 1158, 2001.

CHANG, K. M. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin. Liver Dis.**, v.7, n.1, p. 89-105, 2003.

CHANG, K.M.; THIMME, R.; MELPOLDER, J.J.; OKLACH, D.; PEMBERTON, J.; MOORHEAD-LOUDIS, J.; McHUTCHINSON, H.J.; ALTER, H.J.; CHRISARI, F.V. Differential CD4 and CD8 T-cells responsiveness in hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.33, p.267-76. 2001.

CHIARAMONTE, M.; STROFFOLINI, T.; LORENZONI, U.; MINNITI, F.; CONTI, S.; FLOREANI, A.; NTAKIRUTIMANA, E.; VIAN, A.; NGATCHU, T.; NACCARATO, R. Risk factors in community-acquired chronic hepatitis C virus infection: a case-control study in Italy. **J. Hepatol.**, v.24, n.2, p.129-34, 1996.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244, p.359-362, 1989.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P.J. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl., Acad. Sci. U.S.A.**, v.88, n.6, p.2451-5, 1991.

CLARK, E.A.; BRUGGE, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**, v.14, n.268(5208), p.233-9. 1995.

COX, A.L., MOSBRUGER, T., MAO, Q., LIU, Z., WANG, X.H., YANG, H.C., SIDNEY, J., SETTE, A., PARDOLL, D., THOMAS, D.L., RAY, S.C.. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. **J. Exp. Med.** 201, 174161752, 2005.

COX, A.L.; MOSBURGER, T.; LAUER, G.M.; PARDOLL, D.; THOMAS, D.L.; RAY, S.C. Comprehensive analyses of CD8+ t cells responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. **Hepatology**, v. 42, p. 104-12. 2005.

CROTTA S, RONCONI V, ULIVIERI C, et al. Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. **Eur J Immunol.**, v.36, n.4, p.919629, 2006.

CROTTA, S.; STILLA, A.; WACK, A.; et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. **J Exp Med.**, v.195, n.1, p.35641, 2002.

DOLGANIUC, A.; CHANG, S.; KODYS, K.; et al. Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. **J Immunol.**, v.177, n.10, p.6758668, 2006.

DUNNE, J.L.; BALLANTYNE, C.M.; BEAUDET, A.L.; LEY, K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF- induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. **Blood**, v. 99, p. 3366-341, 2002.

DUNNE, J.L.; BALLANTYNE, C.M.; BEAUDET, A.L.; LEY, K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF- $\alpha$  induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. **Blood**, v. 99, p. 3366-341, 2002.

DUSCHEIKO, G. Hepatitis C. **Medicine**, v.35, n.1, p43-8, 2007.

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

EASL INTERNATIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON HEPATITIS C: Consensus Statement. **J Hepatol.**, v.30,p.956-961, 1999.

EMOTO, M.; MIYAMOTO, M.; EMOTO Y, YOSHIKAWA I, BRINKMANN V, VAN ROOIJEN N, KAUFMANN SH. Highly biased type 1 immune responses in mice deficient in LFA-1 in *Listeria monocytogenes* infection are caused by elevated IL-12 production by granulocytes. **J. Immunol.**, v.171(8), p.3970-6. 2003.

FAN, X.G.; LIU, W.E.; LI, C.Z.; WANG, Z.C.; LUO, L.X.; TAN, D.M.; HU, G.L.; ZHANG, Z. Circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection. **Mediators of Inflammation**, v.7, p.295-297, 1998.

FUKUDA, Y.; NAKANO, I. Desafios ao desenvolvimento de uma vacina Anti-HCV. In: Roberto Focaccia: **Tratado de Hepatites Virais**. 1<sup>a</sup> ed, São Paulo: Atheneu, 2003.

GALE JR, M.; FOY, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 939-45, 2005.

GARDNER, J.P.; DURSO, R.J.; ARRIGALE, R.R.; DONOVAN, G.P.; MADDON, P.J.; et al. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.4498-503, 2003.

GIAGULLI, C. *et al.* RhoA and PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte *in vivo* homing. **Immunity**, v. 20, p. 253-263, 2004.

GIAGULLI, C. *et al.* The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating  $\beta$ 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for  $\beta$ 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. **J. Immunol.**, v. 177, p. 6046-611, 2006.

GIANNINI, C.; BRÉCHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death and Differentiation**, v.10. p.S27-S38, 2003.

GODIN, G.; CONNE, M.; SHERMAN, P. Determinants of repeated blood donation among new and experienced blood donors. **Transfusion**, v. 47, p. 1607-1615, 2007.

GODKIN, A.; NG, W.F.; GALLAGHER, K.; BETTS, G.; THOMAS, H.C.; LECHLER, R.I. Expansion of hepatitis C-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells after viral clearance: a mechanism to limit collateral damage? **J Allergy Clin Immunol.**, v.121, p.1277-1284, 2008.

GONÇALES, N.S.L.; COSTA, F.F.; VASSALLO, J. Diagnosis of hepatitis C vírus in Brazilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: comparasion with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** v. 42, n. 5, p. 263-267, 2000.

GRUNER, N.H.; GERLACH, T.J.; JUNG, M.C.; DIEPOLDER, H.M.; SCHIRREN, C.A.; SCHRAUT, W.W.; HOFFMANN, R.; ZACHOVAL, R.; SANTANTONIO, T.; CUCCHIARINI, M.; CERNY, A.; PAPE, G.R. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. **J. Infect. Dis.**, v.181, p. 1528-36. 2000.

GRUNER, N.H.; LENCHER, F.; JUNG, M.C.; DIEPOLDER, H.M.; GERLACH, T.; LAUER, G.; WALKER, B.; SULLIVAN, J.; PHILLIPS, R.; PAPE, G.R.; KLENERMAN, P. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis c virus. **J. Virology**, v. 75, p. 5550-58. 2001.

GUIDOTTI, L.C. e CHISARI, F.V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. **Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p. 23-61, 2006.

GUMBER, S.C.; CHOPRA, S. Heapatitis C: a multifaceted disease. **Ann. Intern. Med.**, v.123, p.615-620, 1995.

HEYDTMAN,M.; HARDIE, M. D.; SHIELDS, P. L.; FAINT, J.; BUCKLEY C. D.; CAMPBELL, J. J.; SALMON, M.; ADAMS, D. H. Detailed Analysis of Intrahepatic CD8 T Cells in the Normal and Hepatitis C-Infected Liver Reveals Differences in Specific Populations of Memory Cells with Distinct Homing Phenotypes. **The Journal of Immunology**, V.177, p.729-38. 2006.

HEYDTMANN, M.; ADAMS, D.H. Chemokines in the immunopathoenesis of Hepatitis C infection. **Hepatology**, v.49, p.674-688, 2009.

HIASA, Y.; TAKAHASHI, H.; SHIMIZU M; et al. Major histocompatibility complex class-I presentation impaired in transgenic mice expressing hepatitis C virus structural proteins during dendritic cell maturation. **J. Med.Virol.**, v.74, n.2, p.253661, 2004.

IACOVAZZI, P.A.; COZZOLONGO, R.; LANZILLOTTA, E.; FRISULLO, S.; GUERRA, V.; CORREALE, M. Serum 90K/Mac-2 Binding Protein (Mac-2BP) as a Response Predictor to Peginterferon and Ribavirin Combined Treatment in Hcv Chronic Patients. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 687-700. 2008.  
inflammatory cell recruitment *in vivo*. **J. Clin. Invest.**, v. 102, p. 152661533, 1998.

JAMES, A. 2001 **Ilustração do vírus da Hepatite C**. Disponível em: <http://faculty.ksu.edu.sa/5115/Pictures%20Library/Forms/DispForm.aspx?ID=5>. Acesso: Maio, 2009.

JUNG, U. et al. Transit time of leukocytes Rolling through venules controls cytokine-induced KAISHO, T.; AKIRA, S. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. **Crit. Rev. Immunol.**, v.20, n.5, p.3936405, 2000.

KANSAS, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. **Blood**, v. 88, p. 325963287, 1996.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Internal Medicine**, v. 45, n. 4, p. 183-91, 2006.

KEISERMAN, D.R.; BOTH, C.T.; MATTOS, A.A.; REMIAO, J.; ALEXANDRE, C.O.; SHERMAN, K.E. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in patients with hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. **Am. J. Gastroenterol.**, v.98, n.4, p.878-83, 2003.

KINACHI T. Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**. 2002, v.5, p.546-559.

KINASHI, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nature Rev. Immunol.**, v. 5, p. 5466559, 2005.

KITTL, E.M.; HOFMANN, J; HARTMANN, G; SEBESTA, C.; BEER, F.; BAUER, K.; HUBER, K.R. Serum protein 90K/Mac-2BP is an independent predictor of disease severity during hepatitis C virus infection. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.38, n.3, p.205-8. 2000.

KOZIEL, M.J.; DUDLEY, D.; WONG, J.T.; DIESTANG, J.; HOUGHTON, M.; RALSTON, R.; WALKER, B.D. Intrahepatic cytotoxic T Lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. **J. Immunol.**, v.149, p.3339-44, 1992.

KUNKEL, E.J.; LEY, K. Distinct phenotype of E-selectin deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling *in vivo*. **Circ. Res.**, v. 79, p. 119661204, 1996.

LALOR, F.P.; SHIELDS, P.; GRANT, A.J.; ADAMS, D.H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. **Immunology and Cell Biology**, v.80, p.52-64, 2002.

LANCASTER, T; SANDERS, E. ; CHRISTIE, J.M.L; BROOKS, C.; GREEN, S.; ROSENBERG, W.M.C. Quantitative and functional differences in CD8+ lymphocyte responses in resolved acute and chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v.9, p.18-28, 2002.

LAUER, G. M., WALKER, B. D. Hepatitis C virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 1, p. 41-52, 2001.

LAVANCHY, D. The global burden of hepatitis C. **Liver International**, v.29(s1), p.74-81, 2009.

LENCHE, F.; WONG,D.K.; DUNBAR, P.R.; CHAPMAN,R.; CHUNG, R.T.; DOHRENWEND, P.; ROBBINS, G.; PHILLIPS, R.; KLENERMAN, P.; WLAKER, B.D. Analysis of successful immune response in persons infected with hepatitis C virus. **J. Exp. Med.**, v.92, p.1499-512. 2000.



- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 678-689, 2007.
- LIU, S. *et al.* A fragment of paxillin binds the  $\alpha 4$  integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits  $\alpha 4$ -mediated cell migration. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 20887620894, 2002.
- LOZACH, P.Y.; LORTAT-JACOB, H.; DE LACROIX DE LAVALETTE, A.; STAROPOLI, I.; FOUNG, S.; *et al.* DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.20358666, 2003.
- MAIA, L.P.V.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SPEZIALI, E.; VERMHREN, R.; LIRA, E.F.; LIMA, T.A.; BRAGA, W.S.; TORRES, L.K.; MALHEIRO, A. Hepatitis C virus screening and clinical monitoring of biomarkers in patients undergoing hemodialysis. *Journal of Medical Virology*, v. 81, p. 1220-1231, 2009.
- MASTROMATTEO, A.M.; RAPACCINI, G.L.; POMPILI, M.; URSINO, S.; ROMANOSPICA, V.; GASBARRINI, G.; VANINI, G. Hepatitis C virus infection: other biological fluids than blood may be responsible for intrafamilial spread. *Hepatogastroenterology*, v.48, n.37, p.193-6, 2001.
- MCCRUDEN, E.A.; HILLAN, KJ.; MCKAY IC; CASSIDY, M.T.; CLARK, J.C. Hepatitis virus infection and liver disease in injecting drug users who died suddenly. *J. Clin. Pathol.*, v. 49, n.7, p. 552-5, 1996.
- MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.*, v. 100, p. 4856491, 1997.
- MCNAB, G.; REEVES, J.L.; SALMI, M.; HUBSCHER, S.G.; JALKANEN, S.; ADAMS, D. H. Vascular adhesion protein-1 supports adhesion of T lymphocytes to hepatic endothelium. A mechanism for T cell recirculation to the liver? *Gastroenterology*, v.110, p.522-8. 1996.
- MELLOR, J.; HOLMES, E.C.; JARVIS, L.M.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. **The International HCV Collaborative Study Group. J. Gen. Virol.**, v.76, n. pt10, p.2493-507, 1995.
- MEMON, M.I.; MEMON, M. A. Hepatitis C: an epidemiological review. *J. Viral Hepat.* v.9, n.2, p.84-100, 2002.
- MIDDLETON, J. *et al.* Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, v. 91, p. 3856395, 1997.
- MITTELBRUNN, M.; MOLINA, A.; ESCRIBESE, M.M.; YÁNEZ-MÓ, M.; ESCUDERO, E.; URSA, Á.; TEJEDOR, R.; MAMPASO, F.; SÁNCHEZ-MADRID, F. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *PNAS*, v. 101, n. 30, p. 11058-63, 2004.
- MORADPOUR, D.; BLUM, H.E. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver**

**Int.**, v.24, n.6, p.519-25, 2004.

NELSON, D. R. The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin. Liver Dis.**, v.5, n. 4, p. 931-53, 2001.

NELSON, D.R.; MAROUSIS,C.G.; DAVIS,G.L.; RICE,C.M., WONG,J.; HOUGHTON,M.; LAU,J.Y.The roles of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C.**J. Immunol.**, v.158, p.1473-1481, 1997.

NIH - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Consensus Statement on Management of Hepatitis C : 2002. **NIH Consens State Sci Statements**, v.19, n.3, p.1-46, 2002.

OSNA, N.; SILONOVA, G.; VILGERT N, H. E.; KUSE, V.; GIEDRAITIS, V.; ZVIRBLIENE, A.; MAURICAS, M.; SOCHNEV, A. Chronic hepatitis C: T-helper1/T-helper2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.57(8), p.703-10. 1997.

OSNA, N.; SILONOVA, G.; VILGERT, N.; HAGINA, E.; KUSE, V.; GIEDRAITIS, V.; ZVIRBLIENE, A.; MAURICAS, M.; SOCHNEV, A.; SCAND, **J. Clin. Lab. Invest.**, 57; 703 ó 710, 1997.

PALTANIN, L.F.; REICHE, E.M.V. Soroprevalência de anticorpos antivírus da hepatite C em doadores de sangue, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 393-399, 2002.

PAUL, W.E., SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell.** , v.28, p.241-51. 1994.

PAULA, V.S.; ARRUDA, M.E.; VITRAL, C.L.; GASPAR, A.M.C. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the western region of the brazilian amazon basin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 8, p. 000-000, 2001.

PAWLOTSKY, J.M. Pathophysiology of hepatitis C infection and related liver disease. **Trends Microbiol.**, v.12, n.2, p.96-102, 2004.

PAWLOTSKY, J.M. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C vírus infection. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.16, n.6, p.587-92, 2003.

PAWLOTSKY, J.M. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. **J. Hepatol.**, v.44, n.1 Suppl, p.S1063, 2006.

PAWLOTSKY, J.M.; ROUDOT-THORAVALE, F; SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; YAHIA, M.B.; ANDRE, C.; VOISIN, M.C.; INTRATOR, L.; ZAFRANI, E.S.; DUVAL, J. e DHUMEAUX, D. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. **Ann. Inter. Med.**, v.122,p.169-173, 1995.

PENIN, F. Structural biology of hepatitis C vírus. **Hepatology**, v.39, n.1, p.5-19, 2004.

PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2569ó2575, 2006.

- PIAZZOLLA, G.; TORTORELLA, C.; SCHIRALDI, O.; ANTONACI, S. Relationship Between Interferon-g, Interleukin-10, and Interleukin-12 Production in Chronic Hepatitis C and *In Vitro* Effects of Interferon-a. **Journal of Clinical Immunology**, v. 20, n. 1, 2000.
- PILERI, P.; UEMATSU, Y.; CAMPAGNOLI, S.; GALLI, G.; FALUGI, F.; PETRACCA, R.; WEINER, A.J.; HOUGHTON, M.; ROSA, D.; GRANDI, G.; ABRIGNANI, S. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v.282, p. 938641, 1998.
- QUIROGA ,J.A.; MARTÍN, J.; NAVAS, S., CARREÑO, V. Induction of interleukin-12 roduction in chronic hepatitis C virus infection correlates with the hepatocellular damage. **J Infect. Dis.**, v.178(1), p.247-51. 1998.
- RAMOS-CASALS, M.; LOUSTAUD-RATTI, V.; DE VITA, S.; ZEHER, M.; BOSCH, J.A.; TOUSSIROT, E.; MEDINA, F.; ROSAS, J.; ANAYA J.M. e FONT, J. Sjogren Syndrome associated with hepatitis C virus:A multicenter analysis of 137 cases. **Medicine.**, v.84,n.2.p.81-89, 2005.
- RAY, S.C.; FANNING, L., WANG, X.H., NETSKI, D.M., KENNY-WALSH, E., THOMAS, D.L. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. **J. Exp. Med.**, v.201, p.175361759, 2005.
- REHERMANN, B.; CHANG, K.M.; McHUTCHINSON, J.G.; KOKKA, R.; HOUGHTON, M.; CHISARI, F.V. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J. Clin. Investig.**, v.98, p.1432-1440, 1996.
- ROSEN, H.R., GRETCH, D.R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for futures therapies. **Mol. Med. Today**, v.5, n.9, p.393-9, 1999.
- RUSHBROOK, S.M.; WARD, S.M.; UNITT, E.; VOWLER, S.L.; LUCAS, M.; KLENERMAN, P.; et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8\_ T cells during persistent hepatitis C virus infection. **J. Virol.**, v.79, p.7852-7859, 2005.
- SARIH, M.; BOUCHRIT, N.; BENSLIMANE, A. Different cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from patients with persistent and self-limited hepatitis C virus infection. **Immunology Letters**, v.74, p.117-120, 2000.
- SARIH, M.; EL MAATAOUI, W.; BENSLIMANE, A. Analysis of apoptosis and a Th1/Th2 phenotype in HIV-infected patients. **Immunol. Lett.**, v.50, p.125-9. 1996.
- SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R.; ROCCASECCA, R.M.; ACALI, S.; et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J**, v.21, p.5017625, 2002.
- SCHENKEL, A.R., MAMDOUH, Z.; MULLER, W.A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. **Nature Immunol.**,v. 5, p. 3936400, 2004.
- SCHNEEBERGER, P.M.; KEUR, I.; VAN LOON, A.M.; MORTIER, D.; DE COUL, K.O.; HAPEREN, AV-V.; SANNA, R.; VAN DER HEIJDEN, T.G.; VAN DEN HOVEN, H.; VAN HAMERSVELT HW, QUINT, W.; VAN DOORN, L-J. The prevalence and incidence

of hepatitis C virus infections among dialysis patients in The Netherlands: a nationwide prospective study. **J. Infect. Dis**, v.182, p.1291-1299, 2000.

SHATTIL, S. J. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. **Trends Cell Biol.**, v. 15, p. 399-403, 2005.

SHER, A.; COFFMAN, R.L.; Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu. Rev. Immunol.**, v.10, p.385-409. 1992.

SHUKLA, D.D.; HOYNE, P.A.; WARD, C.W. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Arch Virol.**, v.140, n.10, p.1747-61, 1995.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus 6 15 years on. **J.Gen. Virol.**, v.85, n. Pt11, p. 3173-88, 2004.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J.; BONINO, F.; BRADLEY, D.W.; BRÉCHOT, C.; BROUWER, J.T.; CHAN, S.W.; CHAYAMA, K.; CHEN, D.S. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**, v.19, n.5, p.1321-4, 1994.

SIMMONDS, P.; BUKH, J; COMBET, C; DELÉAGE, G; ENOMOTO, N; FEINSTONE, S; HALFON, P; INCHAUSPÉ, G; KUIKEN, C; MAERTENS, G; MIZOKAMI, M; MURPHY, DG; OKAMOTO, H; PAWLITSKY, JM; PENIN, F; SABLON, E; SHIN-I, T; STUYVER, LJ; THIEL, HJ; VIAZOV, S; WEINER AJ e WIDELL A. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962-973, 2005.

SMITH, D.B.; MELLOR, J.; JARVIS, L.M.; DAVIDSON, F.; KOLBERG, J.; URDEA, M.; YAP, P.L.; SIMMONDS, P.; THE INTERNATIONAL HCV COLLABORATIVE STUDY GROUP. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure virus detection and typing. **J. Gen. Virol.**, v. 76, p. 1749-61, 1995.

SOUTO, F.J.; FONTES, C.J.; GASPAR, A.M.; PARANA, R.; LYRA, L.G. Concomitant high prevalence of hepatitis C virus antibodies and hepatitis B virus markers in a small village of the Amazon Region Mato Grosso State Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo**, v. 38, p 221- 223, 1996.

SOUTO, F.J.; FONTES, C.J.; MARTELLI, C.M.; TURCHI, M.D.; MARTINS, R.M.; ANDRADE, A.L. Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 719-723, 1999.

SPRINGER, T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, v.57, p. 827-872. 1995.

STEINHOFF, G.; BEHREND, M.; SCHRADER, B.; PICHLMAYR, R. Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: overview on expression patterns of leukocyte receptor and ligand molecules. **Hepatology**, v.18, n. 2, p.440-53. 1993.

STEINMAN, R.M.; HEMMI, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity.

**Curr. Top Microbiol. Immunol.**, v.311, p.17658, 2006.

STRAUSS, E. Hepatitis C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.34, n.1, p.69-82, 2001.

SY, T., JAMAL, M.M. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int. J. Med. Sci.**, v.3, n.2, p.41-6, 2006.

SZABO, G.; DOLGANIUC, A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. **Clin. Liver. Dis.**, v.12, p. 675-692, 2008.

TAKADA, N.; TAKASE, S.; TAKADA, A.; DATE, T. HCV genotypes in different countries. **Lancet**, v.339, n.8796, p.808, 1992.

TAN, S.L.; KATZE, M.G. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. **Virol.**, v.284, p.1-12, 2001.

TANJI, Y.; HIJIKATA, M; SATOH, S; KANEKO, T. e SHIMOTOHNO, K. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. **J. Virol.** , v.69, n.3, p.1575-81, 1995.

TAYLOR, D.R.; SHI, S.T. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes and Infection.**, v.31, n.4, p.819-27, 2000.

THE GLOBAL BURDEN OF HEPATITIS C WORKING GROUP. Global burden of disease (GBD) for hepatitis C. **J. Clin. Pharmacol**, v.44, p. 2069, 2004.

THIMME, R.; OLDACH, D.; CHANG, K. M.; STEIGER, C.; RAY, S.C.; CHISARI, F. V.; Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1395-1406. 2001.

TIMM, J., LAUER, G.M., KAVANAGH, D.G., SHERIDAN, I., KIM, A.Y., LUCAS, M., PILLAY, T., OUCHI, K., REYOR, L.L., ZUR WIESCH, J.S., GANDHI, R.T., CHUNG, R.T., BHARDWAJ, N., KLENERMAN, P., WALKER, B.D., ALLEN, T.M. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. **J. Exp. Med.**, v.200, p.1593-1604, 2004.

TORRES, K.L; MALHEIRO, A.; TATENO, A.; LIMA, T.A.; MAIA, L.P.V.; PIMENTEL, J.P.D.; MORAIS, M.P.E.; USUI, C.S.M.; BRAGA, F.O.; SILVA, I.A.F.; VASQUEZ, F.; LEVI, J.E. Hepatitis C virus in blood donors Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n.4, p. 676-677, 2009.

ULSENHEIMER, A.; GERLACH, J.T.; GRUENER, N.H.; JUNG, M.C.; SCHIRREN, C.A.; SCHRAUT, W.; ZACHOVAL, R.; PAPE, G.R.; DIEPOLDER, H.M. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis c. **Hepatology**, v.37, p. 1189-98. 2003.

VLADUTIU, D.S.; COSA, A.; NEAMTU, A.; STATE, D.; BRAILA, M.; GHERMAN, M.; PATIU, I.M.; DULAU-FLOREA, I. Infections with hepatitis B and C viruses in patients on maintenance dialysis in Romania and in former communist countries: yellow spots on a blank map? **J. Viral Hepat.**, v.7, p. 313-319, 2000.

- VOLKOV, Y.; LONG, A.; FREELEY, M.; GOLDENÓMASON, L.; O'FARRELLY, C.; MURPHY, A.; KELLEHER, D. The Hepatitis C Envelope 2 Protein Inhibits LFA-1-Transduced Protein Kinase C Signaling for T-Lymphocyte Migration **Gastroenterology**, v. 130, p.4826492, 2006.
- WEDEMEYER, H.; HE, X.S.; NASCIMBENI, M.; DAVIS, A.R.; GREENBERG, H.B.; HOOFNAGLE, J.H.; LIANG, T.J.; ALTER, H.; REHERMANN, B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. **J. Immunol.** v.169, p. 3347-58. 2002.
- WENDEL, S.; LEVI, J.E.; TAKAOKA, D.T. Primary screening of blood donors by NAT testing for HCV-RNA: development of an in-house method and results. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 177-185, 2007.
- WILLBERG, C. BARNES, E.; KLENERMAN, P. HCV immunology ó death and the maiden T cell. **Cell Death Differ.**, v.10 (Suppl 1), p.S39-S47. 2003.
- WONG, T.; LEE, S.S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. **CMAJ.**, v.174, n.5, p.649-59, 2006.
- XU, J.; LIU, S.; XU, Y.; TIEN, P.; GAO, G. Identification of the nonstructural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha. **Virus Research**, v.141, p.55-62, 2009.
- YONKERS, N.L.; RODRIGUEZ, B.; MILKOVICH, K.A.; et al. TLR ligand-dependent activation of naïve CD4 T cells by plasmacytoid dendritic cells is impaired in hepatitis C virus infection. **J. Immunol.**, v.178, n.7, p.4436644, 2007.
- YOONG, K.F.; MCNAB, G.; HUBSCHER, S.G.; ADAMS, D.H. Vascular adhesion protein-1 and ICAM-1 support the adhesion of tumor infiltrating lymphocytes to tumor endothelium in human hepatocellular carcinoma. **J. Immunol.**, v.160, p. 3978-88. 1998.
- ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.13, n.2, p.223-35, 2000.
- ZEIN, N.N. Vertical Transmission of hepatitis C: to screen or not to screen? **J. Pediatr.**, v.130, p.859-61, 1997.
- ZEUZEM, S.; SCHMIDT, J.M.; LEE, J.H.; RUSTER, B.; ROTH, W.K. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. **Hepatology**, v.23, n.2, p.366-71, 1996.
- ZHANG, J.; RANDALL, G.; HIGGINBOTTOM, A.; MONK, P.; RICE, C.M.; MCKEATING, J.A. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. **J. Virol.**, v.78, p.1448655, 2004.

**APÊNDICE A 6 CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
DA FUNDAÇÃO HEMOAM**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
CAAE- 0027.0112.000-08 – VERSÃO 002**

**I. IDENTIFICAÇÃO**

**Título:** Caracterização da resposta imune humoral e celular, determinação dos mediadores inflamatórios e corpúsculos lipídicos em doadores de sangue infectados com o vírus da hepatite C.

**Instituição:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - REMOAM.

**Pesquisador:** Adriana Malheiro.

**Data da Reapresentação ao CEP:** 05/02/2009

**II. OBJETIVOS**

**Geral**

Caracterizar a resposta imune e celular, os mediadores e a carga viral de doadores de sangue da Fundação Remoam infectados com o vírus da hepatite C, frente aos diferentes genótipos do vírus.

**Específicos**

1. Determinar o genótipo e a carga viral do RCV
2. Analisar a presença de corpúsculos lipídicos em PBMC (células mononucleares de sangue periférico).
3. Dosar os mediadores inflamatórios leucotrienos B4 e prostaglandina D2 em sobrenadantes de cultura de PBMC.
4. Analisar a expressão de moléculas de adesão de superfície celular LFA-1, VLA-4 e MAC-1, em populações de linfócitos T CD4 e CD8 de sangue periférico.
5. Analisar as citocinas séricas e intracelular como: IL-2,IL-4,IL-6,IL-8,IL-10,IL-12,IL-17, TNF ALF A E TNF GAMA.
6. Relacionar o genótipo e a carga viral com a presença de mediadores inflamatórios.
7. Descrever o perfil do HLA presente nesta população.

**III. SUMÁRIO DO PROJETO**

Trata-se de um estudo observacional descritivo que será realizado na Fundação HEMOAM onde serão avaliados em média 80 casos, no período de janeiro a julho de 2009, quando serão coletadas amostras que serão armazenadas em freezer -70°C do laboratório de pesquisa do Hemoam, para análise posteriores. Para cada amostra coletada de doador infectado pelo vírus da hepatite C, será coletado, uma amostra de doador saudável para construir o grupo controle.

Para as análises laboratoriais serão coletados 20 ml de sangue venoso periférico, destruídos em quatro tubos para a realização dos testes.

**Critérios de inclusão/exclusão:** serão selecionados doadores de sangue de ambos os sexos, acima de 18 anos, residentes em Manaus que apresentarem reatividade nos teste de triagem sorológicas para anti-RCV. Serão excluídos os doadores com sorologia positiva para marcadores



de Hepatite B, HIV, HTLV, Doença de Chagas, sífilis e doadores após repetição do teste anti-HCV com amostras, apresentarem resultado negativo para o parâmetro.

**Adequação do título e da metodologia:** Adequados

**Adequação das condições e custo:** O trabalho será coordenado pela Dra. Adriana Malheiro e por uma equipe de pesquisadores devidamente qualificados. Entretanto, não há médico na equipe e não há descrição na metodologia de quem fará o atendimento médico destes pacientes.

**V. Comentários do CEP frente à resolução CNS 196/96 e resoluções complementares.**

Projeto atende as normas pertinentes e a pesquisadora atendeu todas as pendências conforme parecer anterior Versão 001.

**VI. Parecer do CEP:**

**Projeto Aprovado.** Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP **relatórios** parciais e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: **16/08/2009**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE** deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

**VII. Parecer do CEP: 16.02.2009**

**JOSIANE NEVES**

Secretária Executiva do  
Comitê de Ética em Pesquisa da  
Fundação HEMOAM



**APÊNDICE B 6 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO APLICADO  
PARA PARTICIPAÇÃO DE DOADORES QUE APRESENTARAM REATIVIDADE PARA  
HCV**

**Título do estudo:** Caracterização da resposta imune humoral e celular, determinação dos mediadores inflamatórios e corpúsculos lipídicos em doadores de sangue infectados com o vírus da hepatite C.

O estudo visa conhecer como o organismo combate o vírus da hepatite C.

Para este estudo será coletada amostra de 20ml de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus, determinação do tipo e quantidade do vírus no organismo, além de realizar testes para verificar como o organismo combate o vírus da hepatite C. Parte dos testes serão realizados no HEMOAM em Manaus, no IMT-USP/SP e LIP/USP-Ribeirão Preto/SP.

Não existem riscos associados à sua participação neste estudo. O único desconforto é a picada da agulha para a coleta de amostra de sangue.

A sua participação neste estudo não implica em nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a). O estudo, contudo, proporcionará maiores esclarecimentos sobre a prevenção e infecção pelo vírus da hepatite C.

Sendo o senhor(a) participante deste estudo terá, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à doença em estudo, podendo entrar em contato com Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro e Tatiane Amabile (HEMOAM Tel: 3655-0111). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do HEMOAM.

A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor(a) pode retirar sua participação a qualquer momento, o senhor(a) não terá qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da Instituição onde faz o tratamento.

Para eventuais ressarcimentos e danos provenientes da pesquisa, a equipe envolvida se propõem a atender os participantes.

Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

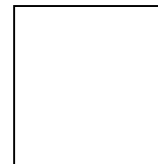
O sangue coletado (20ml) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos moleculares e imunológicos posteriores.

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo.

O Sr.(a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras para o estudo dos tipos de vírus? ( ) sim ou ( ) não

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante



Impressão dactiloscópica

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador ou colaborador

Manaus, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

**Título do projeto:** Caracterização da resposta imune humoral e celular, determinação dos mediadores inflamatórios e corpúsculos lipídicos em doadores de sangue infectados com o vírus da hepatite C.

Código: \_\_\_\_\_

**Dados pessoais/ demográficos:**

Nome do doador: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: F M

Data da doação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Tel de contato: \_\_\_\_\_

Número da bolsa: \_\_\_\_\_

Local da doação: HEMOAM (Manaus) Maternidade Ana Braga (Manaus)

Coleta Externa (Manaus)

**Dados epidemiológicos:**

É a primeira doação? Sim Não

Quando foi a última doação?(informar dados das doações anteriores) \_\_\_\_\_

Estado civil: Casado Solteiro viúvo Divorciado Outros \_\_\_\_\_

Múltiplos parceiros? Sim Não

Profissão \_\_\_\_\_

Já trabalhou em: Hospitais Clínicas médicas Unidades de diálise

Laboratório Consultório dentário Afins

Já precisou receber transfusão de sangue? Não Sim

Quando? \_\_\_\_\_ Por qual motivo? \_\_\_\_\_

Já teve hepatite? Sim Não Há quanto

tempo? \_\_\_\_\_

Faz ou fez uso de drogas injetáveis/outras? Sim Não

Já fez cirurgia? Sim Não

Quando? \_\_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

Possui tatuagem ou piercing? Sim Não

Utiliza terapia por acupuntura? Sim Não

Faz uso de bebidas alcoólicas? Sim Não

Comentários: \_\_\_\_\_

Responsável pelo preenchimento: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL NO HEMOAM****Testes sorológicos ELISA**

Marca: \_\_\_\_\_

DATA	TESTE	DO	CUT OFF	RESULTADO

**Teste complementar Imunoblot**

Marca: \_\_\_\_\_

DATA	BANDAS				
	c100	c33c	c22(p)	NS5	hSOD

Observações: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Carga Viral: \_\_\_\_\_ UI/mL.

Genotipagem: \_\_\_\_\_.

Contagem de Corpúsculos lipídicos: \_\_\_\_\_

Dosagem de Leucotrieno B4: \_\_\_\_\_

Dosagem de Prostaglandina D2: \_\_\_\_\_

 \_\_\_\_\_  
 Pesquisador responsável

Manaus/AM, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**APÊNDICE D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO  
CONTROLE PARA PARTICIPAÇÃO DE DOADORES NÃO PORTADORES DE HCV**

**Título do estudo:** Caracterização de mediadores inflamatórios e carga viral em células mononucleares de sangue periférico obtidas de doadores de sangue com diferentes genótipos do vírus da hepatite C.

O estudo visa conhecer como o organismo combate o vírus da hepatite C, para isso é necessário a comparação com doadores que não estejam infectados com o vírus da hepatite C.

Para este estudo será coletada amostra de 10mL de sangue. Serão feitos testes para avaliar a defesa do organismo contra o vírus da hepatite C Parte dos testes serão realizados no HEMOAM em Manaus, e outros serão feitos no LIP/USP-Ribeirão Preto/SP.

Não existem riscos associados à sua participação neste estudo. O único desconforto é a picada da agulha para a coleta de amostra de sangue.

A sua participação neste estudo não implica em nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a). O estudo, contudo, proporcionará maiores esclarecimentos sobre a prevenção e infecção pelo vírus da hepatite C.

Sendo o senhor(a) participante deste estudo terá, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, podendo entrar em contato com Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro ou Tatiane Amabile (HEMOAM Tel: 3655-0111).

A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor(a) pode retirar sua participação a qualquer momento, o senhor(a) não terá qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da Instituição.

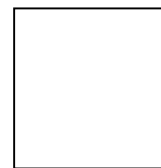
Para eventuais ressarcimentos e danos provenientes da pesquisa, a equipe envolvida se propõem a atender os participantes.

Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

O sangue coletado (10mL) será utilizado apenas para o que se propõe neste estudo.

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo.



\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Impressão dactiloscópica

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador ou colaborador

Manaus, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_