



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM)
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM PATOLOGIA
TROPICAL**

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM DOADORES DE
SANGUE DA CIDADE DE MANAUS INFECTADOS COM O
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)”.**

Christiane Santana de Melo Usui

**Manaus
2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM)
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM PATOLOGIA
TROPICAL**

Christiane Santana de Melo Usui

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM DOADORES DE
SANGUE DA CIDADE DE MANAUS INFECTADOS COM O
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu da Universidade Federal do Amazonas - Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical-UFAM.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro

**Manaus
2007**

Christiane Santana de Melo Usui

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM DOADORES DE
SANGUE DA CIDADE DE MANAUS INFECTADOS COM O
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu da Universidade Federal do Amazonas - Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical-UFAM.

Aprovado em : 14/11/007

Banca Examinadora:

Prof^o. Dr. Felipe Gomes Naveca
Fundação Alfredo da Mata

Prof^a Dr^a. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2007**

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

Usui, Christiane Santana de Melo

U88a Avaliação da resposta imune em doadores de sangue da cidade de Manaus infectados com o vírus da hepatite C (HCV) / Christiane Santana de Melo Usui. - Manaus: UFAM, 2007.

86 f.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro

1. Hepatite C 2. Doadores de sangue 3. Saúde pública I. Malheiro, Adriana II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.36-002 (043.3)

Ao meu pai José Augusto que sem poder se despedir, nós deixou às 6h da manhã do dia 09 de maio de 2005, deixando um enorme vazio em nossas vidas. Tenho certeza que neste momento, ele seria o mais orgulhoso dessa minha conquista.

Agradecimentos

A fé que tenho em DEUS, que não me deixou desistir depois de ter perdido meu pai, ter me casado, ter perdido o primeiro filho e ter ganhado outro nesses longos dois anos e oito meses.

A amiga e incentivadora Dra Kátia Luz Torres Silva, Farmacêutica Bioquímica, diretora de ensino e pesquisa da fundação HEMOAM, que me convidou a participar deste trabalho. Sem ela esse trabalho não existiria.

A Dra. Adriana Malheiro, minha orientadora, pela dedicação e puxões de orelhas, sem ela esse trabalho também não teria se concretizado.

A FHMOAM (Dra Leny Passos, Diretora Presidente), pelo apoio e incentivo a pesquisa científica.

Aos alunos e colaboradores do projeto, vinculados ao Departamento de Ensino e Pesquisa (DEP): Tatiane Amabile, Daniel, João Paulo Pimentel, Débora Galvão, Aldenize Cabral, Igor, Laura Maia, Luana Karen, Iza Regia, Rose. Todos puseram a MÃO NA MASSA. Obrigada de coração.

Aos enfermeiros da triagem e coleta: Jaqueline, Valéria, Sônia, Fernandes e Loreci; pelo apoio e colaboração com o projeto.

Ao Edson Lira (Edinho) colega de trabalho e amigo pela força com as estatísticas.

A minha mãe Genilda Melo que sempre está pronta para me ajudar, nos assuntos do coração, da cabeça e do bolso. Mãe amo muito você.

Ao meu marido Willy e meu filho Ricardo por fazerem parte da minha vida, e que por eles sou esposa, mãe, dona de casa, profissional e estudante, sempre.

“Mestre não é quem ensina, mas quem de repente aprende”.

-Guimarães Rosa-

RESUMO

A hepatite por vírus C (HCV) representa um grande problema de saúde pública devido à alta prevalência da infecção na população, que varia de 0,3 a 14,5%. A hepatite C é considerada uma doença transmitida principalmente pelo sangue e seus derivados, sendo o principal agente etiológico das hepatites pós transfusionais do mundo. A doença crônica, com poucas manifestações clínicas, ocorre em 80% dos indivíduos. Consequentemente, a hepatite C é frequentemente diagnosticada quando o indivíduo se submete aos testes de triagem sorológica em bancos de sangue. O diagnóstico laboratorial específico da hepatite C é realizado pela pesquisa de anticorpos anti-HCV, no teste ELISA e no Immunoblot. O perfil da resposta imunológica desenvolvida pelos indivíduos infectados pelo HCV, envolve a resposta de células T helper 1, mediada pela ativação de linfócitos TCD4⁺, tão bem como os linfócitos TCD8⁺, produção de IL-12 e IFN- γ , parece ser uma resposta extremamente importante para “clearance” viral. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imunológica humoral e celular de doadores de sangue que apresentaram sorologia reativa para hepatite C. No período de setembro de 2005 a novembro de 2006 foram convidados 100 doadores de sangue que apresentaram sorologia positiva para hepatite C e 100 doadores saudáveis a participar voluntariamente do estudo. Nossos resultados demonstraram que pelo teste complementar Immunoblot RIBA, 46% apresentaram resultados indeterminados, 36% foram reativos e 18% negativas. Das amostras negativas 61,11% (n=11) tiveram reação fracamente positiva, das indeterminadas 76% (n=35) tiveram razão DO/cutoff inferior a 2 e 50% (n=18) das reativas tiveram essa razão superior ou igual a 3. Não observamos diferenças estatísticas significante entre os valores encontrados de ALT, sendo que os mesmos permaneceram dentro dos valores de normalidade. Entre as populações de linfócitos ativados, a população de LTCD3⁺/CD4⁺ apresentou diferença estatística significante, na qual o grupo com diagnóstico confirmado por immunoblot (HCV⁺/BLOT R) apresentou menor número de células em relação aos outros grupos (Soronegativos, HCV⁺/BLOT NR, HCV⁺/BLOT IND). Avaliando as sub-populações de leucócitos ativados observamos diferenças estatísticas significantes entre as populações de neutrófilos CD69⁺ e monócitos CD69⁺, mas não encontramos diferença significante entre as populações de linfócitos CD69⁺ e eosinófilos CD69⁺. Desta forma concluímos que a infecção pelo HCV induz a alterações celulares que podem estar evoluindo para “clearance” viral ou para cronificação da infecção. No entanto para definirmos tal perfil, novos estudos serão necessários.

Palavras chaves: hepatite C, Doadores de sangue, Resposta imune.

ABSTRACT

Hepatitis C virus represents a serious problem on public health, because of the high prevalence in the population, estimate from 0.3% to 14.5%. Hepatitis C is usually transmitted by blood and derivations, and the main etiologic agent of transfusion in the world. The chronic disease, with few clinical manifestations, occurs on 80% of the patients. Furthermore, the hepatitis C, is usually diagnosed when the individual is submitted to serological screening in blood banks. The specific laboratorial diagnostics of HCV is made on researching for anti-HCV antibodies, as on ELISA and Immunoblot tests, but a representative percentual of blood donors shows a specific antibodies pattern against viral fractions that does not mean as a confirmed infection, but as a undetermined pattern. The immunological response profile developed by the individuals infected by HCV, involves responses of T helper cells 1, mediated by lymphocyte TCD4⁺ activation, as good as TCD8⁺ lymphocyte and IL-2 and IFN- γ production and seems to be an extremely important response for the viral clearance. The objective in the present study is analyze the immunological humoral and cellular response of blood donors whose sororeactive for hepatitis C in ELISA and Immunoblot tests. From September of 2005 to November of 2006 one hundred blood donors sororeactive to hepatitis C and one hundred healthy donors were invited to participate under their consentment of the study. In our results given by Immunoblot supplementary test, 46% showed undetermined results, 36% was reactive and 18% negative. Among negative samples 61.11% (n=11) had a weak positive reaction, among the undetermined, 76% (n=35) had DO/cut off rate below 2 and 50% (n=18) reactive had this rate above or equals to 3. There was no significative statistics differences observed among ALT data on both groups, thus remained under normal values. Among the activated lymphocytes population, those ones of LTCD3⁺/CD4⁺ showed statistics difference, whose the Immunoblot confirmed (HCV⁺/BLOT R) diagnose group shows a fewer cells number from the other groups (soronegative, HCV⁺/BLOT NR, HCV⁺/BLOT IND). Assessment the leukocyte subpopulation we can observe a significant statistics difference between CD69⁺ neutrophiles and CD69⁺ monocytes, we did not observed significant difference between CD69⁺ lymphocyte population and CD69⁺ eosinophiles. We have conclude that the HCV infection persuade cellular changes that can be clearance viral or on chronic infection. However, to define this profile, there will be needed new researches.

Key words: Hepatitis C, Blood Donors, Immune Response

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Características estruturais do vírus da hepatite C (HCV)	19
1.1.1 Genoma viral	20
1.2 Epidemiologia	21
1.3 Formas de transmissão	24
1.4 História natural e Características clínicas	26
1.5 Resposta Imune ao Vírus da Hepatite C.....	29
2. OBJETIVOS	32
2.1. Geral.	32
2.2 Específicos.	32
3. METODOLOGIA	33
3.1 Modelo do estudo	33
3.2 Características da área de estudo.....	33
3.3 População de estudo e casuística.....	34
3.4 Testes laboratoriais.....	36
3.4.2 Imunoblot – Teste Complementar:.....	37
3.4.3 Testes Bioquímicos.	39
3.4.4 Análise da expressão de moléculas de superfície através da Citometria de Fluxo – FACs	40
3.4.5 Financiamento e Avaliação do Comitê de Ética	42
4. RESULTADOS:.....	43
4.1 Relação DO/CUT OFF (densidade óptica e ponto de corte) para teste ELISA Anti- HCV.	43
4.2 Análise da distribuição das bandas de proteínas no Immunoblot HCV RIBA 2.0.	44
4.3 Análise bioquímica de Alanina Aminotransferase (ALT).....	47
4.4 Análise bioquímica de Aspartato Aminotransferase (AST).	48
4.5 Análise de populações e sub-populações de leucócitos em sangue periférico.....	50
4.6 Análise das populações de linfócitos por Citometria de fluxo.....	52
4.7 Análise da sub-população de leucócitos ativados por citometria de fluxo.	55
4.8. Correlação entre a população de linfócitos T CD4 ⁺ com linfócitos T CD8 ⁺	57
4.9 Correlação das populações de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ com a expressão do marcador de ativação CD69 ⁺	58
4.10 Análise das Correlações de ALT e AST com as populações de linfócitos:	59

5. DISCUSSÃO.....	61
6. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO A	80
ANEXO B	Erro! Indicador não definido.
ANEXO C	81
ANEXO D	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características estruturais do vírus da hepatite C (HCV)

O Vírus da hepatite C (HCV) foi identificado por Choo e colaboradores em 1989, sendo inicialmente chamado de Vírus não A, não B. Devido a sua composição estrutural foi classificado como pertencente à família *Flaviviridae* (Choo et al, 1989) e gênero Hepacivírus (Simmonds et al, 2005).

O vírus da hepatite C possui genoma RNA. Isolados individuais consistem de populações bastante semelhantes, ainda que heterogêneas, de genomas virais (quasiespécies). Provavelmente como consequência dessa diversidade genética, o vírus da hepatite C tem a capacidade de escapar da resposta imune do hospedeiro, o que resulta em uma alta taxa de infecção crônica. Através da comparação das seqüências genômicas de nucleotídeos de diferentes isolados virais. (Hajjar et al, 1999).

Foram identificados, em várias partes do mundo, 6 genótipos diferentes, numerados de 1 a 6. Cada tipo pode ser dividido em subtipos (cerca de 50), que se designam por uma letra a seguir ao número a que correspondem e que diferem, em média 20% na seqüência nucleotídica. Os genótipos têm uma distribuição geográfica variável nas diferentes regiões do globo, refletindo, provavelmente, a história epidemiológica do vírus e o modo de transmissão da doença entre os hospedeiros. (Campioto et al, 2005).

1.1.1 Genoma viral

O genoma do HCV é formado por RNA de fita simples contendo cerca de 9.400 nucleotídeos. A partícula viral é composta por um envoltório derivado da membrana celular do hospedeiro contendo as glicoproteínas virais E1 e E2 inseridas. O nucleocapsídeo é formado pela proteína C (cerne) e envolve o RNA viral. Esta organização genômica é semelhante aos *pesti* e *flavivirus* e por isso o HCV foi classificado junto a estes como um gênero a parte da família *Flaviviridae*. Flanqueando as regiões codificadoras encontramos as regiões regulatórias 5' e 3', sendo ambas muito conservadas a nível da seqüência de RNA entre os diversos isolados de HCV. A região codificante compõe-se de uma longa seqüência aberta de leitura (Open Reading Frame) que é traduzida em uma poliproteína precursora de aproximadamente 3.000 aminoácidos contendo uma região estrutural e uma não estrutural (Houghton et al, 1991). O processamento desta por proteases virais e celulares leva à formação das proteínas estruturais e funcionais do HCV. As proteínas estruturais derivam do segmento amino-terminal (N-terminal) da poliproteína, formando a proteína do capsídeo (C- 19kD) e as glicoproteínas hipervariáveis E1 (gp 33) e E2(gp 72) que se destinam ao envoltório viral. As proteínas não-estruturais (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4Bb, NS5A e NS5B ocupam o restante do genoma e representam a extremidade carboxiterminal da poliproteína viral (Sáez-Alquezar et al, 2001). A região do genoma que codifica as proteínas estruturais (região 5'UTR do genoma) e as 99 bases terminais da região 3'UTR , representa a seqüência mais altamente conservada em relação a diferentes isolados virais, o que sugere cumprir com o papel regulador durante a replicação viral (Houghton et al, 1991; Simmonds et al, 2005). No entanto, o vírus da hepatite C apresenta uma característica importante de variabilidade genética decorrente de mutações no genoma, causadas por

erros na etapa de replicação viral por ação da RNA polimerase (Van Doorn, 1994; Lyra et al, 2004; Simmonds et al, 2005).

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 (Carmo et al, 2002).

As seis análises comparativas das seqüências completamente ou parcialmente conhecidas dos isolados do HCV publicadas indicam que existam pelo menos seis grupos distintos do vírus e mais de 50 subtipos de HCV (Pinho et al, 2005; Simmonds et al, 2005). Possivelmente, após a análise completa de outras regiões do genoma dos isolados surgirão novos grupos e subgrupos (Simmonds et al, 2005).

1.2 Epidemiologia

O HCV constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo por ser a maior causa de hepatite crônica e carcinoma hepatocelular (Santana et al, 2001; OMS, 2007)

Estima-se que aproximadamente 180 milhões de indivíduos no mundo estejam acometidos pela infecção crônica com o vírus da hepatite C com risco de desenvolvimento de hepatite crônica e ou cirrose podendo evoluir para um carcinoma hepatocelular (Cornier et al, 2004).

A hepatite por vírus C (HCV) representa um importante problema de saúde pública devido à alta prevalência da infecção na população, que varia de 0,3 a 14,5%

(Gonçales, 1997; Sáez-Alquezar, et al, 2001). Campioto e colaboradores em 2005 referem-se ainda a existência de, no mínimo, seis vezes mais brasileiros com hepatite C do que com AIDS.

Projeções mostram que nos próximos anos a hepatite C deve ocasionar um aumento de 600% na demanda por transplantes de fígado. Oficialmente, a hepatite C matou 813 brasileiros entre 1997 e 1999, mas esses baixos números não retratam a realidade (Xavier, et al, 2001).

A maioria dos infectados tem entre 25 e 40 anos e só descobre o vírus no momento em que doa sangue ou quando a doença já está em um estágio mais avançado, o que pode demorar mais de 20 anos (Esteban et al, 1990).

Nos Estados Unidos da América a hepatite C representa aproximadamente 20% dos casos de hepatite aguda. Aproximadamente quatro milhões de norte americanos estão infectados pelo vírus da hepatite C, ocorrendo a cada ano 30 mil casos novos, dos quais somente 25 a 30% são diagnosticados. A hepatite C é responsabilizada por 8 mil a 10 mil mortes, por ano, e é a principal causa de transplantes hepáticos nos Estados Unidos (Cox et al, 2005).

No Brasil, estudos feitos na cidade de São Paulo demonstram que a prevalência estimada é de 1,42% (0,7 a 2,12% IC) com ocorrência mais freqüente em adultos com 30 anos ou mais, com prevalência atingindo seu pico de 3,80% no grupo etário de 50 a 59 anos (Focaccia et al, 1998; Bassit et al, 1999). Na população em geral os dados ainda são muito precários, mas as estimativas atuais atingem 1,5% em média (Gervais, 2001).

O HCV constitui um particular problema de saúde pública entre os hemocentros, devido a sua alta taxa de transmissão por via parenteral, principalmente por sangue e hemoderivados, a incidência entre doadores de sangue varia de 0,5 a 15% (Sáez-Alquezar et al, 2001).

No Estado do Amazonas, dados de triagem sorológica da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), revelam que 0,67% dos doadores de Manaus apresentaram soropositividade para anti-HCV. Observou-se também que no período de agosto de 2001 a julho de 2003 (2 anos) foram registrados na capital do Amazonas 345 doadores de sangue soropositivos para hepatite C sendo em média diagnosticados 170 casos novos por ano na população de doadores de sangue. A infecção pelo HCV mantém alta incidência mundial, apesar da significativa redução da transmissão por transfusão de sangue (Torres et al, 2003).

Os genótipos do HCV apresentam distribuição universal com prevalências regionais. Os genótipos 1, 2 e 3 predominam no Brasil, China, Estados Unidos, Europa, Japão, Taiwan e Tailândia. O genótipo 1a é o mais encontrado no nordeste Europeu e América do Norte, enquanto o subtipo 1b é o mais comum no Japão, sudeste e oeste Europeu. Recentes levantamentos epidemiológicos na Itália enfatizam a importância da infecção assintomática do genótipo 2 (principalmente o subtipo 2a) na população em geral, particularmente em áreas onde o subtipo 1b se apresenta como hiperendêmico (Cavalheiro, 2004). Os genótipos 5 e 6 são mais frequentes na África do Sul e sudeste asiático, respectivamente, e o genótipo 4 predomina na África Central e Egito (Barret et al, 2001) No Brasil, o genótipo 1b ocorre com maior frequência na população de doadores de sangue, sendo também encontrados em outros grupos os subtipos 1a, 2a, 2b e

3a (Gonçales et al, 2000; Gruner et al, 2000). Recentemente foram detectados o subtipo 4 (Carmo et al, 2002) e subtipo 5 no Brasil (Levi et al, 2002; Campioto et al, 2005).

1.3 Formas de transmissão

A hepatite C é considerada uma doença transmitida principalmente pelo sangue e seus derivados, sendo o principal agente etiológico das hepatites pós transfusionais do mundo (Alter et al, 1989; Esteban et al, 1990; Minola et al, 2002). O risco de transmissão da hepatite C transfusional diminuiu com a introdução de testes sorológicos de triagem em bancos de sangue (Torres et al, 2001; Operskalski et al; 2003). No entanto, outros fatores contribuem para a transmissão do HCV transfusional. Na Itália, antes da introdução do teste de detecção do anti-HCV entre os doadores de sangue mais de 10% dos transfundidos nos anos 80 apresentaram evidências clínicas de hepatite pós-transfusional (Minola et al, 2002).

A doença crônica, com poucas manifestações clínicas, ocorre em 80% dos indivíduos. Conseqüentemente, a hepatite C é frequentemente diagnosticada quando o indivíduo se submete aos testes de triagem sorológica em bancos de sangue e o estágio crônico da doença envolve quadros graves de lesão hepática em mais de 20% dos pacientes (Lauer & Walker, 2001).

Atualmente, sabe-se que o HCV é transmissível por diversos meios. Contudo, a grande maioria das infecções ocorre por via parenteral, fundamentalmente por exposição a transfusões de sangue e hemoderivados, uso de drogas intravenosas, realização de tatuagens e exposições percutâneas (Oliveira et al, 1999). Dessa forma, o HCV é o

principal agente etiológico das hepatites pós transfusionais no mundo (Alter et al, 1989; Esteban et al, 1990). É demonstrada a presença de anticorpos anti-HCV em 60 a 80% dos hemofílicos, em 50 a 70% dos usuários de drogas endovenosas, em 7,4 a 51,2% de pacientes em diálise e em 21% dos pacientes talassêmicos politransfundidos (Jaiswal et al, 2001; Naghettini et al, 1997; Hahn et al, 2001) o que demonstra o grande potencial do sangue de transmitir a hepatite C (Zuckerman 1989; Yoshida et al, 1992). Sabe-se ainda que o vírus está presente em baixos títulos na maioria das pessoas infectadas (Bradley & Maynard, 1986), o que dificulta o diagnóstico e a triagem sorológica de doadores de sangue.

A transmissão vertical pode ocorrer tanto de forma intra-uterina como por via perinatal. Alguns autores têm relatado que o risco de infecção é maior no caso de uma criança nascida por parto vaginal que em cesarianas (Gonçales JR et al, 2000). Contudo, nem todos os estudos demonstram esta ligação entre o parto vaginal e a transmissão perinatal do HCV. Níveis de viremia elevados, especialmente acima de um milhão de cópias por mililitro, aumentam o risco de transmissão vertical. O mesmo foi observado com mães co-infectadas com HIV e HCV, na qual 18% das crianças desenvolvem a infecção pelo HCV, enquanto somente 4,5% das crianças nascidas de mães infectadas apenas pelo HCV desenvolvem a doença (Gonçales JR et al, 2000).

Uma parcela dos pacientes adquire o vírus de maneira não identificada, chamada de forma “esporádica”. Situações cotidianas e habituais já foram relatadas, como a partilha de lâmina de barbear, recentemente descrita na Índia (Paraná, et al., 1999). Outras formas de transmissão correspondem ao uso de seringas e agulhas contaminadas (Hahn et al, 2001) e transplante de órgãos e tecidos (Pereira et al, 1991; Morales 1999).

O trabalho publicado por Tegan e colaboradores em 2001, avaliou a população de doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/ Hospital das Clínicas FMUSP e consagrou o número de 11,76% de pacientes e seus cônjuges com história atual e pregressa de hepatite C e sugere que esta prevalência pode estar relacionada com a transmissão sexual. Este estudo nos dá uma idéia de prevalência de casais infectados em nosso meio (Tegan et al, 2001).

Cavalheiro NP 2004 cita que o compartilhamento de utensílios de higiene pessoal pode ser um grande fator de risco para transmissão entre casais, estes como: lâminas de barbear, escovas de dente, cortadores de unhas e alicates de manicure. Em tese publicada a autora menciona que entre alguns casais estudados pelo menos um deles tem o cuidado de não compartilhar seus utensílios para evitar riscos de transmissão, não necessariamente o par assume a mesma postura (Cavalheiro, 2004).

1.4 História natural e Características clínicas

A Hepatite C aguda é assintomática e raramente fulminante, levando na maioria das vezes a infecção crônica. Estima-se que a hepatite C seja a causa mais comum de doença hepática, cirrose e câncer de fígado no mundo (Hajjar et al 1999; Akkaya et al, 2007). O período de incubação varia de duas a 26 semanas, com a média entre seis e 12 semanas (Heller & Rehermann, 2005).

A infecção pelo vírus C é autolimitada em cerca de 15% a 20% dos casos e a recuperação completa é caracterizada pelo desaparecimento do RNA viral no plasma e pela normalização dos níveis das enzimas hepáticas (Di Bisceglie, 1998; Heller; Rehermann, 2005).

Caracteristicamente, o paciente com hepatite C apresenta uma doença aguda clinicamente silenciosa, raramente sintomática, estimando-se que em torno de 5 a 10% manifeste icterícia e solicitem auxílio médico. Após esta fase, a evolução para cronicidade ocorre em quase 80% dos casos, progredindo de forma também silenciosa, por um período de 15 a 25 anos. Após esse período, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem doença hepática mais grave, geralmente apresentando sintomas de insuficiência hepatocelular ou hipertensão portal. Uma minoria, 5 a 10% dos pacientes com evolução crônica desenvolvem cirrose hepática em período inferior a 10 anos. Esse número chega a 30% quando o período de evolução é superior a 25 anos. O carcinoma hepatocelular é uma complicação tardia, com incidência de 3 a 5% ao ano, em indivíduos cirróticos. Nesta infecção viral, o carcinoma instala-se sobre a cirrose hepática, visto que, diferente do vírus da hepatite B, o vírus C não é um carcinógeno direto (Paraná, 1999).

A infecção crônica costuma apresentar-se de forma oligossintomática, com manifestações clínicas inespecíficas como fadiga muscular, artralgia, perda de peso, letargia, mialgias, febre baixa, náuseas, vômitos, dor ou desconforto no quadrante superior do abdômen (Conte, 2000).

Têm-se observado ainda uma associação entre diversas doenças auto-imunes e a infecção pelo HCV, porém o mecanismo etiopatogênico ainda não foi elucidado. Assim, a hepatite auto-imune, Síndrome de Sjögren, Síndrome Sicca, Liquen planus, porfiria cutânea tarda, tireoidite de Hashimoto, crioglobulinemia mista, glomerulonefrites e miosites podem estar relacionadas à infecção viral (Petit et al, 2001; Paraná et al, 1999).

Um aspecto clínico bastante característico do HCV é representado pelas elevações episódicas nas transaminases séricas, com períodos interpostos de normalidade (Rossini, et al, 1995). Dessa forma, os níveis de transaminases associam-se mais frequentemente com outras situações, como obesidade, alcoolismo, hipotireoidismo e diabetes mellitus (Gonçalves JR et al, 1999).

Já foram descritas elevações transitórias nos níveis das transaminases em 11,9% dos pacientes com hepatite C, e essas elevações foram associadas com o aumento da carga viral, na maioria dos casos, mas ocasionalmente houve associação com alteração no genótipo viral, sugerindo reinfecção. Porém, nos pacientes, considerados individualmente, o valor preditivo dessa associação foi baixo, enquanto muitos deles com enzimas normais apresentavam graves alterações histológicas (Di Bisceglie, 1998).

A persistência do vírus e as manifestações clínicas distintas estão correlacionadas com as características imunológicas do hospedeiro e com a evolução genética do vírus, isto é, com o tipo de variante viral responsável pela infecção (Orland et al, 2001; Barret et al, 2001).

O vírus da hepatite C não é facilmente debelado pelas defesas do hospedeiro, o que resulta em elevada probabilidade de cronificação da infecção, implicando altas taxas de morbimortalidade (Hajjar et al, 1999)

1.5 Resposta Imune ao Vírus da Hepatite C

Segundo a revisão de Neumann-Haefelin e colaboradores (2005) a resposta imune do hospedeiro é constituída pela imunidade inata através das barreiras físicas (ex. pele), componentes celulares (ex. granulócitos) e componentes solúveis (ex. fatores do complemento) e pela imunidade adaptativa composta da imunidade humoral (anticorpos) e a imunidade celular (linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺).

As células Natural Killer (NK) constituem a primeira linha de defesa contra patógenos e usualmente tornam-se ativados na fase inicial da infecção viral. O fígado é particularmente rico em células NK, que são ativados por vírus hepatotrópicos, como o HCV. 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 são importantes para limitar a replicação viral naquele órgão, ainda que também pudessem contribuir para o dano tecidual hepático durante a resposta imunológica (Ahmad et al, 2004). Embora saibamos que as células NK participam significativamente na resposta imune inata contra os patógenos hepáticos, esse papel ainda não foi totalmente elucidado (Freemann et al, 2001).

A resposta imune celular através de célula T cumpre papel central na patogênese da infecção pelo vírus C. A resposta por célula T às proteínas do HCV na fase aguda da hepatite C é um determinante crítico no final da evolução da doença (Thimme et al, 2002).

Estudos sugerem que a resposta Th0/Th1 por linfócitos T CD4⁺ contra a fração NS3 do vírus e possivelmente a outras proteínas não estruturais do HCV (NS4 e NS5) contribuem para o sucesso do "clearance" viral. No entanto, a resposta de células mononucleares contra o cerne do vírus é mais comum em pacientes que evoluem para a forma crônica da hepatite C (Diepolder et al, 1995).

Acredita-se que o "clearance" viral está associado a uma forte resposta intrahepática multiespecífica de linfócitos TCD8⁺ contra o vírus, enquanto que a persistência viral tem sido associada a uma fraca e limitada resposta destes linfócitos (Thimme et al, 2002). O "clearance" espontâneo do HCV está diretamente associado a uma ampla ação do sistema imune celular, em contraste, estão as infecções crônicas, que estão associados a uma baixa frequência de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico (Cox et al, 2005).

O papel do envolvimento de linfócitos T CD8⁺ é também de grande importância no entendimento da patogênese do HCV. Foi demonstrado que uma resposta positiva e multiespecífica por células T CD8⁺ durante os seis primeiros meses após a infecção está associada com a erradicação da infecção e este tipo de resposta é importante para o controle da doença. Sabe-se também que a presença de T CD4⁺ é um pré-requisito para a uma resposta de T CD8⁺ eficiente (Gruner et al, 2000).

Ainda não se conseguiu estabelecer qual a amplitude e o mecanismo da resposta inicial do sistema imune frente ao reconhecimento do antígeno HCV, que faz com que o curso da infecção siga em direção a cronicidade e não a cura. Os anticorpos anti-HCV podem ser detectados no sangue periférico do indivíduo infectado após 1 mês de infecção. (Cox et al, 2005).

As citocinas são muito importantes na resposta imune contra as infecções, como o TNF- α e IFN- γ . Essas citocinas possuem particular importância, pois elas participam desde a ativação celular até a migração celular para o local da infecção viral. O IFN- γ tem um efeito antiviral semelhante ao TNF- α , mas o IFN- γ participa da liberação e ativação das células T. As citocinas TNF- α e IFN- γ contribuem muito para a patogênese da infecção das hepatites, pois estão envolvidas diretamente no curso da infecção (Esquivel et al, 2002).

Durante a infecção pelo HCV, a frequência de células TCD8+ efectoras de memória periférica produzem IFN- γ correlacionado com a alteração de ALT e inflamação hepática. Em nível de fígado, os linfócitos produzem principalmente IFN- γ , IL-4, TNF- α , IL-8, e IL-18 (Esquivel et al,2002).

O HCV caracteriza-se por apresentar múltiplas mutações, burlando o sistema imunológico e dificultando a elaboração de vacinas e protocolos terapêuticos eficientes para o controle da infecção. Desta forma o entendimento dos processos imunes envolvidos na resposta contra o HCV é parte importante na análise do diagnóstico clínico e laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Caracterizar o perfil da resposta imunológica humoral e celular em doadores com sorologia positiva para hepatite C.

2.2 Específicos:

1. Avaliar o perfil sorológico do doador nos testes de triagem (ELISA) com o perfil de anticorpos específicos contra frações do HCV no teste Immunoblot.
 2. Estudar o perfil imunológico, analisando as sub-populações celulares frente a expressão de marcadores de superfície celular : LTCD3/CD4⁺, LTCD3/CD8⁺, CD69⁺.
 3. Analisar o perfil bioquímico das transaminases (ALT /AST) na população de infectados.
-

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo do estudo

Foi realizado um estudo descritivo observacional, transversal, com delineamento tipo detecção de casos, para a caracterização e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados com o vírus da hepatite C.

3.2 Características da área de estudo

O Estado do Amazonas localizado na região norte do Brasil em uma superfície de 1.577.820 km² tendo uma população registrada no ano de 2004 de 3.100.136 habitantes, onde 1.767.375 (57,1 %) residem na Capital do Estado - Manaus (IBGE, 2004).

A Fundação de Hematologia e hemoterapia do Amazonas – HEMOAM é responsável pela cobertura de 100% do sangue coletado em toda a rede pública do Estado do Amazonas tendo unidades de coleta e transfusão (UCTs) descentralizadas em 49 municípios do Estado. Os doadores que comparecem ao hemocentro são cadastrados e neste momento são registradas as suas características pessoais como nome completo, filiação, endereço residencial, local de trabalho e data de nascimento. Após esta identificação, o doador é encaminhado para aferir o seu hematócrito, pulso, peso corporal, estatura e pressão arterial. Em seguida, é submetido a uma triagem clínica, através de uma entrevista que busca avaliar suas condições físicas, estado de saúde e risco potencial de infecções transmissíveis pelo sangue. Os testes de triagem sorológica são realizados no hemocentro coordenador em Manaus (HEMOAM) que, além dos procedimentos anteriormente descritos, realiza como ensaios de rotina sorológica dois

testes de detecção de anticorpos contra o HIV-1 e HIV-2, um teste para detecção de anticorpos contra HCV, HTLV I/II, Doença de Chagas e Sífilis. Além de detecção de marcadores para HBV: HBsAg e anti-HBc e em todos os doadores do interior do estado reativos para anti-HBc é também realizado o teste anti-HBs. As amostras seguem um fluxo de envio e os resultados da triagem são enviados as Unidades do interior. Em Manaus, todos os processos do ciclo do sangue, desde o cadastro, triagem e coleta dos doadores, fracionamento, triagem sorológica, testes imunohematológicos, rotulagem, estoque, controle de qualidade, compatibilidade e distribuição do sangue são realizados. De rotina, em Manaus, e em todas as unidades do Interior os doadores com sorologia positiva são atendidos por médicos ou profissionais de saúde que prestam orientações, solicitam repetição dos exames de triagem, propõem o tratamento ou o encaminhamento do paciente para centros de referências.

3.3 População de estudo e casuística

Para este estudo foram selecionados doadores de sangue de ambos os sexos (obrigatoriamente acima de 18 anos, pois é um critério para a doação de sangue), da capital, cadastrados nas unidades de coleta de sangue de Manaus e que tiveram sorologia positiva nos testes de triagem sorológica para anti-HCV. Para a análise da resposta imune dos indivíduos infectados com o vírus da Hepatite C, 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, apresentarem resultado negativo para o parâmetro. Considerando que a co-infecção certamente influencia na resposta imunológica do indivíduo, é relevante a realização de estudos posteriores que possam avaliar a resposta imunológica de indivíduos co-

infectados em comparação com o grupo de indivíduos infectados somente com Hepatite C. Portanto, as amostras positivas para HCV e que apresentaram co-infecção para qualquer uma das patologias apresentadas acima, foram também separadas e armazenadas para estudo posterior de prevalência de co-infecção e perfil da resposta imunológica de pacientes com hepatite C confirmada e co-infecção com outras doenças transmissíveis pelo sangue. Todas as amostras foram armazenadas em freezer – 70°C do laboratório de sorologia do HEMOAM. Todas as considerações legais preconizadas pelas resoluções CNS 196/96 e 347/2005 para autorização do armazenamento de amostras biológicas para estudos posteriores foram realizadas.

Estudos desenvolvidos pelo HEMOAM nos anos de 2002 a 2004, demonstraram que a prevalência de casos anti-HCV positivos entre os doadores de sangue de Manaus foi de 0,32%, o que representa uma média de 160 doadores ao ano (Torres et al, 2004).

Assim, no presente trabalho, avaliamos 100 casos, durante um ano e seis meses, quando coletamos as amostras que foram armazenadas e/ou utilizadas durante todo o desenvolvimento do projeto e para análises posteriores conforme mencionado anteriormente.

Os indivíduos enquadrados nos critérios de inclusão, ou seja, aqueles que apresentaram positividade somente para HCV, foram chamados como de rotina para o atendimento feito por um profissional de saúde capacitado, visando orientações ao doador, coleta de nova amostra para a repetição do teste, como citado anteriormente. Neste momento, um membro da equipe da pesquisa esteve presente convidando o doador a participar voluntariamente do estudo após a apresentação dos objetivos e métodos do mesmo, sendo nesse momento assinado o Termo de Consentimento livre e esclarecido

(anexo A). Sendo utilizada então, uma abordagem epidemiológica com os indivíduos envolvidos, através de um questionário específico do estudo (anexo B), em local individualizado. No momento da entrevista o participante recebeu um informativo com esclarecimentos a respeito da Hepatite C com o objetivo de fornecer informações para atender as dúvidas mais comuns dos mesmos (Anexo C). Conforme o fluxo da rotina dos serviços de hemoterapia, o doador foi encaminhado para a coleta de nova amostra, do qual 20 mL de sangue total foram destinados para este estudo e encaminhados ao laboratório de sorologia do HEMOAM. Neste momento, foram coletados também amostras de sangue para a realização da citometria de fluxo, hemograma e dosagem de transaminases.

Foram realizados testes de triagem (ELISA) e confirmatório (Imunoblot) conforme discutido abaixo, os pacientes com diagnóstico confirmado da infecção pelo vírus da hepatite C foram encaminhados para tratamento e acompanhamento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas em Manaus.

3.4 Testes laboratoriais

3.4.1 Teste de triagem: O teste ELISA em microplaca se baseia na detecção de anticorpos anti-HCV utilizando-se microplacas revestidas com antígenos altamente purificados que contêm seqüências das regiões do Core, NS3, NS4 e NS5 do HCV.

O teste é realizado em equipamento automatizado (Genesis -Tecan/Abbott) e feito de rotina no laboratório de sorologia do HEMOAM, de acordo com as especificações do fabricante e baseia-se no adição de 180 µL de diluente da amostra (tampão contendo proteínas de origem bovina e suína, contendo Bronidox ® a 0,05% e azida

sódica a 0,1% como conservante), em seguida 20 µL de amostra e controles, a placa é coberta com tampa e incubada por 1 hora a 37°C, ao término deste período lava-se a placa utilizando cinco ciclos de lavagem usando solução de lavagem (solução de lavagem glicina/borato 20 vezes concentrada e como conservante Bronidox ® a 0,2%) diluída – 1:20. Após a lavagem adicionou-se 100 µL do conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo contra IgG humana liofilizado, marcado com peroxidase de rábano em uma base de proteína bovina) em cada poço, cobriu-se as cavidades com a tampa e incubou-se por mais 30 minutos a 37°C, ao final do período lava-se novamente as placas, adicionou-se 100 µL da solução de substrato (citrato trissódico, peróxido de hidrogênio, 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina -TMB- e estabilizantes) para o desenvolvimento da cor, cobriu-se com a tampa e incubou-se por mais 30 minutos a 37°C. Em seguida adicionou-se 50 µL de solução de parada de reação (ácido sulfúrico 0,5M), realizando a leitura em seguida em espectrofotômetro a 450 nm .

Como critério de segurança, o banco de sangue HEMOAM adota uma margem de segurança no valor de 10% tanto inferior quanto superior ao ponto de corte (Cut Off) , denominada como zona cinza, ou zona indeterminada, onde as amostras são retestadas, e permanecendo o mesmo perfil de densidade óptica (DO), o resultado é considerado como indeterminado, sendo necessário uma nova amostra para a conclusão diagnóstica.

3.4.2 Imunoblot – Teste Complementar:

O teste complementar Immunoblot foi realizado nas amostras de doadores reativos nos teste ELISA, este se baseia na detecção de anticorpos anti-HCV contra antígenos recombinantes representativos do Core e das regiões NS3, NS4 e NS5 do HCV.

O teste é realizado em equipamento automatizado (Profblot – Tecan/Abbott) no laboratório de sorologia do HEMOAM, de acordo com as especificações do fabricante. Tiras individuais de Immunoblot foram transferidas para tubos de análise, adicionou 1 mL de diluente de amostra (solução fisiológica tamponada com fosfato [PBS] com estabilizadores de proteína bovina e detergentes), adicionou-se 20 µl da amostra, colocou-se a tampa e inverteu-se para misturar, colocou-se os tubos no oscilador, oscilando 16-20 ciclos/minuto por 4 horas à temperatura ambiente (15 a 30°C). Após completar o tempo, aspirou todo o líquido e acrescentou-se mais 1 mL do diluente da amostra e colocou-se para oscilar por mais 30 minutos a temperatura ambiente e aspirou-se o líquido novamente. Adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem (solução detergente com tampão de fosfato contendo timerol como conservante) e desprezou-se o líquido e as tiras no recipiente de lavagem contendo 10 mL de tampão de lavagem mexendo as tiras no recipiente de lavagem, em seguida adicionou-se mais 30 mL de tampão de lavagem e decantou-se o tampão, ficando as tiras retidas no recipiente de lavagem (repete-se este procedimento de lavagem duas vezes). Após a lavagem foi adicionado 1 mL de conjugado (peroxidase) por tira em cada recipiente de lavagem, girou-se o recipiente de lavagem num agitador rotativo a 110 ± 5 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Após completar a incubação do conjugado, o mesmo foi decantado e lavou-se as tiras com 30 mL de tampão de lavagem (processo repetido por duas vezes), decantando o tampão. Adicionou-se 1 mL de substrato, girando o recipiente de lavagem num agitador rotativo a 110 ± 5 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. O substrato foi decantado e lavou-se as tiras, adicionando-se 60 mL de água destilada. Decantou-se a água e este passo foi repetido duas vezes. Usando pinças retirou-se as tiras e transferiu-se para papel absorvente para eliminar o excesso de água, deixando as tiras secar por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. A interpretação das tiras foi feita antes de 3 horas do

termino do teste. Estes testes foram realizados no laboratório de Sorologia da Fundação HEMOAM em Manaus.

3.4.3 Testes Bioquímicos:

3.4.3.1 Aspartato aminotransferase (AST)

A análise baseou-se em reações enzimáticas onde a AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. O reagente de uso é colocado em contato com a amostra e incubado por 1 minuto. A redução da absorbância em 340 ou 365 nm, conseqüente à oxidação da NADH, foi monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da AST na amostra. Os ensaios foram realizados com kit da ABBOT Clinical chemistry em equipamento automatizado (Alcyon 300 – Abbott).

3.4.3.2 Alanina aminotranspeptidase (ALT)

A análise baseou-se em reações enzimáticas, a ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a

coenzima NADH é oxidada à NAD. O reagente de uso é colocado em contato com a amostra e incubado por 1 minuto. A redução da absorbância em 340 ou 365 nm, conseqüente à oxidação da NADH, foi monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra. Os ensaios foram realizados com kit da ABBOT Clinical chemistry em equipamento automatizado (Alcyon 300 – Abbott).

3.4.4 Análise da expressão de moléculas de superfície através da Citometria de Fluxo – FACs:

Amostra de 50 µL de sangue venoso coletada com EDTA foram incubadas com anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os marcadores de superfície celulares avaliados: anti-CD8 (code MHCD0801, lote 08090506, marca CALTAG) e anti-CD69 (code MHCD6901, lote 04120906, marca CALTAG) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) , anti-CD4 (code MHCD0404, lote 23031206, marca CALTAG) marcados com ficoeritrina (PE) e anti-CD3 (code MHCD0306, lote 60010708, marca CALTAG) marcado com terceira cor, foram colocados no fundo dos tubos. Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2 mL de Solução de lise. Em seguida lavadas com 2mL de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas por sete minutos, a 1300 rotações por minuto. Posteriormente desprezou-se o sobrenadante por inversão e adicionou-se 300 µL de PBS a 1% de formaldeído. A leitura foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo do HEMOAM, no citômetro de fluxo FACScalibur com sistema de detecção de quatro cores (Becton Dickinson).

A identificação das populações celulares de interesse foi realizada utilizando-se o programa Cell-Quest. Primeiro identificou-se a população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, utilizando gráficos “dot plot” onde a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho (FSC) e granulidade (SSC), (FIG. 1A). Após a seleção da região de interesse, analisou-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células marcadas nesta região, através de histograma de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (FIG. 1B). Após a definição das regiões, o percentual de células positivas foi determinado utilizando-se de um histograma simples de análise da região. Os ensaios foram feitos no laboratório de marcadores celulares da Fundação HEMOAM.

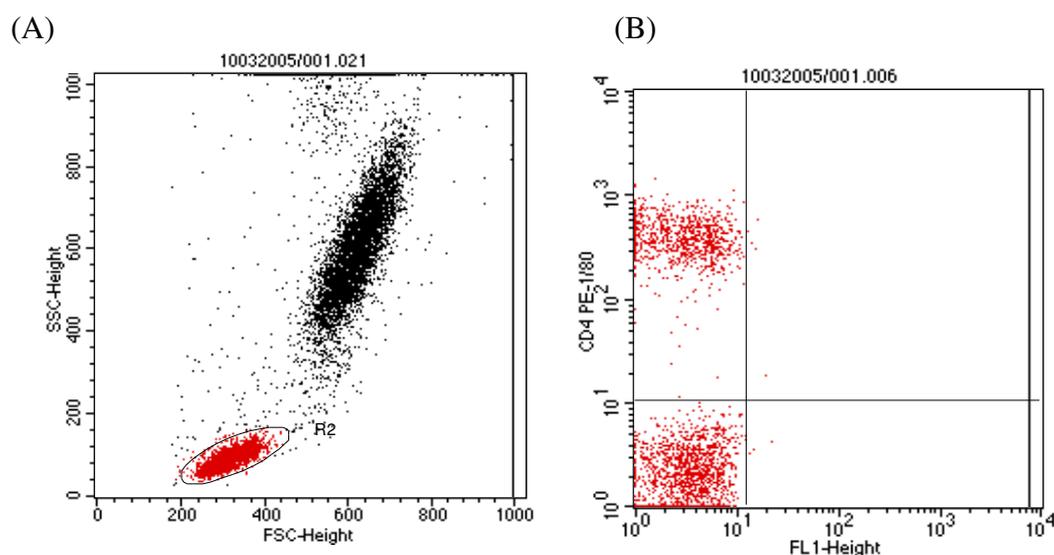


Figura 01: Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráficos Dot plot FSC x SSC são utilizados para seleção da população linfocitária – R2. (B) Histograma; FL1 x FL2 são utilizados para avaliar parâmetros de interesse em populações celulares específicas.

3.4.5 Financiamento e Avaliação do Comitê de Ética

O presente trabalho possui aprovação do comitê de ética em pesquisa da fundação HEMOAM, aprovado 21/03/2005 (anexo D).

Dissertação financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) através do processo nº1252/04 no valor de R\$ 25.000,00 reais.

4. RESULTADOS:

No período de setembro de 2005 a novembro de 2006, foram aptos à doação de sangue 37.118 doadores, dos quais 0,56%(n=207) apresentaram reatividade o teste de triagem sorológica para HCV com amostra de doação, sendo estes convocados pela HEMOAM para coleta de nova amostra para confirmação diagnóstica . Convidamos a participar do estudo doadores que confirmaram reatividade no teste ELISA com nova amostra, somente para o teste sorológico HCV, totalizando 100 indivíduos. No momento em que retornaram para coleta de nova amostra, foram convidados a participar do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo C). Na tabela 01 consta a distribuição por gênero em relação à média de idade dos 100 pacientes HCV positivos que aceitaram participar do estudo. Observamos que 64% (n=64) eram homens com idade média de $34,8 \pm 10,5$ (anos) e 35% (n=35) eram mulheres com idade média $35 \pm 8,28$; não mostrando diferença estatística significativa.

Tabela 01 - Distribuição dos doadores anti-HCV positivos por sexo em relação à média de idade.

Sexo	Número	%	Média±DP	Mediana
Masculino	65	65	$34,8 \pm 10,50^*$	32
Feminino	35	35	$35,00 \pm 8,28^*$	33

* Teste t de student ; p=0,6533

4.1 Relação DO/CUT OFF (densidade óptica e ponto de corte) para teste ELISA

Anti-HCV.

As amostras foram testadas pelo método ELISA obtendo os valores da densidade óptica (DO) e ponto de corte (Cut off). A análise demonstrou que 38% (n=38) dos pacientes tiveram relação DO/Cut off no teste ELISA para HCV menor ou igual a 1.

Enquanto que 25% (n=25) entre 1 e 2, 12% (n=12) entre 2 e 3 e 25% (n=25) dos pacientes apresentaram valores igual ou superior a 3, como mostra a tabela 2.

Tabela 02: Análise do percentual em relação a DO/Cut off do teste ELISA de pacientes reativos para o Vírus da hepatite C (HCV).

Relação DO/CUT OFF no Teste ELISA Anti-HCV				
Doadores HCV	≤ 1	$>1-2$	$>2-3$	≥ 3
reativos (%)	38%	25%	12%	25%
	(n=38)	(n=25)	(n=12)	(n=25)

4.2 Análise da distribuição das bandas de proteínas no Immunoblot HCV RIBA 2.0.

Como de rotina do laboratório de sorologia, as amostras reativas e indeterminadas no teste ELISA são submetidas ao teste complementar Immunoblot. Todas as 100 amostras foram submetidas ao Immunoblot, destas 36,0% (n=36) foram reativas, 46,0% (n=46) indeterminadas e 18,0% (n=18) negativas. Através da figura 2 pode-se observar essa distribuição.

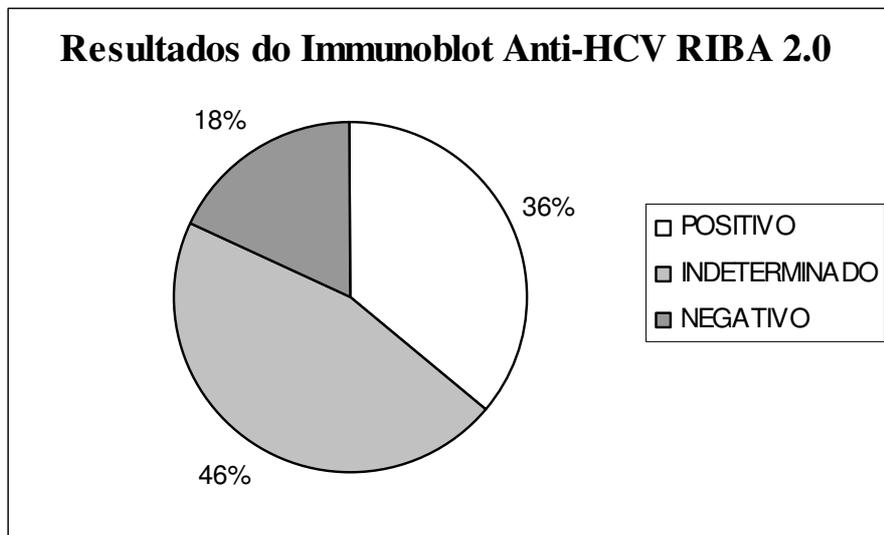


Figura 2: Percentual dos resultados obtidos de 100 amostras de doadores submetidas ao teste Immunoblot.

Ao analisarmos os resultados do Immunoblot com a razão DO/cutoff, observamos que 50% (n=18) das amostras reativas tinham razão DO/cutoff igual ou superior a 3 e 25% (n=9) inferior ou igual a 1, das amostras indeterminadas 41,3 (n=19) tiveram razão DO /cutoff inferior ou igual a 1 e 13% igual o superior a 3. Enquanto que as negativas tiveram 55,6% (n=10) razão do/cutoff inferior ou igual a 1. Podemos observar estes percentuais na tabela 3.

Tabela 3: Distribuição das razões de densidades ópticas (DO) por ponto de corte do teste ELISA (Cutoff) de acordo com os resultados de Immunoblot RIBA.

IMMUNOBLOT	Relação DO/CUT OFF no Teste ELISA Anti-HCV			
	≤1	>1-2	>2-3	≥ 3
Positivo	9 (25,0%)	4 (11,2%)	5 (13,8%)	18 (50,0%)
Indeterminado	19 (41,3%)	16 (34,8%)	5 (10,8%)	6 (13,0%)
Negativo	10 (55,6%)	5 (27,8%)	2 (11,1%)	1 (5,6%)

Como demonstrado na tabela 4, analisamos a distribuição das bandas de proteínas presentes no teste Immunoblot. Para a banda C33c observamos 97% de presença em amostras reativas e 52,0% em immunoblots indeterminados. Enquanto que as bandas C22(p) e NS5 estiveram presentes em 88,9% e 72,2% respectivamente nas amostras reativas. Enquanto que nas amostras indeterminadas observamos a presença das bandas C22c e NS5 em apenas 30,5% e 24,0% respectivamente.

Tabela 04: Percentual das bandas de proteínas do teste complementar Immunoblot dos doadores HCV⁺.

	Frequência de Bandas protéicas do teste complementar			
	Immunoblot.			
	C100 (NS4)	C33c (NS3)	C22(p) (core)	NS5
Reativos (n=36)	86% (N=31)	97% (N=35)	88,9% (N=32)	72,2% (N=26)
Indeterminados (n=46)	28,3% (N=13)	52% (N=24)	30,5% (N=14)	24% (N=11)

4.3 Análise bioquímica de Alanina Aminotransferase (ALT).

Para análise bioquímica dos níveis de alanina aminotransferase (ALT) foi feita uma comparação entre os doadores saudáveis (soronegativos) (n=100), que foram selecionados aleatoriamente e convidamos a participar como voluntários assinando o termo de consentimento livre e esclarecido, e HCV positivos (n=100) detectados na triagem sorológica, segregados em três grupos, os com resultados de Immunoblot não reativos (HCV⁺/BLOT NR – n=18), com resultados de immunoblot indeterminados (HCV⁺/ BLOT IND – n=46) e os com resultados de immunoblot reativos (HCV⁺/ BLOT R – n=36). Apesar das amostras de doadores com immunoblot reativo (HCV⁺/ BLOT R) apresentarem um discreto aumento de ALT em relação aos demais grupos, não observamos diferença estatística significativa entre os grupos estudados (p=0,1866). O método estatístico utilizado foi o teste de Kruskal-Wallis, figura 3 e tabela 5.

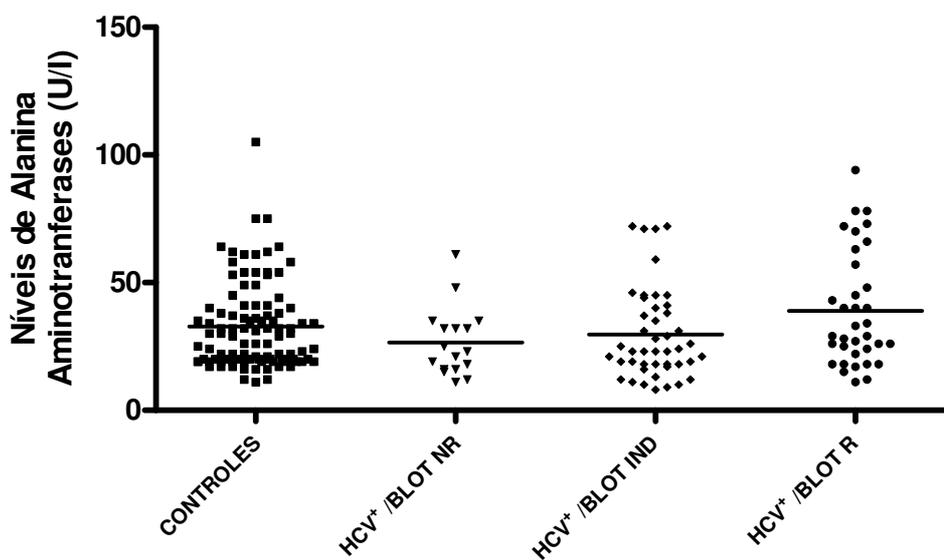


Figura 03: Comparação nos níveis de Alanina aminotransferase (ALT) em doadores saudáveis (soronegativos) (n= 100) e doadores reativos segregados por resultados de

Immunoblot (n=100 doadores), sendo n=36 Immunoblot positivo, n=46 com Immunoblot Indeterminado e n=18 com Immunoblot negativo. Não sendo observada diferença estatística significativa, com valor de $p=0,1866$.

Tabela 05: Análise estatística descritiva da comparação nos níveis de ALT, segregados por grupos de acordo com os resultados do Immunoblot.

Grupos	ALT	
	Média ± DP	Mediana
Soronegativos (controle)	32,80 ± 16,95	29,50
HCV+ / BLOT NR	26,53 ± 13,38	23,00
HCV+ / BLOT IND	29,69 ± 17,83	23,00
HCV+ / BLOT R	38,94 ± 22,44	29,00

Teste de Kruskal-Wallis $p=0,1866$

4.4 Análise bioquímica de Aspartato Aminotransferase (AST).

Assim como para o ALT, fizemos uma análise bioquímica dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) através de uma comparação entre os doadores saudáveis (soronegativos) (n=100), que foram selecionados aleatoriamente, e HCV positivos (n=100) detectados na triagem sorológica e segregados por resultados de Immunoblot como descrito para o ALT. Nossos dados demonstraram que houve diferença estatística significativa entre amostras controles e os grupos estudados. Os níveis de AST mostraram-se estatisticamente significantes aplicando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p<0,0001$), apresentando gradativo aumento, estando mais elevados nos doadores HCV⁺/BLOT R que nos demais grupos.

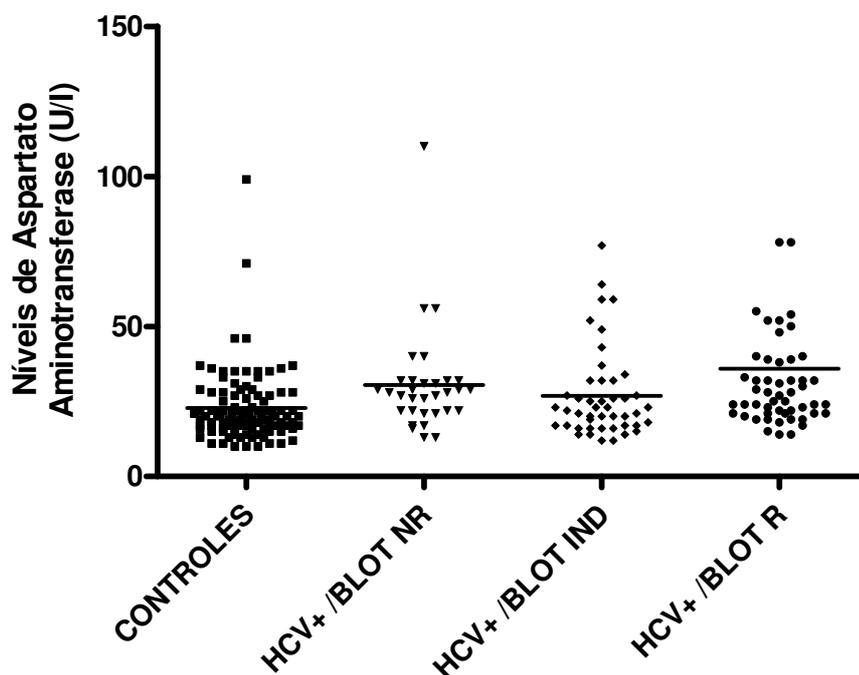


Figura 04: Comparação nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) em doadores saudáveis (soronegativos) (n= 100) e doadores reativos segregados por resultados de Immunoblot (n=100) (doadores) sendo n=36 Immunoblot positivo, n=46 com Immunoblot Indeterminado e n=18 com Immunoblot negativo (p<0,0001).

Tabela 06: Análise estatística descritiva da comparação nos níveis de AST, segregados por grupos de acordo com os resultados do Immunoblot, p<0,0001.

Aspartato Aminotransferase		
Grupos	Média ± DP	Mediana
Soronegativos (controles)	22,81 ± 12,00	20,00
HCV+ / BLOT NR	26,9 ± 22,03	28,00
HCV+ / BLOT IND	26,91 ± 14,91	22,50
HCV+ / BLOT R	30,50 ± 13,9	26,00

Teste de Kruskal-Wallis (p<0,0001)

4.5 Análise de populações e sub-populações de leucócitos em sangue periférico

Na figura 05 mostramos a análise do perfil celular (populações e sub-populações de leucócitos) através do hemograma obtido por método automatizado (PENTRA). Comparando o número de leucócitos totais entre os grupos, observamos uma diferença estatisticamente significativa, o grupo HCV⁺/BLOT R apresentou maior número de leucócitos que os HCV negativos, com valor de $p=0,0153$ (FIG 5 A). Ao compararmos o percentual de linfócitos observamos um menor percentual nos HCV⁺/BLOT R em relação aos HCV⁺/BLOT NR, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0030$) (FIG 5 B). As médias percentuais de monócitos (FIG 5 C) também demonstraram diferença estatística significativa quando analisado comparativamente entre os grupos ($p<0,0001$). As figuras 5 C e 5 D apresentam o percentual de neutrófilos e eosinófilos respectivamente, quando comparamos os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis observamos que não houve diferença estatística significativa ($p=0,9878$ e $p=0,0753$). As medianas estão representadas como linhas horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está na tabela 07.

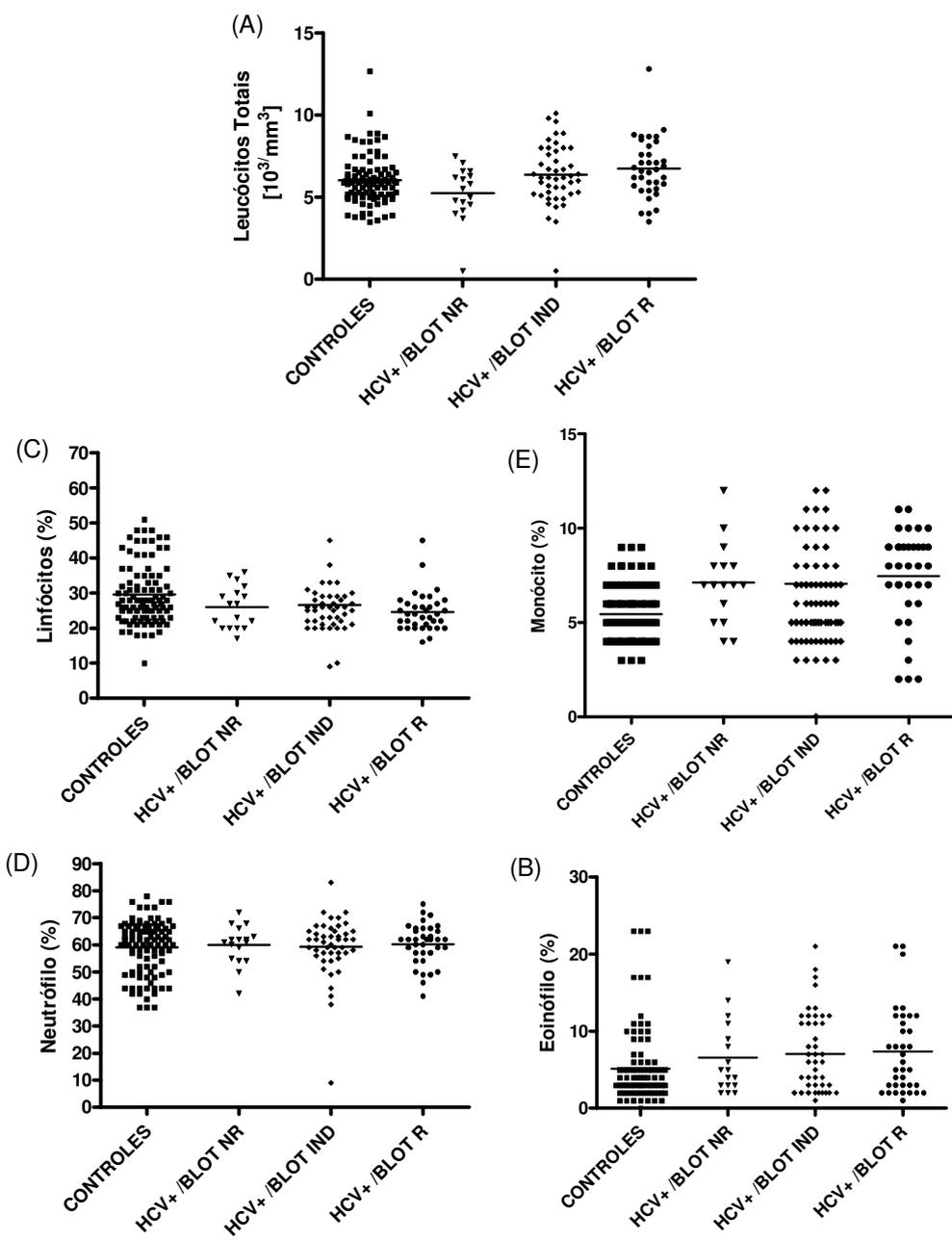


Figura 5: Percentual de leucócitos totais e sub-populações de células circulantes no sangue. dos doadores com sorologia negativa para o Vírus da hepatite C - soronegativos - (n=100) e com sorologia positiva com resultados de Immunoblot (n=100), sendo n=36 HCV⁺/ BLOT R, n=46 HCV⁺/ BLOT IND e n=18 HCV⁺/ BLOT NR. A população total de leucócitos e as sub-populações celulares (linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos) foram avaliados através do hemograma obtido por método automatizado (PENTRA).

Tabela 07: Análise estatística descritiva do percentual de leucócitos totais e sub-populações de células circulantes no sangue periférico de doadores HCV positivos.

Variáveis	Soronegativos		HCV ⁺ /BLOT NR		HCV ⁺ /BLOT IND		HCV ⁺ /BLOT R	
	Media ±DP	Mediana	Media± DP	Mediana	Media± DP	Mediana	Media± DP	Mediana
Leucócitos Totais	6,01± 1,61	5,9	5,24±1,65	5,5	6,37±1,81	6,2	6,75±1,81	6,65
Linfócitos	29,06±8,47	28,0	26,06±6,03	27,0	26,57±9,96	26,0	24,61±5,56	24,0
Monócitos	5,44±1,35	5,0	7,11±2,05	7,0	6,30±2,57	6,0	7,47±2,47	8,0
Neutrófilos	59,9±9,88	61,0	59,94±7,30	61,0	60,48±8,16	62,0	60,28±7,50	62,0
Eosinófilos	5,15±4,16	4,0	6,58±4,91	5,0	7,04±5,18	6,0	7,36±5,57	5,5

4.6 Análise das populações de linfócitos por Citometria de fluxo.

Na figura 6 demonstramos a análise da frequência de populações de linfócitos TCD3⁺/CD4⁺ (FIG 6 A) e LTCD3⁺/CD8⁺ (FIG 6 B), no sangue periférico de doadores com sorologia negativa para o vírus da hepatite C (n=100) em comparação com indivíduos com sorologia positiva (n=100) segregados em três grupos, os com resultados de Immunoblot não reativos (HCV⁺/BLOT NR – n=18), com resultados de immunoblot indeterminados (HCV⁺/ BLOT IND – n=46) e os com resultados de immunoblot reativos (HCV⁺/ BLOT R – n=36). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 marcados com fluorocromos distintos (terceira cor (TC), PE e FITC, respectivamente).

A Figura 6A mostra que os doadores positivos (HCV⁺/ BLOT R) apresentaram um percentual de linfócitos T CD4⁺ menor que o grupo soronegativo com declínio gradativo entre os grupos, a média destas células foi de 42,6±6,72 e 37,9±8,87, respectivamente. Quando comparamos os quatro grupos pelo teste Kruskal-Wallis encontramos uma

diferença estatística significativa ($p=0,005787$), para que possamos rejeitar a hipótese nula de que os grupos são iguais, sendo as amostras soronegativas diferentes das HCV⁺/BLOT R e HCV⁺/BLOT IND.

Ao analisarmos estatisticamente as médias percentuais de linfócitos T CD8⁺ nos grupos soronegativo ($21,5\pm 6,73$) e HCV⁺/BLOT R ($23,0\pm 8,31$), observamos que não houve diferença estatística significativa ($p= 0,7596$) entre os grupos (FIG 6 B).

Quando analisamos a razão TCD3⁺(TCD4⁺/TCD8⁺) observamos uma diferença estatística significativa entre as amostras soronegativas e as HCV⁺/BLOT R ($p=0,006864$) (FIG 6 C) As medianas estão mostradas como barras horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está representada na tabela 08.

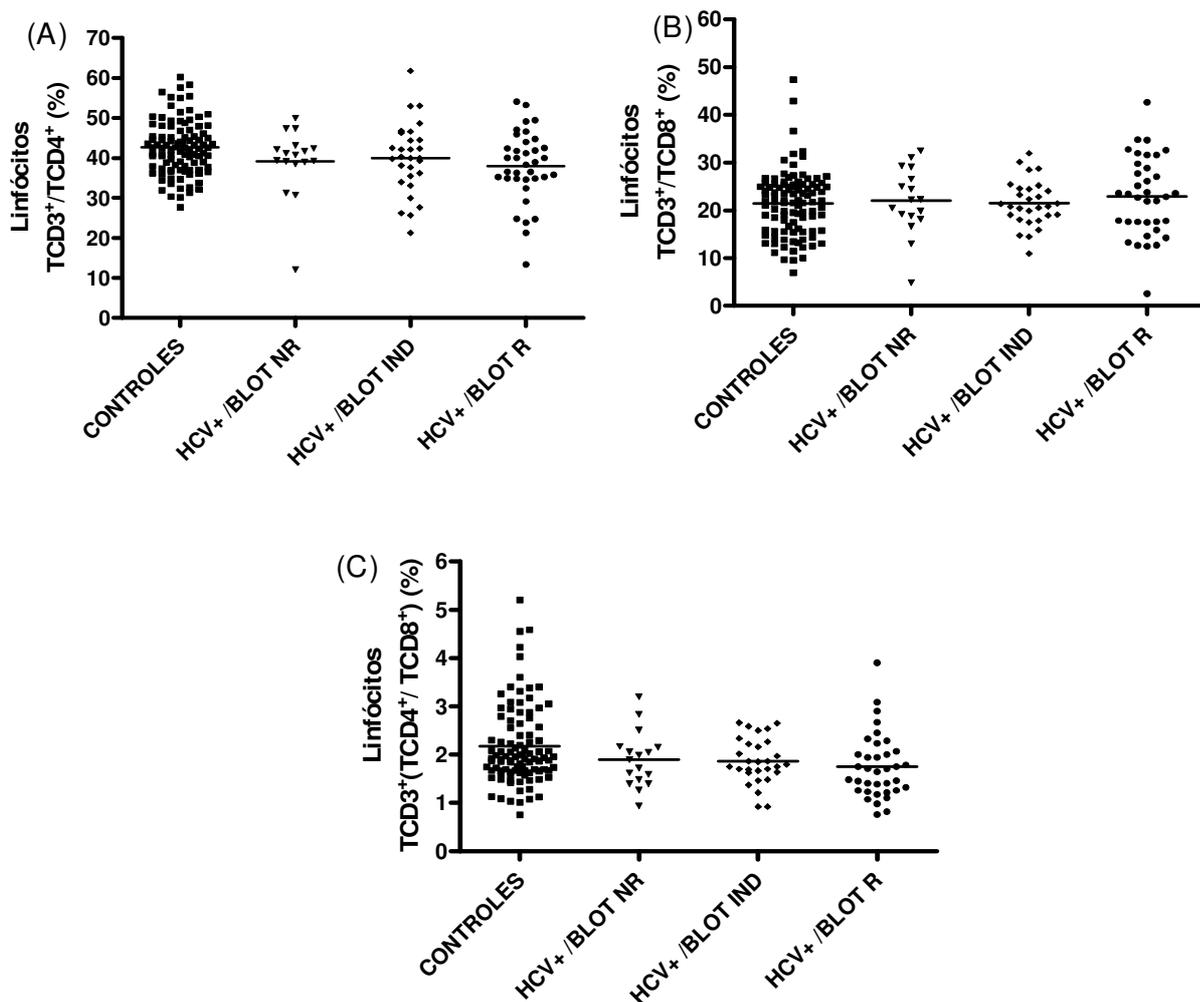


Figura 06: Percentual de Linfócitos TCD3⁺/CD4⁺ (A), Linfócitos TCD3⁺/CD8⁺ (B) e a razão entre Linfócitos TCD3⁺(TCD4⁺/TCD8⁺) (C) no sangue periférico dos doadores com sorologia negativa para o Vírus da hepatite C - soronegativos - (n=100) e com sorologia positiva com resultados de Immunoblot (n=100), sendo n=36 HCV⁺/ BLOT R, n=46 HCV⁺/ BLOT IND e n=18 HCV⁺/ BLOT NR. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 marcados com fluorocromos distintos (terceira cor, PE, FITC, respectivamente).

Tabela 08: Análise estatística descritiva do perfil celular de linfócitos por citometria de fluxo dos resultados dos doadores segregados por resultados de Imunoblot.

VARIÁVEIS	GRUPO							
	Soronegativos -controles		HCV+/ BLOT NR		HCV+/ BLOT IND		HCV+/ BLOT R	
	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	Mediana
LTCD3 ⁺ /CD4 ⁺	42,6 ± 6,72	42,6	39,1± 8,53	40,8	38,7±8,05	38,7	37,9 ± 8,87	38,6
LTCD3 ⁺ /CD8 ⁺	21,5 ± 6,73	21,9	22,0 ± 6,97	22,3	22,5 ± 6,45	21,4	23,0 ± 8,31	23,2
LTCD3 ⁺ (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	2,41 ± 2,16	1,95	1,90 ± 0,578	1,90	1,80 ± 0,539	1,77	1,75 ± 0,70	1,67

4.7 Análise da sub-população de leucócitos ativados por citometria de fluxo.

Na figura 7 demonstramos a análise das sub-populações de leucócitos no sangue periférico de doadores de sangue HCV positivos. Foram feitas análises de 100 doadores com sorologia negativa para o Vírus da hepatite C e 100 doadores com sorologia positiva para o HCV, segregados em três grupos, os com resultados de Imunoblot não reativos (HCV+/BLOT NR – n=18), com resultados de imunoblot indeterminados (HCV+/ BLOT IND – n=46) e os com resultados de imunoblot reativos (HCV+/ BLOT R – n=36). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD69, marcador de ativação celular marcado com FITC. Os percentuais de linfócitos e eosinófilos CD69⁺(FIG 7 A e 7 D) não demonstraram diferença estatística significativa entre os grupos analisados.

Os percentuais de monócitos e neutrófilos CD69⁺(ativados), apresentaram diferenças estatísticas significante com p<0,0001 e p=0,006923 (teste de Kruskal-Wallis) respectivamente. O grupo de soronegativos foi diferente dos demais grupos tanto nos

monócitos quanto no neutrófilos. As medianas estão representadas como linhas horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está na tabela 09.

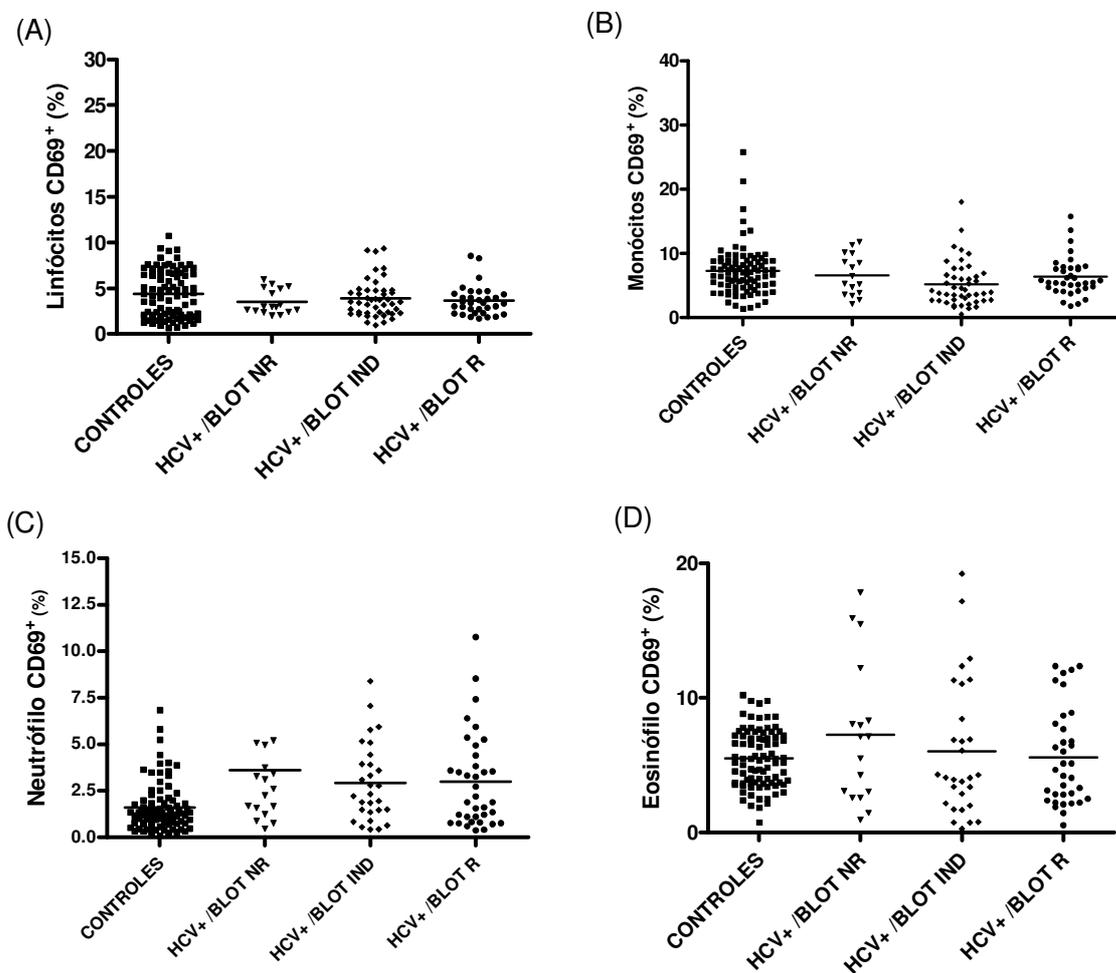


Figura 07: Percentual da sub-população de leucócitos - linfócitos CD69⁺ (A), monócitos CD69⁺ (B), eosinófilos CD69⁺ (C) e neutrófilos CD69⁺(D) no sangue periférico de doadores de sangue com sorologia negativa para o Vírus da hepatite C - controles - (n=100) e com sorologia positiva para o Vírus da Hepatite C segregados em grupos, os com resultados de Immunoblot não reativos (HCV+/BLOT NR – n=18), com resultados de immunoblot indeterminados (HCV+/ BLOT IND – n=46) e os com resultados de immunoblot reativos (HCV+/ BLOT R – n=36). As sub-populações de leucócitos foram identificadas utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD69 marcado com fluorocromo (FITC).

Tabela 09: Análise estatística descritiva do percentual de sub-populações de leucócitos .

VARIÁVEIS	GRUPOS							
	Soronegativos (controle)		HCV+/BLOT NR		HCV+/BLOT IND		HCV+/BLOT R	
	Media±DP	/Mediana	Media±DP	/Mediana	Media±DP	/Mediana	Media±DP	/Mediana
Linfócitos CD69⁺	4,405±2,55	4,87	3,54±1,33	2,95	3,89±2,05	3,52	5,05±5,22	3,47
Monócitos CD69⁺	10,20±11,22	7,48	7,44±4,54	6,49	5,18±3,48	4,08	6,39±3,02	5,63
NeutrófilosCD69⁺	1,48±1,11	1,23	3,62±4,34	2,62	3,62±3,26	2,33	2,99±2,52	2,05
Eosinófilos CD69⁺	7,72±7,52	5,49	7,76±4,60	7,12	5,57±4,06	4,06	5,61±3,54	4,65

4.8. Correlação entre a população de linfócitos T CD4⁺ com linfócitos T CD8⁺

Nossos dados demonstraram que ao correlacionarmos a população de linfócitos TCD4⁺ (eixo horizontal da figura) com a população de linfócitos T CD8⁺ (eixo vertical) utilizando a correlação de Pearson não houve de correlação entre estas células no grupo HCV positivo ($r=-0,0842$) (FIG 8).

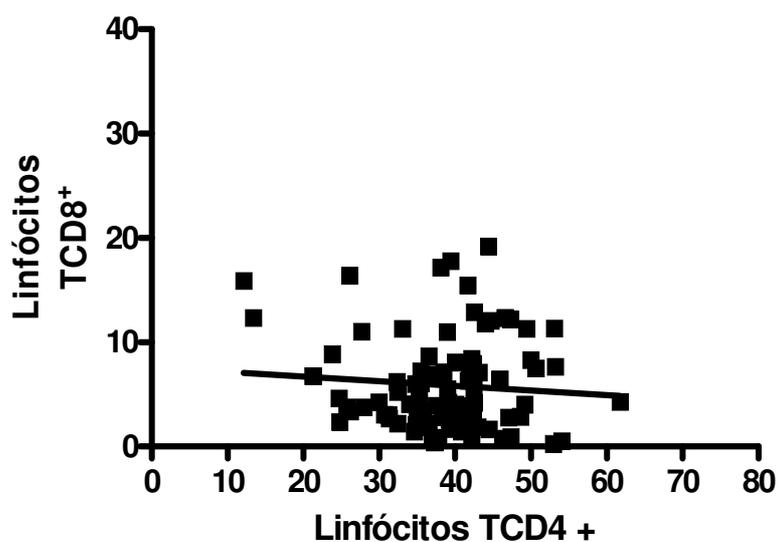


Figura 8: Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ nos doadores HCV positivos. Números de pares XY = 100, $r = -0,08442$, não houve correlação entre as populações estudadas.

4.9 Correlação das populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ com a expressão do marcador de ativação CD69⁺.

- **Linfócitos T CD4⁺**

Com o objetivo de determinarmos a ativação de leucócitos, analisamos a expressão do marcador de ativação celular CD69⁺. Nossos dados demonstraram que não houve correlação entre LTCD4⁺ e expressão de CD69⁺ nestas células (figura 9A). Da mesma forma não encontramos correlação da expressão LTCD8⁺ em relação aos CD69⁺ (figura 9 B).

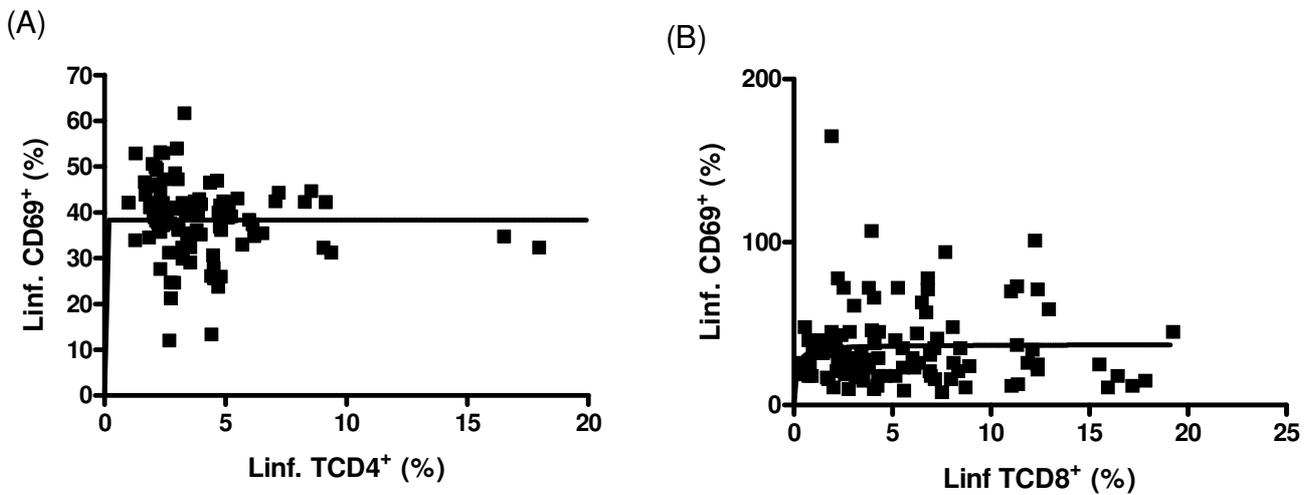


Figura 09: Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos CD4⁺ e CD69⁺ dos doadores HCV positivo, números de pares XY = 100, $r = -0,01478$ (A), populações de linfócitos CD8⁺ e linfócitos CD69⁺ dos doadores com sorologia positiva para HCV, $r=0,01124$ (B).

4.10 Análise das Correlações de ALT e AST com as populações de linfócitos:

Através da análise de correlação de Pearson correlacionamos os níveis de alanina aminotransferase (ALT) em relação à população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em doadores HCV positivos. Nossos dados não mostraram correlação entre os níveis de ALT e as populações celulares analisadas ($r=-0,08961$) (figura 9 A e B). Assim como para o ALT, não observamos correlação entre os dados analisados tanto para LTCD4⁺ como para LTCD8⁺, embora podemos observar uma tendência a uma correlação entre LTCD4⁺ e AST (FIG 10 C)

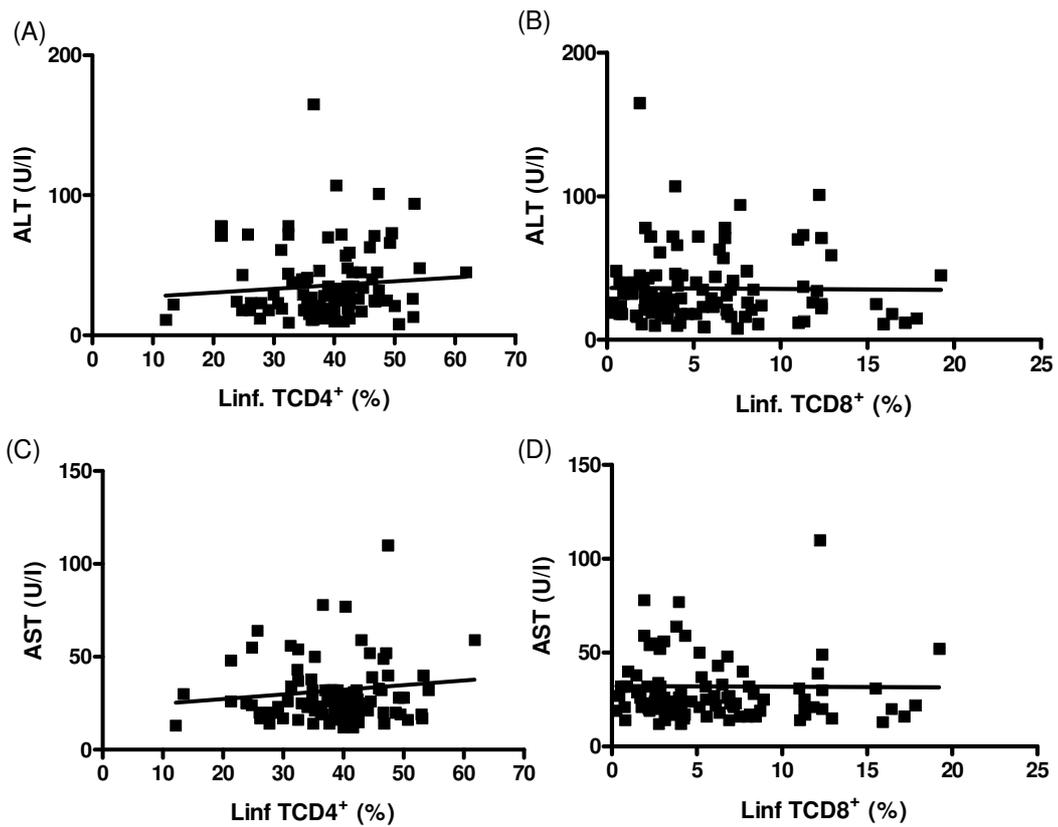


Figura 10: Correlação de Pearson entre os níveis de ALT e AST com as populações de linfócitos T CD4⁺ nos doadores HCV positivos. Números de pares XY = 100, $r = 0,08961$ (A). ALT e as populações de linfócitos T CD8⁺ nos doadores HCV positivo, números de pares XY = 100, $r = -0,01124$ (B). AST e as populações de linfócitos T CD4⁺ nos doadores HCV positivos, números de pares XY = 100, $r = 0,06636$ (C), AST e as populações de linfócitos T CD8⁺ nos doadores HCV positivo, números de pares XY = 100, $r = -0,006169$ (D).

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a hepatite C transformou-se em uma grande ameaça para a saúde pública em todo o mundo. Acredita-se que cerca de 170-200 milhões de pessoas estejam infectados pelo vírus da hepatite C no mundo, sendo que 9 milhões na Europa, cerca de 180.000 novos casos são descobertos por ano nos Estados Unidos e 350.000 no Japão (Gómez- Cordero & Álvarez-Garcia, 2003; Billerbeck et al, 2007).

Desde que se introduziu a triagem sorológica para hepatite C nos bancos de sangue, registrou-se uma redução drástica na transmissão do HCV. Uma vez que a infecção pelo HCV pode-se manter assintomática por anos (Billerbeck et al, 2007).

No Brasil, a introdução de triagem para o anti-HCV nos bancos de sangue, instituída pelo Ministério da Saúde, pela Portaria n° 1376 de 19 de novembro de 1993, trouxe perspectivas no sentido de se reduzir a transmissão do HCV por transfusão através de um melhor controle dos doadores de sangue.

Após comercialização de testes para detecção de anticorpos anti-HCV, muitos estudos foram realizados para determinar a prevalência da infecção na população em geral, sendo a maioria deles realizados em doadores de sangue voluntários.

O teste sorológico para diagnóstico da Hepatite C rotineiramente utilizado desde o início dos anos 90, é um teste imunoenzimático (ELISA), para detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV), que adquiriu maior sensibilidade e especificidade ao passar de testes de primeira para segunda e terceira gerações (ELISA II ou III) (Strauss, 2001, Gómez- Cordero & Álvarez-Garcia, 2003).

Outro teste utilizado para confirmar a presença de anticorpos e que podem detectar, quantificar ou caracterizar os componentes de partículas virais do HCV é o teste immunoblot, e ainda existem testes que podem avaliar a presença de RNA viral, através do RT PCR (Laperche et al, 2005).

No presente estudo, tivemos como objetivo traçar um perfil de resposta imune humoral e celular, em doadores de sangue HCV⁺ assintomáticos, que foram identificados a partir da triagem sorológica no HEMOAM. Dentre a população estudada 65% eram do sexo masculino entre 24 e 44 anos e 35% mulheres entre 27 e 43 anos. Os dados obtidos estão em concordância com os relatados por Paltanin & Reiche 2002, que estudaram a soroprevalência em doadores de sangue no Brasil (Paltanin & Reiche, 2002).

O teste ELISA se baseia na relação de densidade ótica (DO) e o ponto de corte (cut off) que determina se o indivíduo é soropositivo. A análise da DO/Cut off em nosso estudo mostrou que 38% dos doadores HCV positivos apresentaram valores inferiores a 1, demonstrando uma baixa reatividade para o HCV, 25% entre um e dois ($\geq 1-2$), 12% entre dois e três ($\geq 2-3$) e 25% maior ou igual a três (≥ 3). Sendo nossa população de estudo os doadores de sangue, persiste um grande percentual de resultados inconclusivos, com razão DO/cutoff baixos e immunoblots indeterminados. Como observamos em nossos dados, dos immunoblots indeterminados 41,3% se mantem com DO baixa (<1), mas uma grande porporção apresentou relação DO/cut off superior a 2. Dentre estes 13% apresentaram valores superiores a 3. Fato este que nos chamou a atenção uma vez que esses indivíduos podem apresentar-se no período de janela imunológica e futuramente soroconverterem para HCV positivo.

Doadores que apresentaram resultados fracamente reagentes no teste ELISA, apresentam alta concordância com resultado negativo no imunoblot, e amostras que apresentaram resultados fortemente reagentes no teste ELISA apresentaram alta concordância com o resultado positivo no imunoblot. Sendo que as amostras com imunoblot indeterminado tiveram seu maior percentual concentrado entre as amostras fracamente positivas (76%), com razão DO/cutoff inferior a 2.

A avaliação da presença de anticorpos contra as frações das proteínas do HCV, através do Imunoblot (CHIRON RIBA 3.0 HCV), também foi de interesse neste estudo. Nossos resultados demonstraram 86% de positividade para a fração c100 (NS4) com resultados de Imunoblot positivos e 28,3% nos indeterminados; 97% para C33c (NS3) para os positivos e 52% para os indeterminados; 88,9% para C22(p) (core) dos positivos e 30,5% dos indeterminados; 72,2% para a fração NS5 nos positivos e 24% nos indeterminados. Gonçalves et al, em 2000, demonstraram que 100% dos casos estudados, com resultado de imunoblot indeterminado, apresentando apenas a banda do core C22, tiveram resultados de RT-nested PCR positivos. Sugerindo que a presença de anticorpos contra pelo menos a proteína C22 pode ser indicativo de soroconversão.

De acordo com a literatura encontrada uma das formas de se avaliar a evolução da hepatite C é através da dosagem das transaminases, tais como alanina aminotransferases (ALT) e aspartato aminotransferases (AST) (Olut et al 2005; Gouveia et al, 2004), dessa forma procedemos a coleta de amostras para essa dosagens bioquímicas. Para compararmos, analisamos o mesmo número de doadores soronegativos coletados aleatoriamente no hemocentro, sendo os mesmo soronegativos a pelo menos um ano, ou seja, doadores saudáveis com no mínimo 3 doações anteriores sem alterações sorológicas. Como podemos observar na figura 03 não houve diferença estatisticamente

significativa entre os níveis de ALT entre os grupos, apesar de que observamos que a média dos valores obtidos foi maior no HCV⁺/BLOT R que nos demais grupos. Alguns trabalhos indicam a alta relevância da utilização da dosagem de ALT para o acompanhamento da evolução clínica da doença (Gómez-Cordero & Alvarez-Garcia, 2003). Por outro lado, observamos uma diferença significativa entre os valores encontrados de AST entre os soronegativos e os demais grupos. Este fato nos sugere que os níveis de ALT e AST podem variar durante as diferentes fases da infecção pelo HCV, desde o indivíduo assintomático até a evolução com alterações hepáticas.

Shiffman e colaboradores em 2006 observaram que pacientes com hepatite C crônica sem tratamento apresentam valores normais de ALT ou discretamente elevados. Portanto, vários estudos recentes têm questionado os valores de normalidade do ALT padronizadas desde 1950 (Prati et al, 2002). Diante deste questionamento, Akkaya e seus colaboradores (2007) acreditam que os valores padronizados de normalidade do ALT deve ser revisado. Em estudo recente Akkaya demonstrou que 25% (n=36) de seus pacientes com hepatite C crônica e carga viral elevada apresentavam valores de ALT normal. Sendo que pacientes com longo tempo de infecção, têm grandes chances de apresentarem cirrose hepática, e neste momento os valores de ALT encontram-se bastante elevados (Butt et al, 2007).

Akkaya e colaboradores (2007) concluíram que a infecção crônica pelo HCV é clinicamente latente e lesões hepáticas ocorrem sem qualquer elevação de ALT. Apesar da discreta elevação nos níveis de ALT nos doadores HCV⁺/BLOT R, não obtivemos relevâncias estatísticas.

A infecção causada pelo vírus C é determinada pela interação entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro e esta representa um importante papel no controle da infecção. À medida que a infecção viral progride, essas respostas imunes específicas são ativadas, com o aparecimento de linfócitos T helper (LTCD4⁺), anticorpos secretados por linfócitos B (LB) e a expansão de clones de linfócitos T citotóxicos (LTCD8⁺) (Kaplan et al, 2007).

Linfócitos TCD4⁺ reconhecem antígenos apresentados através de moléculas MHC de classe II presentes nas APCs (células apresentadoras de antígenos) e células TCD8⁺ em MHC classe I. Subseqüentemente, linfócitos TCD4⁺ desempenham múltiplas funções efetoras, incluindo ativação direta de macrófagos e linfócitos B antígenos específicos, assim como ativação de linfócitos TCD8⁺ dependente de citocinas (Neumann-Haefelin et al, 2005) e estas células têm efeito direto na eliminação de células infectadas através de mecanismos citolíticos e não citolíticos (Kaplan et al, 2007).

Através da análise por citometria de fluxo, fenotipamos as subpopulações de linfócitos T, através de marcadores específicos para as moléculas CD4/CD8 e CD3. Analisando os grupos observamos que houve diminuição no percentual de linfócitos TCD3⁺/CD4⁺ em sangue periférico dos doadores HCV⁺/BLOT R, em comparação com os grupos controle (indivíduos saudáveis) e HCV⁺/BLOT IND e HCV⁺/BLOT NR. Este fato nos sugere que a infecção pelo HCV, mesmo nestes indivíduos considerados assintomáticos está induzindo uma resposta imune celular, com aumento da população de LTCD8⁺ que é crucial para o “clearance” viral, observado em 20 a 28% dos pacientes infectados. Por outro lado, a queda nos valores de LTCD4⁺, poderia estar ocorrendo justamente devido a diminuição da razão entre os dois, como também foi observado em nossos resultados (FIG 6 C)

Quando avaliamos o percentual de $LTCD3^+/CD8^+$, observamos que não houve diferença estatística significante entre os grupos, sendo os soronegativos diferentes dos $HCV^+/BLOT R$, apresentando valores aumentados na população de $HCV^+/BLOT R$, em relação aos demais grupos comparados.

Alguns autores têm demonstrado que na fase aguda da infecção, os linfócitos $TCD8^+$ passam por três fases: uma intensa proliferação mediada por linfócitos $TCD4^+$ através da liberação de citocinas, seguida de uma diminuição também mediada por citocinas e por fim uma produção de células $TCD8^+$ efetoras e de memória, caso o indivíduo tenha alcançado o “clearance” viral. Para que um indivíduo possa ter uma resposta eficiente pelo $LTCD8^+$, é crucial que ele tenha tido uma eficiente resposta pelo $LTCD4^+$, pois são eles que determinam à completa maturação dos $LTCD8^+$ (Urbani et al, 2006).

Thimme e colaboradores, 2002, demonstraram em estudo que pacientes com hepatite C crônica apresentaram baixos níveis de $LTCD8^+$ no sangue periférico e altos níveis no fígado, estando estas células em intensa atividade no fígado. Em nosso trabalho, não podemos inferir o tempo de infecção em que os doadores se encontravam. Para determinarmos este tempo seria necessário um estudo mais aprofundado de soroconversão.

Uma forte resposta por células $CD4^+$ Th1 e aumento de $TCD8^+$ específica está associada com o “clearance” viral e resolução da doença (Rosen et al, 2002), observamos em nossa população de estudo uma resposta de $LTCD8^+$ aumentada, o que nos confirma estar ocorrendo uma resposta imune contra o vírus HCV, que pode evoluir tanto para a eliminação do vírus quanto para forma crônica da doença.

Ao realizarmos a correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺ com linfócitos T CD8⁺ não observamos correlações destas populações celulares no grupo de doadores HCV⁺/ BLOT R. Ao avaliarmos estatisticamente este marcador de superfície entre os linfócitos, verificamos que não houve correlação em relação ao LTCD4⁺ e ao LTCD8⁺.

Um mecanismo pelo qual se pode avaliar a resposta imune específica é através de um marcador de ativação celular CD69, uma molécula transmembrana tipo II, pertencente a família das lecitinas dependentes de cálcio (Tran et al, 1997). Quando analisamos a expressão desta proteína nas diferentes populações de leucócitos, observamos que houve relevância estatística entre todas as células estudadas entre os quatro grupos analisados. Quando analisamos a expressão desta proteína nas diferentes populações de leucócitos, observamos que não houve relevância estatística entre linfócitos e eosinófilos entre os grupos estudados.

Por outro lado, ao analisarmos a expressão de CD69⁺ na superfície de neutrófilos e monócitos, observamos aumento significativo da expressão desta molécula nestas populações celulares. O aumento da expressão desta proteína na superfície desta célula é concomitante ao aumento do percentual das mesmas observadas pelo hemograma. Dados estes que sugerem mais uma vez que os indivíduos infectados pelo HCV, mesmo considerados assintomáticos estão desenvolvendo uma resposta imune, que parece estar polarizada para uma resposta celular com aumento de LTCD8⁺. No entanto, se estes indivíduos irão apresentar resolução da infecção, com “clearance” viral ou se irão se manter assintomáticos e cronificar, levando a evolução clínica, ainda se mantém indefinido. Vários fatores ainda deveriam ser analisados, como carga viral e perfil de citocinas para apresentarmos resultados mais conclusivos.

6. CONCLUSÕES

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

1. Dentre os resultados do teste de triagem ELISA, o perfil DO/Cut off apresentado indicou um percentual de 38% menor que 1, isso significa que a maior parte destes indivíduos apresentavam-se dentro da faixa de zona cinza, teoricamente considerada negativa pelo fabricante do teste.
 2. Os resultados de imunoblot indicaram que 46% dos resultados foram indeterminados, o que implica na necessidade da implantação de testes moleculares com pesquisa de RNA viral na rotina sorológica dos bancos de sangue, para que se possa determinar a real prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C.
 3. Dentre os resultados indeterminados (HCV⁺/BLOT IND) 41,3% tiveram razão DO/Cut off inferior a 1, o que nos leva a não considerar tais indivíduos com negativos no teste ELISA, uma vez que valores inferiores ao cut off são considerados como negativos pelos fabricante dos kits. Como bancos de sangue, utilizamos uma margem de zona cinza de 10%, o que nos levou a identificação dessa população de doadores indeterminado.
 4. Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) não demonstraram ser um bom marcador para análise do curso da infecção nos doadores infectados com HCV, apesar de discretamente elevados, não apresentaram relevância estatística, ao contrário dos níveis de aspartato aminotransferase, que mostraram-se significantes frente à infecção pelo HCV.
 5. Observamos um percentual mais baixo de TCD3⁺/TCD4⁺ nos HCV⁺/BLOT R que nos demais grupos, o que indica uma baixa expressão deste marcador, com significância estatística, ao contrario do TCD3⁺/TCD8⁺, que apesar de não apresentar
-

significância estatística, apresentou valores aumentados na população HCV⁺/BLOT R, indicando que estes doadores estão apresentando uma resposta imune citotóxica.

6. Não observamos diferença na população de linfócitos T ativados e eosinófilos (CD69⁺) entre os grupos estudados, porém neutrófilos e monócitos estavam aumentados nos doadores HCV⁺/ BLOT R.

7. Podemos concluir que, se estes indivíduos irão apresentar resolução da infecção, com “clearance” viral ou se irão se manter assintomáticos e cronificar, levando a evolução clínica, ainda se mantém indefinido. Vários fatores ainda deveriam ser analisados, como carga viral e perfil de citocinas para apresentarmos resultados mais conclusivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.743-759, 2004.

AKKAYA, O; KIYICI, M; YILMAZ, Y; ULUKAYA, E; YERCI, O. **Clinical significance of activity ALT enzyme in patients with hepatitis C virus.** World J Gastroenterol 2007, v13(41): p5481-5485.

ALTER, H.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWCZYNSKI, K. *et al.* **Clinical outcome and risk factors associated with hepatitis C in the United states.** Hepatology, 1989. v.10, p.581.

BARRET, S.; KIERAN, N.; RYAN, E. *et al.* **Intrahepatic hepatitis C viral RNA status of serum polymerase chain reaction – negative individuals with histological changes on liver biopsy.** Hepatology, 2001. v. 33(6), p.1496-1502.

BASSIT, L. *et al.* **Chronic hepatitis C virus infections in brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy.** Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo, v. 41, n. 3, p. 183-189, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n° 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria no721/GH, de 09 de agosto de 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. **Diário Oficial.** Brasília, n° 229, 2 dez. 1993. Seção 1.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC n° 343 de 13 de dezembro de 2002. Substitui a portaria n° 1.376, retirando obrigatoriedade de realizar os teste Chagas Hemaglutinação e dosagem de ALT para triagem de doadores de sangue. **Diário Oficial.** Brasília, n° 245, 19 dez. 2002. Seção 1.

BRASIL. Organização Mundial de Saúde (OMS). **Hepatites** – Situações da doença no Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/area.cfm?id_area=630>
Acesso em: 24 mar. 2007

BILLERBECK, E; BÖTTLER T; THIMME, R; **Regulatory Tcells in viral hepatitis.** World J Gastroenterol 2007, v13(36): 4858-4864.

BRADLEY, D.W. & MAYNARD, J.E. **Etiology and natural history of post-transfusional enterically transmitted non-A, non-B hepatitis.** Semin. Liver Dis, 1986. V.6, p.56-66.

BRAUN, P.W.; MEIER, V.; SAILE, K.N.; MIHM, S.; RAIMADORI, G. **Treatment of genotype 2 and 3 chronic hepatitis C virus-infected patients.** World J Gastroenterol 2005;11(39): 6188-6192.

BUTT, A.A; TSEVAT, J; AHMAD, J; SHAKIL, AO; MRUS, JM. **Biochemical and virologic parameters in patients co-infected with hepatitis C and HIV versus patients with hepatitis C mono-infection.** Am J Med Sci 2007; v333; p271-275.

CAVALHEIRO, N.P. **Análise dos sorotipos do HCV identificados em pacientes da cidade de São Paulo, através do método imunoenzimático.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2000, v. (42) 1:8, p.25-30.

CAMPIOTO, 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, I.C.; ROSA, H.; LACET, C.M.C.; BERNARDINI, A.P. **Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil.** Braz. J. of Medical and Biol. Research, 2005, v. 38, p.41-49.

CARMO, R. A. et al. **Hepatitis C vírus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study.** Braz. J. Med Biol. Res, v. 35, n. 5 p. 589-598, 2002.

CAVALHEIRO, NP. **Hepatite C: Transmissão entre casais.** Tese (doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP) 2004.

CHAN, S.W.; MOCOMISH, F.; HOLMES, E.C. *et al.* **Analysis of a new hepatitis c virus and its phylogenetic relationship to existing variants.** *J. gen. virol.*, 1992. v.73, p.1131-41.

CHOO, Q. L. *et al.* **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.** *Science*, v.244, p. 359-362, 1989.

CONTE, V.P. Hepatite Crônica por vírus C. *Arq Gastroenterol*, v37 n°03, 2000.

CORNIER, E.G., TSAMIS, F., KAJUMO, F., DURSO, R.J., GARDNER, J.P., DRAGIC T. **CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus.** *PNAS*, 2004, v.101 n°19, 20p-7270-7274.

COX, A.L., MOSBRUGER, T., LAUER, G.M., PARDOLL, D. THOMAS, D.L. RAY, S.C. **Comprehensive Analyses of CD8+ T Cell Responses During Longitudinal Study of Acute Human Hepatitis C.** *Hepatology*, vol42, n°01, 2005.

DI BISCEGLIE, A. M., **Hepatitis C.** *Lancet* 1998; 351:351-5.

DIEPOLDER, H. M.; ZACHOVAL, R.; HOFFMANN, R. M. *et al.* **Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection.** *Lancet*, 1995. v.346(14), p.1006-07.

ESQUIVEL, C.A., ELEWAUT, A., PHILIPPÉ, J., ELEWAUT, A.E., DESOMBERE, I., MAERTENS, G., ROELS, G.L. **Evolution of hepatitis C virus-specific T cell responses and cytokine production in chronic hepatitis C patients treated with high doses of interferon- α .** *Revista de Investigación Clínica* 2002. v.54 n°01 p-41-50.

ESTEBAN, J.I.; GONZALES, A.; HERNANDES, J.M. *et al.* **Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a contemporary study of transfusion-associated hepatitis.** *N. Engl. J. Med.*, 1990. v.323, p.1107-12.

FOCACCIA, R.; DA CONCEIÇÃO, O.J.; SETTE Jr., H. *et al.* **Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured**

by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. Braz. J. Infect. Dis., 1998, v. 2, p.269-284.

FREEMANN, A. J., et al. **Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection.** Immunology and Cell Biology, v. 79, p. 515-536, 2001.

GERVAIS, A. **Quantitation of hepatic hepatitis C vírus RNA in patients with chronic hepatitis C. Relationship with severity of disease, viral genotype and response to treatment.** Journal of hepatology, 2001. v.35, p.399-405.

GÓMEZ-CORDERO, I. & ÁLVAREZ- GARCIA M. **Revisión: Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C.** Ver. Biomed 2003. v14, p253-268.

GONÇALES JR., F.L. **Prospective clinical and epidemiological evaluation of anti-HCV reagent blood donors candidates.** Rev. Soc. Bras. de Med. Trop, 1999. v.32(3), p.315-317.

GONÇALES JR., F.L.; STUCCHI, R.S.B; PAVAN, M.H.P. *et al.* **A clinical, epidemiological, laboratorial and ultrasonographical evaluation of anti-HCV EIA-2 positive blood donors.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2000. v. 42(3), p.147-152.

GONÇALES JR., F.L.; STUCCHI, R.S.B; PAVAN, M.H.P. *et al.* **Hepatitis C vírus in monozygotic twins.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 2000. v.42(3), p.163-165.

GONÇALES, N.S.L. **Hepatite C em doadores de sangue: Diagnóstico por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase e sua correlação com os testes imunoenzimáticos e “imunoblot”recombinante.** Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997.

GONÇALES, NSL; COSTA, FF; VASSALLO, J; GONÇALES JR, FL. **Diagnosis of hepatitis C vírus in brasilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: Comparison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2000, v42(5), p263-267.

GOUVEIA, E. C. et al. **Identificação de ponto de corte no nível sérico da alanina aminotransferase para rastreamento da hepatite C em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 37, p. 18-21, 2004.

GRÜNER, N. H., GERLACH, T. J., JUNG, M.C. *et al.* **Association of hepatitis C virus-Specific CD8⁺ T cell with Viral Clearance in Acute Hepatitis C.** The Journal of Infectious Disease, 2000. v.181, p.1528-36.

HAHN, J.A.; PAGE-SHAFFER, K.; LUM, P.J. *et al.* **Hepatitis C virus infection and needle exchange use among young injection drug users in San Francisco.** Hepatology, 2001. v.34(1) p.180-186.

HAIJAR, L.A., ROSA, T.T., VEIGA, J.P.R. **Manifestações extra-hepáticas da hepatite C.** Brasília Médica 1999; 36 (3/4): 96-105.

HAN JH, SHYMALA V, RICHMAN KH, BRAUER MJ, IRVINE B, URDEA MS, TEKAMP-OLSON P, KUO G, CHOO Q-L, HOUGHTON M. **Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end.** Proc Natl Acad Sci USA, 1991, v. 88:1711-15.

HELLER, T., REHERMANN, B. **Acute Hepatitis C: Multifaceted Disease.** Seminars in liver Disease, v25, nº01, 2005.

HOUGHTON, M. et al. **Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease.** Hepatology, v. 14, n. 2, p. 381-388, 1991.

JAISWAL, S.P.B.; CHITNIS, D.S.; JAIN, A.K. *et al.* **Prevalence of hepatitis C viruses among multi-transfused homogenous thalassaemia patients.** Hepatology Research, 2001. v.19, p. 247-253.

KAPLAN D E. et al. **Discordant Role of CD4 T-Cell Response Relative to Neutralizing Antibody and CD8 T-Cell Responses in Acute Hepatitis C.** Gastroenterology. v. 132, n. 2, p. 654–666, 2007.

KUO, G.; GHOO, Q.L.; ALTER, H.J., GITNIK, G.I., REDEKER, A.G., PURGEL, R.H., MIYAMURA, T.; DIENSTAG, J.L. **An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A, non B hepatitis.** Science, 1989, v. 244, p. 362-364.

LAPERCHE S. et al. **Simultaneous Detection of Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen and Anti-HCV Antibodies Improves the Early Detection of HCV Infection.** Journal of clinical microbiology. v. 43, n. 8, p. 3877–3883, Aug. 2005.

LAUER, G.M. & WALKER, B.D. **Hepatitis C virus infection.** New England Journal of Medicine, 2001, v.345, p.41-52.

LEVI, J. E. et al. **Three cases of infection with hepatitis virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients.** J. Clin. Microbiol, v. 40, n. 7, p. 2645-2647, 2002.

LYRA, A.C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A.M. **Molecular biology and clinical implantation of hepatitis C virus.** Braz J Med Biol Res, 2004. v37, p691-695.

MINOLA, E. et al. **Age at infection affects the long-term outcome of transfusion-associated chronic hepatitis C.** Blood, v. 99, n. 12, p. 4588-4591, 2002.

MORALES, J.M. **Hepatitis C virus Infection and Renal Transplantation.** Transplantation Proceedings, 1999, v. 31, p. 2221-2224.

NAGHETTINI, A.V.; DAHER, R.R.; MARTIN, R.M.B. *et al.* **Seroprevalência do vírus da hepatite C na população em diálise de Goiânia, GO.** Rev. Soc. Bras. de Med. Trop., 1997. v.30(2) p.113-117.

NEUMANN-HAEFELIN C. et al. **Review: T cell response in hepatitis C virus infection.** Journal of clinical Virology. v. 32, p. 75-85, 2005.

OLIVEIRA, M. L. A.; BASTOS, F.I.; TELLES, P. L. *et al.* **Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil.** Braz. Jour. Med. Biol. Res., 1999. v.32 p.1107-14.

OLIVEIRA, M.L.A.; BASTOS, F.I.; SABINO, R. R. *et al.* **Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil.** Braz. Jour. Med. Biol. Res., 1999. v.32 p.279-282.

OLUT, AI, OZSAKARYA, F, DILEK, M. **Seroprevalence of Hepatitis C Virus Infection and Evaluation of Serum Aminotransferase Levels among Haemodialysis Patients in Izmir, Turkey.** The Journal of International Medical Research. v. 33, p. 641 – 646, 2005.

OPERSKALSKI, E. A. ET AL. **HCV viral load anti-hcv-reactive donors and infectivity for their recipients.** Transfusion, 2003.v43, p. 1433-1441.

ORLAND, J. R.; WRIGHT, T. L. & COOPER, S. **Acute hepatitis C.** Hepatology, 2001. v.33(2) p.321-326.

PARANÁ, R.; LYRA, L.G. *et al.* **Hepatite crônica pelo vírus C.** Manual de Diagnóstico e tratamento das Doenças Hepáticas no paciente adulto e pediátrico, v.1 p.51-59.

PALTANIN, L.F. & REICHE, E. M. V. **Soroprevalência de anticorpos antivírus da epatite C em doadores de sangue, Brasil.** Rev. Saúde Pública 2002. v36(4); p393-401.

PEREIRA, B.J.G.; MILFORD, E.; KIRMAN, R.L. **Transmission of hepatitis C virus by organ transplantation.** N. Engl. J. Med., 1991, v.325, p.454-460.

PETIT, J.M.; BOUR, J.B; GALLAND-JOS, C. *et al.* **Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C.** Journal of Hepatology, 2001. v.35 p.279-283.

PINHO, J. R. R. *et al.* **Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil.** Braz. J. Med and biological res., v.38, n.1, p.41-49, 2005.

ROSEN, H. R., et al. **Frequencies of HCV-Specific Effector CD41 T Cells by Flow Cytometry: Correlation With Clinical Disease Stages.** Hepatology. v. 35, n. 1, p. 190-198, 2002.

PRATI, D; TAIOLI, E; ZANELLA, A. et al. **Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels.** Ann Intern Med 2002; v137; p1-10.

ROSSINI, A.; GAZZOLA, G.B.; RAVAGGI, A. *et al.* **Long-term follow-up of and infectivity in blood donors with hepatitis C antibodies and persistently normal alanine aminotransferase levels.** Transfusion, 1995. v.35, p.108-111.

SAÉZ-ALQUEZAR A.; BASSIT, L.; SABINO, E.C. **Hepatitis virais.** In: Ferreira A., Ávila, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001, p. 74-91.

SANTANA, G. O. et al. **Anticorpo contra o vírus C da hepatite em pacientes sob programa de hemodiálise em Salvador, BA, Brasil.** Arq Gastroenterol, v.38, n.1, p. 24-31, 2001.

SHIFFMAN, ML; DIAGO, M; TRAN, A; et al. **Cronic hepatitis C in patients with persistently normal alanine transferase levels.** Clin Gastroenterol Hepatol 2006; v4; p645-652.

SIMMONDS, P. et al. **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. AND 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, 1995, v. 76:1749-1761.

SOUTO, F.J.D., RIBEIRO, L.C., PERAZOLO, G.F., FORTES, H.M., SALDANHA, A.A. **Imunoblot como teste suplementar para detecção de anticorpos contra o vírus**

da hepatite C em doadores de sangue. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical, 35 (1): 69-71, 2002.

STRAUSS, E. **Artigo de opinião: Hepatite C.** Rev Soc Brás Med Tropical 2001. v34(1): p69-82.

SUZICH JA, TAMURA JK, PALMER-HILL F, WARRENER P, GRAOUKI A, RICE CM, FEINSTONE SM. **Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with related pestivirus and flavivirus enzymes.** J Virol, 1993, v. 67:6152-8.

TEDDER, R.S.; GILSON, R.J.; BRIGGS, M.; LOVEDAY, C.; CAMERON, C.H.; GARSON; KELLY, G.E.; WELLER, I.V. **Hepatitis C virus: evidence for sexual transmission.** BMJ, 1991, v. 1 (302), p. 1299-1302.

THIMME, R.; BUKH, J.; SPANGENBERG, H.C.; WIELAND, S.; PEMBERTON, J.; STEIGER, C.; GOVINDARAJAN, S.; PURCELL, R.H., CHISARI, F. V. **Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease** .PNAS, 2002, v.99 n°24, 15661-15668.

TORRES, K.L.; PAIVA, L.G.R.; SANTOS, L.N.; POINHO, M.; MORAIS, E.; ABRAHIM, C.M.M.; ALVES, L.R.P.; SILVA, U.G. **Hepatitis C: a review.** RevistaHUGV – Revista do Hospital Universitário Getúlio Vargas, 2003, v. 2 n. 1, p.59-68.

TRAN, A. et al. **Phenotyping of intrahepatic and peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis C.** Digestive diseases and Sciences. v. 42, n.12, p.2495-2500, 1997.

URBANI, S; AMADEI, B; FISICARO, P; TOLA, D; ORLANDINI, A; SACCHELLI, L; MORI, C; MISSALE, G; FERRARI, C. **Outcome of acute hepatitis c is relate to vírus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses.** Hepatology, v44, n1, p126-139, 2006.

VAN DOORN, L. J. **Molecular biology o the hepatitis C virus.** J. Med. Virol, v. 43, p. 345-356, 1994.

WENDEL S. Associação Brasileira de Bancos de Sangue, dados não publicados, 2000.

XAVIER, C.; NORONHA, A.B.; MACHADO, K. *et al.* **Os números da hepatite C.** RADIS, 2001. v.84, p.4.

ZUCKERMAN, A.J. **The elusive hepatitis C virus.** Br. Med. J., 1989. v.229, p.871-873.

YOSHIDA, C.F.T.; TAKAHASHI, C.; GASPAR, A.M.C. *et al.* **Hepatitis C virus in chronic Hemodialysis patients with non-A, non-B hepatitis.** Nephron, 1992. v.60, p.150-153.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados com o vírus da Hepatite C.

OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre os tipos do vírus da Hepatite C envolvidos na infecção de doadores de sangue do Estado do Amazonas e estudar a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra esta infecção.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 20 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus, a confirmação do diagnóstico da infecção e como o organismo está respondendo contra o vírus. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus e outros no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz em nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento e na prevenção da hepatite C.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito a hepatite C, podendo entrar em contato com as doutoras Kátia Torres e Adriana Malheiro (HEMOAM :Tel: 92-655-0100/ 92-656-0113). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do Hemoam.

VOLUNTARIEDADE: A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico), será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores. Neste caso, estão previstos estudos para avaliação de como o corpo se defende nos casos em que existe mais de um tipo de doença envolvida.

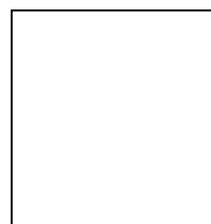
CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)

(Assinatura do pesquisador)

Manaus, ___/___/____



(Impressão dactiloscópica)

ANEXO B

QUESTIONÁRIO / EPIDEMIOLÓGICOS

Título do projeto: Avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas 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) Maternida Ana Braga (Manaus) Coleta

Externa (Manaus) Unidade Hemoterápicas do Interior

(especificar): _____

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 _____

Multiplos 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:** ___/___/___

- Utensílios domésticos: não compartilhar lâminas de barbear, escovas de dente e agulhas com outras pessoas. Quanto ao resto (talheres, pratos, toalhas, roupas), não há qualquer problema.
- Outros tratamentos: sempre informar, em qualquer tratamento que realizar, que é portador do vírus da hepatite C aos profissionais de saúde que atenderem você.
- Manter sempre o acompanhamento médico, para que sejam detectadas alterações durante a infecção e, quando necessário, o tratamento seja feito adequadamente.

Qualquer dúvida: consulte sempre o seu médico!

Mais informações:

HEMOAM – 3655 01000
Ramal 0130 : Dra. Christiane Usui
0113: Dra Adriana Malheiro
Dra Kátia Torres

Consultas – Retornos

Data	Horário
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____
__/__/__	_____

Hepatite C

O que é preciso saber?



HEMOAM

O que é Hepatite C?

O termo hepatite significa uma inflamação no fígado, podendo ter muitas causas (infecções, intoxicações pelo álcool, medicamentos etc). De todas as causas, a mais conhecida é a hepatite viral. Os vírus que atingem preferencialmente o fígado (hepatotrópicos) são denominados pelas letras do alfabeto: A, B, C, D, E, G). Portanto, a hepatite C é uma inflamação no fígado causada pelo vírus hepatotrópico C.

Como é transmitida a hepatite C?

- Transfusão de sangue total ou seus derivados
- Uso de agulhas e seringas contaminadas
- Acidente ocupacional
- Tanagens, *pirintingis* e acupuntura
- Relações sexuais sem preservativo
- Transmissão de mãe para filho
- Diálise

O que acontece após a infecção?

- Pode acontecer:
 - Mal-estar geral

- Perda do apetite

- Pele e olhos amarelados
- Coceira da pele

- Escurecimento da urina
- Febre

- Dor abdominal

- Vômitos repetidos

Muitas pessoas não apresentam nenhuma manifestação clínica. Contudo, continuam portadoras do vírus e podem transmiti-lo a outras pessoas.

A doença pode persistir por mais de 6 meses (crônica) e, em alguns casos, evoluir para formas graves (cirrose, insuficiência hepática, tumor maligno).

Constatada a infecção, o que fazer?

Procurar um médico, que fará os exames necessários e orientará o tratamento.

Quais são os exames laboratoriais realizados?

Para constatar a infecção, são realizados exames laboratoriais em amostras de sangue, que podem detectar anticorpos contra o vírus ou até mesmo

o material genético do vírus que causou infecção.

Existe vacina?

Ainda não existe vacina eficaz para o vírus devido à sua complexidade.

Como devo me comportar com a hepatite C

Dieta: geralmente, a alimentação continua normal, devendo ser saudável e balanceada. Em casos de doença grave, o sal, as proteínas e gorduras deverão ser mais controlados.

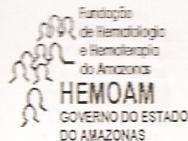
Bebidas: o álcool deve ser evitado, porque pode agravar a doença. Não existem restrições para outras bebidas (sucos, por exemplo). Em caso de dúvida, pergunte ao seu médico.

Fumo: não faz bem para ninguém.

Atividades físicas: quando não existem sintomas não há restrição para as atividades. Quando surgem cansaço, dores no corpo e em caso graves, o paciente deve ficar em repouso.

Relações sexuais: sempre com uso de preservativo.

ANEXO D



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP PARECER – CAAE-0003/2005

I. Identificação

Título: Caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores de sangue do Estado do Amazonas infectados pelo vírus da Hepatite C

Instituição: HEMOAM

Pesquisador responsável: Adriana Malheiro

Data de reapresentação ao CEP: 18.03.2005

Documentos Encaminhados: Carta de encaminhamento, Folha de Rosto, Projeto, TCLE, Questionário, Justificativa

Versão do Protocolo: 02/05

II. Objetivos

Geral: caracterizar os genótipos dos isolados do vírus da hepatite C encontrados entre os doadores de sangue do Estado do Amazonas; estudar a distribuição geográfica dos genótipos do vírus da hepatite C isolados de doadores de sangue do Estado do Amazonas; caracterizar o perfil da resposta imunológica, celular e humoral nos indivíduos infectados com HCV.

Específico: 1. Relacionar o perfil sorológico do doador nos testes de triagem (Elisa) com o perfil de anticorpos específicos contra frações do HCV no teste Imunoblot;

2. avaliar o grau de associação entre a sensibilidade e reprodutibilidade dos testes anti-HCV (Elisa) e Imunoblot com teste molecular;

3. avaliar a distribuição geográfica dos diferentes genótipos dos vírus da hepatite C encontrados dentro da população de doadores do Estado do Amazonas;

4. associar o genótipo viral encontrado com a resposta humoral, de acordo com os níveis de anticorpos quantificados através do teste Elisa (densidade DO/cut off) e Imunoblot (presença e intensidade das bandas);

5. relacionar os genótipos encontrados com o perfil da resposta imunológica celular, através de marcadores de superfície celular e dosagem de citocinas;

6. associar o genótipo viral encontrado com manifestações clínicas dos indivíduos portadores.

III. Sumário do projeto

Descrição e caracterização da amostra: serão incluídos 160 doadores de sangue da capital ou do interior do Estado do Amazonas, com sorologia positiva nos teste de triagem para anti-HCV.

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada – CEP 69002-50 – Manaus – Am
Fone: 92 6655-0113 Fax: 92 655-0112
E-mail: cep_hemoam@hotmail.com

colocado
21/03/2005
Adriana

Critérios de inclusão e exclusão: **Inclusão:** serão incluídos 160 doadores de sangue, ambos os sexos, acima de 18 anos, da capital ou do interior do Estado do Amazonas, com sorologia positiva nos teste de triagem para anti-HCV.

Exclusão: serão excluídos os doadores com sorologia positiva para os marcadores da hepatite B, HIV, HTLV, Doenças de Chagas, Sífilis e doadores que após a repetição do teste anti-HCV com nova amostra apresentarem resultado negativo.

Adequação da metodologia: será um estudo descritivo observacional, transversal, com delineamento tipo detecção de casos para caracterização e análise da distribuição dos diferentes genótipos virais e avaliação da resposta imune em doadores com sorologia positiva para HCV.

IV. Comentários do CEP:

Quanto as recomendações feitas no parecer anterior, com relação ao questionário que foram feitas as correções observadas, o TCLE ficou mais simples com linguagem acessível, as mesmas foram atendidas.

Quanto ao que se refere a divisão deste projeto, o comitê acatou a justificativa apresentada pela pesquisadora, que teve o cuidado de se inteirar sobre o assunto junto a CONEP.

V. Parecer do CEP:

Projeto Aprovado. Lembramos ao pesquisador que mesmo o CEP tendo aprovado este projeto, o mesmo somente poderá dar início após aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, por se tratar de projeto de Área Temática Especial do Grupo I, conforme resolução CNS 196/96.

VI. Data da Reunião: 18. 03.2005

VII. Data do parecer: 21.03.2005


JOSIANE NEVES
Secretária CEP/HEMOAM