



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



**HEPATITE C EM PACIENTES HEMOFÍLICOS: PERFIL
IMUNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES
GENÓTIPOS VIRAIS**

JOÃO PAULO DINIZ PIMENTEL

**MANAUS
2009**

P698h

PIMENTEL, João Paulo Diniz

Hepatite C em pacientes hemofílicos: perfil imunológico e caracterização dos diferentes genótipos virais/João Paulo Diniz Pimentel. Manaus - UFAM, 2009. 86p. ilustr.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical).
Programa de Pós Graduação em Patologia Tropical.

1. Hepatite. 2. Hemofilia. I. Título.

Orientadora: Dra.Adriana Malheiro

CDU:616.36-002: 616.151.5

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

JOÃO PAULO DINIZ PIMENTEL

**HEPATITE C EM PACIENTES HEMOFÍLICOS: PERFIL
IMUNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES
GENÓTIPOS VIRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “diagnóstico e controle”.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Malheiro

**MANAUS
2009**

JOÃO PAULO DINIZ PIMENTEL

**HEPATITE C EM PACIENTES HEMOFÍLICOS: PERFIL
IMUNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES
GENÓTIPOS VIRAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração “diagnóstico e controle”.

Manaus, 14 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dra. Adriana Malheiro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dra. Antônia Maria Ramos Franco
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA

Dedicatórias

A Deus, que mesmo nos momentos de pouca fé, sempre me acompanhou e me iluminou;

Aos meus pais, Paulo e Graça, por acreditarem e proporcionarem apoio fundamental a minha carreira profissional;

A minha querida Vó Nely pela paciência, cuidado e carinho que sempre teve com todos nós;

Aos meus irmãos, Paulo André e Gustavo, pela amizade e companheirismo em todos os momentos;

A minha noiva, Lorena, pela ajuda, amor, e dedicação ao longo desses quase 10 anos juntos e por nunca ter duvidado da minha capacidade. Sem você, nada disso teria acontecido.

Agradecimentos

A todos hemofílicos, que acreditaram e participaram deste trabalho sem nunca terem pedido nada em troca. Desejo a vocês toda a saúde do mundo.

A minha orientadora, Dra. Adriana Malheiro pela confiança e pelo exemplo de dedicação e amor pela pesquisa.

A Dra. Kátia Torres, pelo apoio, ajuda e espaço cedido na Fundação HEMOAM para a realização deste trabalho;

Ao meu tio Ângelo, pela amizade e conversas durante esta etapa da minha vida;

Aos meus sobrinhos, Carol e Luiz Henrique, por terem trazido mais amor para nossas vidas;

Ao Dr. Gilder Vásquez, Odete, Bruno e Livia por todo carinho que sempre me deram. Vocês são a minha segunda família;

Aos meus amigos, Léo, André, João Paulo e Fabinho, por toda amizade e pelos momentos de descontração quando estamos juntos;

A Dra. Helyde Marinho, pela paciência e orientação na iniciação científica e por ter me passado todo seu amor pela pesquisa;

Aos amigos do NAEF, que sempre que precisei me ajudaram: Walter, Karen, Adélia, Van, Lizy, Andréa, Carol e Fernanda.

Aos amigos Daniel e Tati, pela amizade, conversas e apoio em todas as etapas deste trabalho;

A Dra. Erbênia, que acreditou e ajudou de forma sensacional para a realização deste trabalho.

A Fundação HEMOAM pela oportunidade e espaço que me foi dado para a realização deste projeto.

A FAPEAM, pela bolsa e por todo incentivo a pesquisa no Estado do Amazonas.

Ao Programa de Mestrado em Patologia Tropical e seus professores, pela oportunidade em estar aqui;

Aos estatísticos, Felicien e Edinho, pela ajuda nas análises dos resultados deste estudo.

RESUMO

Os pacientes hemofílicos já foram vítimas de inúmeras infecções veiculadas pelo sangue por meio de transfusões sanguíneas e a hepatite C é uma das infecções a que os hemofílicos estão sujeitos, principalmente aqueles que receberam combinados de fatores de coagulação antes dos anos 90, período no qual este vírus ainda não tinha sido identificado. O HCV pode causar complicações a estes pacientes, como o aumento da mortalidade e o aumento de casos de carcinoma hepatocelular. O objetivo deste estudo foi estimar a soroprevalência do HCV, associar a resposta imune e relacionar ao genótipo e carga viral nos pacientes hemofílicos atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM. Participaram do estudo 78 pacientes hemofílicos, que procuraram a Fundação HEMOAM no período de janeiro a dezembro de 2008. Todos os participantes são do sexo masculino e apresentaram idade entre 2 e 52 anos. Nenhum dos pacientes estudados apresentou reatividade nos exames sorológicos para HIV, HTLV, doença de Chagas ou Sífilis. No entanto, 30,8% apresentaram reatividade para anticorpos anti-HCV e 19,2% para anti-HBc. As concentrações das transaminases (AST e ALT) dos pacientes anti-HCV reativos foram maiores dos que os anti-HCV não reativos. A ALT mostrou ainda correlação significativa com a carga viral do HCV nesses pacientes. Na avaliação da resposta imunológica celular, podemos verificar um aumento dos linfócitos TCD8⁺ nos hemofílicos anti-HCV reativos, no entanto, os leucócitos ativados CD69⁺ não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. A análise das citocinas séricas mostrou um aumento de IL-4 nos hemofílicos anti-HCV reativos e de IFN- γ sendo que quando comparamos estas citocinas com a carga viral do HCV nesses pacientes, somente a IL-4 apresentou correlação. As concentrações IL-10 apesar de não terem apresentado diferença entre os grupos estudados, elas apresentaram correlação com a carga viral do HCV indicando que este aumento está relacionado com a proliferação viral do HCV nesses pacientes. Podemos concluir deste estudo, que as chances dos hemofílicos contraírem infecções veiculadas pelo sangue diminuíram, principalmente após 1990. Os hemofílicos infectados pelo HCV apresentam um quadro de hepatite C crônica e o aumento das transaminases relacionada com a carga viral do HCV nesses pacientes indicam a necessidade de submeter estes pacientes a um tratamento. As concentrações mais elevadas de IFN- γ nos hemofílicos com anti-HCV reativos não se mostraram eficientes na resolução da infecção.

Palavras-chave: Hemofilia, vírus da hepatite C, citocinas, resposta imune.

ABSTRACT

The hemophiliac patients were already victims of infections transmitted by the blood, mainly through sanguine transfusions. The hepatitis C is one of the infections that the hemophiliacs are subject, especially those that received combined of coagulation factors before the nineties (period in which this virus still had not been identified). The HCV is responsible for increase of the mortality and the cases of hepatocellular carcinoma. The objective of this study was to esteem the seroprevalence of HCV, to associate the immune response and to relationship between the genotype and viral load in the hemophiliac patients assisted in the Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM. Seventy eight hemophiliac patients were assisted at Fundação HEMOAM in the period of January to December of 2008. All the participants are male and they presented age between 2 and 52 years. None of the studied patients presented reactivity in the serologic exams for HIV, HTLV, Chaga's disease or Syphilis. However, 30,8% presented reactivity for antibodies anti-HCV and 19,2% for anti-HBC. The concentrations of the transaminases (AST and ALT) of the patients anti-HCV reagents were larger compared with those which presented the anti-HCV -. ALT still showed significant correlation with the viral load of HCV in those patients. In the evaluation of the cellular immunological response, we can verify an increase of the lymphocytes TCD8⁺ in the hemophiliac's anti-HCV +. However, the activated leukocytes CD69⁺ didn't present significant differences among the groups. The analysis of the seric cytokines shows an increase of IL-4 and IFN- γ in the hemophiliac's anti-HCV+. However, when we compared these cytokines with the viral load of HCV in those patients, only the IL-4 it presented correlation. The IL-10 concentrations presented correlation with the viral load of HCV, indicating that this increase is related with the viral proliferation of HCV in those patients, in spite of they have not presented difference among the studied groups. We can end of this study saying that the hemophiliacs chances contract infections transmitted by the blood decreased after 1990. The hemophiliacs infected by HCV present a clinical picture of chronic hepatitis C and the increase of the transaminases related with the viral load of HCV. In those patients indicate the need to submit these patient ones to a treatment. The highest concentrations of IFN- γ in the hemophiliacs with anti-HCV+ were not shown efficient in the resolution of the infection.

Keywords: Hemophilia, HCV, cytokines, immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hemofilia causada por um evento genético novo, sem hereditariedade	17
Figura 2	Transmissão de hemofilia para mulheres	17
Figura 3	Curso natural da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV)	26
Figura 4	Tira do Imunoblot que identifica partículas do HCV.....	30
Figura 5	Identificação das populações leucocitárias no programa Cell Quest [®] do citômetro de fluxo FacsCalibur [®]	39
Figura 6	Identificação das células marcadas com anticorpos monoclonais para separação e quantificação das sub-populações leucocitárias	40
Figura 7	Procedimentos para realização do seqüenciamento e genotipagem do HCV.....	41
Figura 8	Esquema da diluição seriada do padrão de citocinas, conforme recomendações do kit <i>Opteia[™] Set Human</i> (BD).....	47
Figura 9	Fluxograma dos resultados das análises de PCR quantitativo, PCR qualitativo e hemofílicos com sorologia positiva para anticorpos Anti-HCV que foram genotipados.....	61

LISTA DE QUADROS e TABELAS

Quadro 1	Etapas que serão utilizadas na PCR para amplificação do cDNA do HCV.....	41
Quadro 2	Iniciadores utilizado na PCR para HCV.....	43
Quadro 3	Programa utilizado na PCR para amplificação do cDNA do HCV para genotipagem	43
Tabela 1	Frequência da co-reatividade para anticorpos Anti-HCV e Anti-HBC pelo ELISA no soro dos pacientes hemofílicos estudados.	51
Tabela 2	Perfil de bandas de anticorpos para proteínas virais do HCV feito pelo teste complementar Immunoblot em pacientes hemofílicos com sorologia anti-HCV reativa no ELISA.....	52
Tabela 3	Perfil de sub-populações de leucócitos do sangue periférico dos pacientes hemofílicos.....	54
Tabela 4	Perfil das populações de leucócitos CD69+ no sangue periférico dos pacientes hemofílicos.....	56
Tabela 5	Demonstração dos genótipos encontrados e suas cargas virais em pacientes hemofílicos.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Percentual de pacientes hemofílicos com idades abaixo e acima de 18 anos que participaram do estudo.....	49
Gráfico 2	Percentual de pacientes hemofílicos que apresentaram reatividade para os anticorpos Anti-HCV e Anti-HBc pelo teste ELISA.....	50
Gráfico 3	Percentual de hemofílicos com idade igual ou maior que 18 anos que apresentaram reatividade para anticorpos anti-HCV e anti-HBc em comparação com os pacientes com idade abaixo de 18 anos que não apresentaram soropositividade para nenhum destes anticorpos.....	51
Gráfico 4	Comparação das concentrações de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) em hemofílicos.....	53
Gráfico 5	Percentual das sub-populações e quantidade de leucócitos no sangue periférico de hemofílicos com sorologia para Anti-HCV não reativa e Anti-HCV reativa.....	54
Gráfico 6	Distribuição das populações de linfócitos $LTCD3^+/CD4^+$ (A), $LTCD3^+/CD8^+$ (B) e da relação $LTCD4^+/CD8^+$ (C) no sangue periférico de pacientes hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV.....	55
Gráfico 7	Percentual das sub-populações de leucócitos ativados - linfócitos $CD69^+$ (A), neutrófilos $CD69^+$ (B), monócitos $CD69^+$ (C) e eosinófilos $CD69^+$ (D) no sangue periférico de pacientes hemofílicos com sorologia reativa e não reativa para anticorpos anti-HCV.....	57
Gráfico 8	Comparação das concentrações séricas de IL-4 (A) e IL-10 (B) entre os pacientes hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV.....	58
Gráfico 9	Comparação das concentrações séricas de IL-6 (A), IL-8 (B) e TNF- α (C) entre os pacientes hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV.....	59
Gráfico 10	Comparação das concentrações séricas de IL-12 (A) e IFN- γ (B) entre os pacientes hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV.....	60
Gráfico 11	Percentual de hemofílicos reativos para anticorpos anti-HCV que apresentaram carga viral no PCR quantitativo.....	61
Gráfico 12	Correlação da carga viral (CV) do HCV com a concentração das transaminases pelo coeficiente de Pearson e a análise pelo teste t.....	63
Gráfico 13	Correlação da carga viral (CV) do HCV e concentração das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ pelo coeficiente de Pearson e análise pelo teste t.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Anti-HCV	Anticorpos contra o vírus da hepatite C
Anti-HBc	Anticorpos contra o core do vírus da heaptite B
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
CCP	Concentrado de Complexo Protrombínico
CCPA	Concentrado de Complexo Protrombínico Ativado
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DDAVP	Droga utilizada no tratamento de coagulopatias
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Etilenodiaminotetraacetato (anticoagulante para coleta de sangue)
ELISA	Enzyme Linked Imunesorbant Assay (Ensaio Imunoenzimático)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FIX	Fator IX da coagulação sanguínea
FL	Fluorescência
FSC	Tamanho
FVIII	Fator VIII da coagulação sanguínea
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOAM	Fundação de hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LTCD4⁺	Linfócito T CD4 ⁺
LTCD8⁺	Linfócito T CD8 ⁺
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

min.	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M-MLV	Enzima Transcriptase Reversa Moloney Murine Leukemia Víru
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PE	Ficoeritrina
PFC	Plasma Fresco Congelado
RNA	Acido Ribonucléico
RPM	Rotações por Minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa
Seg	Segundo
SSC	Granulosidade
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Hemofilia	16
1.1.1 Hemofilia A.....	18
1.1.2 Hemofilia B	19
1.1.3 Manifestações Clínica.....	19
1.1.4 Diagnóstico e tratamento da hemofilia.....	20
1.2 Hepatite C	22
1.2.1 Epidemiologia.....	24
1.2.2 Transmissão.....	25
1.2.3 Patogênese.....	26
1.2.4 Resposta imune na infecção pelo HCV.....	27
1.2.5 Diagnóstico.....	30
1.3 Hemofilia associada à infecção pelo HCV	31
2. Objetivos	34
2.1 Geral	34
2.2 Específicos	34
3. Metodologia	35
3.1 Modelo de Estudo	35
3.2 População de Estudo	35
3.2.1 Participantes	35
3.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	35
3.3 Procedimentos	36
3.3.1 Coleta	36
3.3.2 Análises hematológicas e bioquímicas	36
3.3.3 Diagnóstico Sorológico	37
3.3.4 Citometria de fluxo	37
3.3.5 Diagnóstico Molecular do HCV (PCR) e Determinação da Carga Viral ...	40
3.3.6 Sequenciamento e Genotipagem do HCV	41
3.3.7 Quantificação de citocinas (ELISA)	46
3.4 Armazenamento, análise estatística e apresentação dos dados	48
3.5 Considerações éticas	48
4. Resultados	49
4.1 Dados demográficos	49
4.2 Soroprevalência de doenças infecciosas transmitidas pelo sangue	50

4.3 Concentrações de Alanina Amino-transferases (ALT) e Aspartato Amino-transferases (AST).....	52
4.4 Análise de populações de leucócitos no sangue periférico dos hemofílicos....	53
4.5 Análise das sub-populações de linfócitos T por citometria de fluxo.....	55
4.6 Análise das populações de leucócitos CD69⁺ por citometria de fluxo.....	56
4.7 Análises das concentrações de citocinas séricas nos pacientes hemofílicos....	57
4.7.1 Citocina Th2 e supressora: IL-4 e IL-10.....	57
4.7.2 Citocinas pró-inflamatórias: IL-6, IL-8 e TNF- α	58
4.7.3 Citocinas Th1: IL-12 e IFN- γ	59
4.8 Distribuição dos genótipos e carga viral nos pacientes hemofílicos.....	60
4.9 Análise da correlação.....	62
4.9.1 Correlação entre carga viral (CV) do HCV e transaminases (AST e ALT) presente no sangue de pacientes hemofílicos.....	62
4.9.2 Correlação entre carga viral (CV) do HCV e as citocinas.....	63
5. Discussão.....	65
5.1 Soroprevalência de doenças infecciosas transmitidas pelo sangue nos hemofílicos.....	65
5.2 Concentração de ALT e AST entre os hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV.....	67
5.3 Análises das populações de leucócitos no sangue periférico dos hemofílicos.....	68
5.4 Análise das populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺).....	68
5.5 Análise das populações de leucócitos CD69⁺ por citometria de fluxo.....	70
5.6 Análises das concentrações séricas de citocinas nos pacientes hemofílicos.....	70
5.7 Carga viral e genótipos encontrados no pacientes hemofílicos.....	73
5.8 Correlação da carga viral (CV) do HCV com os níveis de transaminases (AST e ALT) nos pacientes hemofílicos.....	74
5.9 Correlação de IL4, IL-10 e IFN-γ com a carga viral (CV) do HCV nos hemofílicos.....	75
6. Conclusão.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
Apêndice A – TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85
Apêndice B – Parecer do comitê de ética.....	86

1. INTRODUÇÃO

Os pacientes hemofílicos já foram vítimas de inúmeras infecções veiculadas pelo sangue principalmente por meio de transfusões sanguíneas. Mas com a melhoria das técnicas utilizadas em selecionar doadores de sangue sadios, o risco de se contrair tais infecções é mínimo. No entanto, devido à janela imunológica, período no qual os anticorpos estão em uma concentração que não é possível detectar em testes sorológicos, ainda existe uma pequena possibilidade de adquirir estas doenças em uma transfusão sanguínea (RUMI et al., 2004).

A hepatite C é uma das infecções a que os hemofílicos estão sujeitos, principalmente aqueles que receberam combinados de fatores de coagulação antes dos anos 90, período no qual este vírus ainda não tinha sido identificado. O Vírus da hepatite C (HCV) pode causar inúmeras complicações a estes pacientes, como o aumento da mortalidade e o aumento de casos de carcinoma hepatocelular (CARMO et al., 2002).

Considerando estes fatos, este trabalho visou identificar os pacientes hemofílicos que estão contaminados pelo HCV, além de caracterizar os diferentes genótipos e sua distribuição, associando com o perfil da resposta imune destes pacientes contra o HCV.

1.1 Hemofilia

A primeira documentação publicada da existência de um distúrbio hereditário da coagulação ligado ao sexo data de uma descrição, no século V, no Talmud, e acabou sendo denominada hemofilia na literatura medica alemã do século XIX. A patogênese desse processo hemorrágico não foi elucidada completamente até 1952, quando uma mistura de

plasma de dois indivíduos hemofílicos com quadros clínicos e hereditários similares corrigiu seus respectivos exames de coagulação prolongados (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005).

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária ocasionada por defeitos nos fatores VIII e IX da coagulação sanguínea. Ela é a mais freqüente e a mais severa doença que acomete o processo coagulatório do organismo humano (MANNUCCI; TUDDENBAM, 1999). É herdada pelo cromossomo sexual X e acomete, principalmente, indivíduos do sexo masculino. Indivíduos do sexo feminino por terem dois cromossomos X podem ser somente portadores. É importante ressaltar que, em cerca de 25% - 30% dos casos de hemofilia, o evento genético é novo, não havendo neste caso, relato de ocorrência da doença em outros membros da família (Figura 1) (REITSMA et al., 1994).

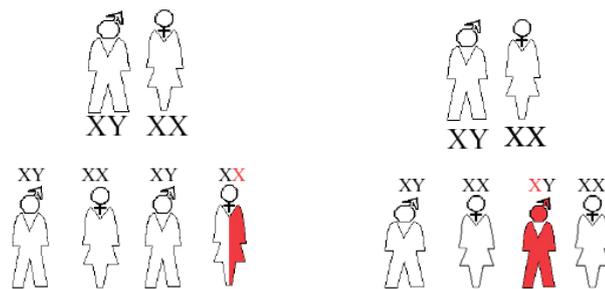


Figura 1 – Hemofilia causada por um evento genético novo, sem hereditariedade.
Fonte: Manual de Coagulopatias hereditárias (BRASIL, 2006)

A hemofilia em mulheres é rara, mas pode ocorrer em decorrência da união de um homem com hemofilia e uma mulher portadora como demonstrado na figura 2 (REITSMA et al, 1994).

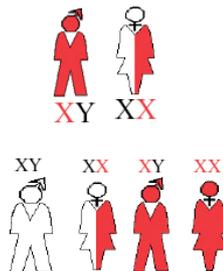


Figura 2 – Transmissão de hemofilia para mulheres.
Fonte: Manual de Coagulopatias hereditárias (BRASIL, 2006)

A hemofilia pode ser dividida em hemofilia A (hemofilia clássica) e hemofilia B (Doença de Christmas) e a hereditariedade é semelhante entre as duas.

De acordo com o Ministério da Saúde, 75% dos casos de doença hemorrágica observados no Brasil são causados pela hemofilia A e 20% pela hemofilia B, estando os 5% restantes relacionados às formas clinicamente significativas da doença de Von Willebrand e as outras deficiências de fatores de coagulação. Levantamentos feitos em diversas populações brasileiras estimaram a incidência de hemofilia em 1:10.000 nascimentos masculinos, sendo 80% dos casos de hemofilia A e 20% de hemofilia B (ARRUDA, 1995; CAIO et al., 2001). A hemofilia, por estar relacionada com a diminuição da atividade dos fatores VIII e IX, afeta o sistema intrínseco da coagulação. O sistema intrínseco é chamado assim porque é ativado por componentes presentes no espaço intravascular. Estes componentes ativam o fator XII, que por sua vez ativa o fator XI que ativa o fator IX. O fator IX na presença do fator VIII e do fator plaquetário 3 ativa o fator X, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina (ZAGO et al., 2001).

1.1.1 Hemofilia A

A hemofilia A é causada por um defeito no fator VIII da coagulação. O fator VIII é uma proteína de aproximadamente 2.350 aminoácidos e está presente no plasma sanguíneo. A doença está associada com a mutação do gene que dá origem a esta proteína. Este gene está localizado no braço longo do cromossomo X (banda Xq28), é extremamente extenso (180 kb) e complexo (26 exons). Os defeitos moleculares no gene que dá origem ao fator VIII são muito heterogêneos, ou seja, podem sofrer vários tipos de mutações (BOWEN, 2002).

A Hemofilia A pode ser classificada como grave (atividade do fator VIII abaixo de 1%), moderada (pessoas com atividade do fator VIII entre 1% e 5%) e leve (níveis plasmáticos de fator VIII entre 5% e 40%) (ZAGO, 2001).

Apesar de ser uma doença hereditária, a Hemofilia A em 30% dos casos pode ser ocasionada por mutações novas, isto é, que não estão presentes no cromossomo X da mãe. Numerosas mutações já foram reportadas e estas são compiladas em banco de dados onde mais de 900 tipos já foram identificadas (BOWEN, 2002).

1.1.2 Hemofilia B

Na hemofilia B o problema está no gene que dá origem ao fator IX ou fator de Christmas da coagulação sanguínea. O fator IX é um polipeptídeo de aproximadamente 415 aminoácidos e para ser ativado necessita de vitamina K, possui uma vida média de 20 horas e concentração plasmática de 4 μ g/mL. Sua atividade persiste quando há redução de até 20% da concentração. O gene do fator IX também está localizado no braço longo do cromossomo X na banda q26 e tem cerca de 33,5 Kb (BOWEN et al., 2002). Vários polimorfismos podem acometer o gene do fator IX e ocasionar uma hemofilia, mas geralmente são pequenas mutações responsáveis por esta doença (GIANELLI, et al., 1998).

A classificação da hemofilia B é feita de acordo com a atividade do fator IX semelhante à hemofilia A.

1.1.3 Manifestações clínicas

Os portadores de hemofilias têm grandes sangramentos após pequenas lesões, porém, podem aparecer sem nenhum trauma aparente (MANNUCCI & TUDDENBAM, 1999). Possuem várias manifestações hemorrágicas, como: hemartroses, artropatia hemofílica crônica, hematoma, hematúria, sangramento gastrointestinal e pseudotumor hemofílico ou cistos hemorrágicos (ZAGO et al., 2001). Não é possível distinguir a hemofilia A da

hemofilia B somente com exames clínicos, mas sim com exames laboratoriais (RIZZA, 1994).

1.1.4 Diagnóstico e tratamento da hemofilia

O diagnóstico laboratorial pode ser feito através da observação dos resultados anormais dos exames como: Tempo de coagulação aumentado, o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) aumentado, Tempo de Geração de Tromboplastina alterado, consumo de Protrombina alterado, com protrombina residual do soro aumentada e dosagem dos Fatores VIII e IX alterada.

O tratamento mais importante para a hemofilia é a reposição dos fatores de coagulação VIII e IX. Esta terapia tem muito sucesso na prevenção das hemartroses, principal manifestação hemorrágica do hemofílico. A reposição destes fatores é utilizada, ainda, antes de procedimentos que possam levar a algum tipo de sangramento (MOLL; WHITE, 1995).

No Brasil, temos várias opções de tratamento dentre os quais podemos ressaltar: os concentrados de Fator VIII (FVIII) e Fator IX (FIX) que são obtidos pelo fracionamento de um pool de plasma purificado. O Concentrado de Complexo Protrombínico (CCP) que possui os fatores II, VII, IX e X e é obtido também pelo fracionamento de pool de plasma. O CCP é utilizado em hemofílicos B sem risco de trombose, quando não se tem disponível o FIX e em hemofílicos A que possuem inibidores, que são anticorpos contra o FVIII; O Concentrado de Complexo Protrombínico Ativado (CCPA), semelhante ao CCP, mas neste caso os fatores estão ativados. O CCPA é indicado para o tratamento de pacientes com hemofilia A e B com inibidores de alto título. O Plasma Fresco Congelado (PFC) e o Crioprecipitado, mais utilizado nas coagulopatias menos freqüentes (BRASIL, 2006).

O grande inconveniente destas terapias é que estes produtos são feitos de plasma congelado e isto gera a possibilidade de infecção por microorganismos veiculados pelo

sangue, como: vírus da hepatite B (HBV), vírus T-linfotrópico humano (HTLV), *Trypanossoma cruzi* (doença de chagas), vírus da hepatite C (HCV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ALEDORT, 1996; GOEDERT et al., 2004). Concentrados recombinantes, desenvolvidos por técnicas de biologia molecular e purificados, também são utilizados no tratamento desta doença além de algumas drogas, dentre elas: drogas antifibrinolíticas como o ácido tranexâmico e DDAVP (1-deamino-8-arginina vasopressina) (OLSEN et al., 2003; LUSHER et al., 2004).

Embora já tenham surgido novas terapias para a hemofilia, a transfusão sanguínea continua sendo a principal. Antes dos anos 90, o risco de contaminação por doenças veiculadas pelo sangue nesta terapia era muito grande. Nesta época, um grande número de hemofílicos foi contaminado com sangue infectado, sendo o vírus da hepatite C (HCV) um dos principais agentes que causaram essas infecções devido a não existência de testes que detectavam este vírus. Com o surgimento dos testes imunológicos e a obrigatoriedade de realizá-los em todos doadores de sangue, diminuiu-se consideravelmente este risco. Atualmente são poucos os casos relatados de infecções derivadas de transfusões. A contaminação pelo HCV nos pacientes hemofílicos aumenta a morbidade destes pacientes (WILDE, 2004; QUINTANA et al., 2003).

1.2 Vírus da Hepatite C (HCV)

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus RNA da família Flaviviridae com aproximadamente 9.500 nucleotídeos, onde a partícula viral é composta por um envoltório derivado da membrana celular do próprio hospedeiro. Possui proteínas que se distinguem em estruturais e não estruturais.

As estruturais são: a formadora do capsídeo viral (Core) que é uma Proteína presente em diferentes isolados de HCV e possui vários epítomos que são reconhecidos por linfócitos B. Esta proteína pode estar relacionada com a patogênese do hepatocarcinoma; e as proteínas E1 e E2 que são formadoras do envoltório viral. Estas proteínas possuem uma grande variabilidade, ou seja, estão sempre gerando mutantes como um mecanismo de escape do sistema imune. Por este motivo não são boas opções para serem utilizadas no diagnóstico desta doença. As não-estruturais são as NS2 e NS3 que se acredita terem uma importância fundamental na replicação viral. No diagnóstico do HCV é utilizada uma pequena porção da região N-terminal da proteína NS3. Além dessas duas, ainda temos a NS4 que forma 2 proteínas chamadas NS4A e NS4B, sendo a NS4A um co-fator para atividade de protease da NS3 e a NS4B ainda não é conhecida; e a NS5 também gera duas proteínas distintas: NS5A e NS5B. A NS5A é uma região que pode estar ligada à sensibilidade ao tratamento com interferon e NS5B possui um nível de variabilidade mediano e por isso é utilizada na tipagem de isolados virais (ROSEN; GRETCH, 1999).

No RNA viral, encontramos as regiões codificadoras e regulatórias 5' e 3' que são normalmente conservadas em isolados do HCV. O processamento desta região por proteases virais e celulares forma as proteínas estruturais, não estruturais e funcionais do vírus. A região 5'NTR é a região mais conservada do vírus devido a necessidade de manter uma estrutura secundária para ligação do ribossomo no início da tradução. Esta característica levou essa região a ser o alvo de escolha para detecção do HCV por métodos moleculares. A região

3'NTR é a parte final do genoma viral, possui uma pequena região bastante conservada mas devido ao seu tamanho é pouco utilizada no diagnóstico viral (ROSEN; GRETCH, 1999).

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

Devido a esta diversidade genética do HCV, ele consegue muitas vezes escapar do sistema imune do hospedeiro levando estes, muitas vezes, a infecções crônicas. Por isso, existe a necessidade de se conhecer a diversidade genética deste vírus em diferentes populações para que haja um melhor entendimento da evolução da doença, melhorias no tratamento, realização de estudos epidemiológicos e aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico, tanto sorológico quanto molecular (CAMPIOTTO et al, 2005).

Este vírus foi identificado em 1989 como sendo o principal agente causador das hepatites pós-transfusionais (hepatite não-A e não-B). Essa identificação foi feita em trabalho realizado por Choo e colaboradores utilizando técnicas de biologia molecular.

Após o conhecimento e identificação deste vírus, foram implantados testes imunológicos utilizando antígenos e anticorpos como o ELISA na seleção de doadores, e isto reduziu sensivelmente a incidência de hepatites pós transfusionais causada pelo HCV (STRAUSS et al., 2001).

1.2.1 Epidemiologia

A infecção pelo vírus da hepatite C apresenta distribuição universal. Em 1999, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 3% da população mundial, ou seja, aproximadamente 170 milhões de pessoas, estavam infectados pelo HCV.

Embora a prevalência mundial seja em média 3%, algumas regiões apresentam prevalências superiores, como a África, leste do mediterrâneo e oeste do pacífico que possuem 5,3%, 4,6% e 3,9% da população infectada, respectivamente. Em outros locais encontramos prevalências inferiores a média mundial: Américas (1,7%), Europa (1,03%), Sudeste da Ásia (2,15%) (OMS, 1999).

Em estudo realizado na América Central (Porto Rico), nos anos de 2001 e 2002, foi observada uma prevalência de 6,3% da população. No México, a prevalência encontrada foi de 1,2%. Em trabalhos realizados com doadores de sangue, encontraram-se prevalências de 0,3% no Chile e 1,14% no Brasil (PEREZ et al., 2005; URIBE, MENDEZ-SANCHEZ, 2002; MUNOZ et al., 1998; VASCONCELOS et al., 1994).

No Brasil, um estudo realizado em São Paulo mostrou prevalência do HCV de 1 a 4%, variando de acordo com a faixa etária (FOCACCIA et al., 1998).

Busek; Oliveira (2003) observaram a distribuição do genótipo do HCV nas diferentes regiões do Brasil, concluindo que o genótipo mais freqüente nas regiões norte, nordeste e sudeste é o 1, seguido do 3 e 2. Na região sul, o genótipo mais freqüente é o 3 seguido do 1.

Dados similares foram encontrados por Campiotto et al. (2005) que estudaram a distribuição geográfica dos genótipos do HCV em diferentes Estados das várias regiões do Brasil. Foram analisados 1.688 pacientes onde 64,9% possuem o genótipo 1; 30,2% o genótipo 3; 4,6% o genótipo 2; 0,2% o genótipo 4 e 0,1% o genótipo 5. No Amazonas, encontrou-se uma prevalência de 64,3% para o genótipo 1; 28,6% para o genótipo 3 e 7,1% para o genótipo 2. Dados recentes publicados por nosso grupo de pesquisa demonstram que a

prevalência do genótipo 1 foi de 87,9% e do genótipo 3 de 12,9% em estudo realizado com 154 doadores de sangue (Torres et al, 2009).

1.2.2 Transmissão

A transmissão do HCV ocorre principalmente por:

- Transfusões sangue e hemoderivados – A descoberta e a maior disponibilidade de novas técnicas para a seleção adequada de doadores de sangue tornaram este tipo de transmissão praticamente insignificante (THEODORE, 2006);

- Uso de drogas intravenosas – Vários trabalhos já demonstraram que pessoas que fazem uso de drogas intravenosas com compartilhamento de seringas possuem uma grande probabilidade de contrair este vírus (OLIVEIRA et al., 1999; BURATTINI et al., 2000);

- Transmissão sexual – É considerada pouco importante. Mas estudos já demonstraram que pessoas que possuem múltiplos parceiros sexuais estão mais propensas a contrair o HCV (DOORNUM et al., 1991; TENGAN et al., 2001);

- Hemodiálise – Existem trabalhos que demonstram que a prevalência de pacientes HCV positivos na população que faz hemodiálise é bem maior do que na população de doadores. Estes trabalhos geralmente concluem que a transmissão do HCV por hemodiálise se faz pelos materiais e máquinas de diálise (THEODORE et al., 2006);

- Outras formas de transmissão: realização de tatuagens, terapia por acupuntura, procedimentos médicos, odontológicos, exposições percutâneas e a transmissão vertical (que pode ocorrer tanto de forma intra-uterina como por via perinatal) (OLIVEIRA et al., 1999).

Uma parcela dos pacientes adquire o vírus de maneira não identificada. Algumas situações comuns podem ser as responsáveis, como o uso comum de lâmina de barbear, escova de dente e transplantes de órgão e tecidos (CONTE, 2000).

1.2.3 Patogênese

A hepatite causada pelo HCV é uma doença de evolução variável. De maneira geral, sua evolução é lenta, insidiosa e progressiva. Estima-se que apenas de 5 a 10% da população infectada apresente icterícia na fase aguda da infecção e procure um médico. Cerca de 80-90% dos indivíduos infectados evoluem para cronicidade. Sua evolução pode levar anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com enzimas hepáticas normais até hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (Figura 3). Devido a estas características, o paciente geralmente só descobre que está infectado pelo HCV quando vai fazer uma doação de sangue ou quando a doença já está em um estágio muito avançado (STRAUSS et al., 2001; PARANÁ et al., 1999).

O HCV tem ainda a capacidade de causar manifestações extra-hepáticas como vasculites, artrites, glomerulonefrites, crioglobulinemia, dentre outras, ocasionadas principalmente em consequência da replicação do vírus em células linfóides (LAUER e WALKER, 2001; GUMBER e CHOPRA, 1995; PAWLOTSKY et al. 2004; CACOUB et al. 1994, CACOUB et al. 2000; RAMOS-CASALS et al. 2005).

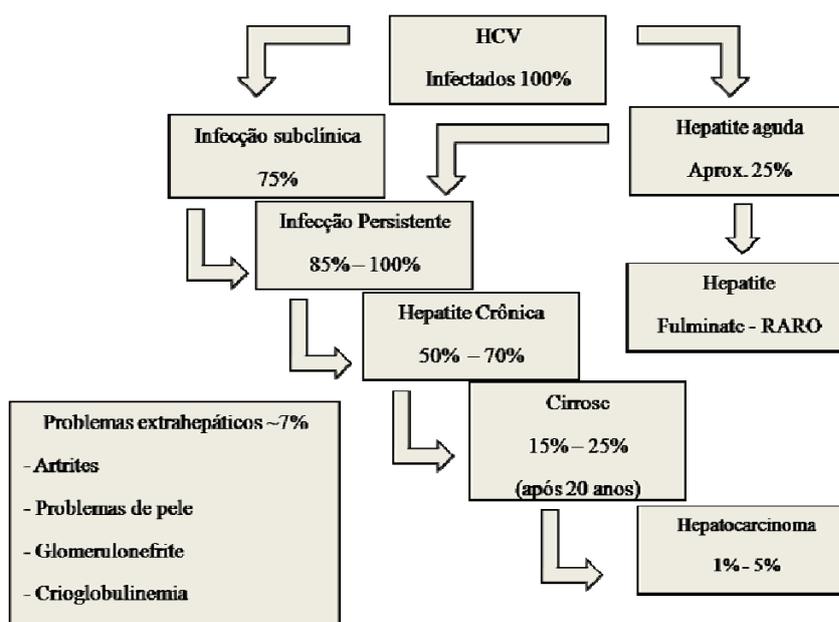


Figura 3 – Curso natural da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV)

1.2.4 Resposta imune na infecção pelo HCV

O HCV ao entrar no organismo humano, migra para as células hepáticas (hepatócitos) e as infectam. Este mecanismo de entrada na célula ainda não é bem conhecido, mas alguns autores sugerem que ele pode usar as moléculas de superfície destas células como o CD81, receptor *scavenger* de classe B tipo I, DC-SIGN e L-SIGN, interagindo com a glicoproteína E2 do envelope viral. Após a entrada do vírus na célula, este começa a replicação viral e é neste momento que ocorre a indução dos mecanismos do sistema imune inato (PILERI et al., 1998; ZHANG et al., 2004; SCARSELLI et al., 2002; LOZACH et al., 2003; POHLMANN et al., 2003; GARDNER et al., 2003).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo, ela se utiliza tanto de barreiras físicas, quanto por meio de células que podem ser os monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), leucócitos polimorfonucleares (PMN), células natural killer (NK) e células natural killer T (NKT) que reconhecem o patógeno (STEINMAN; HEMMI, 2006).

Os vírus quando infectam as células dos hospedeiros fazem com que a células produzam sinalizadores como o interferon (IFN) tipo I que serve como uma barreira inicial a infecção e a disseminação viral. Para isto, a célula utiliza receptores de vários tipos, como: os receptores de reconhecimento de padrão, receptores Toll-like (TLRs) e receptores para RNA helicase. Os TLR3 são expressos no endossomo e detectam dsRNA (*double stranded RNA*), enquanto que as fitas simples de RNA (*single stranded RNA* – ssRNA) são detectadas pelo TLR7 e TLR8 (KAISHO; AKIRA, 2000; BOWEIE; FITZGERALD, 2007). Estes receptores induzidos pelos ácidos nucléicos virais produzem interferons tipo I (IFN-alfa e IFN-beta) que por sua vez bloqueiam a replicação viral nas células (SZABO; DOLGANIUC, 2008). Estes receptores podem produzir ainda outros tipos de citocinas e algumas quimiocinas como TNF-alfa, interleucina-12 (IL-12) e proteína inflamatória de macrófago (MIP) 1-alfa (GORDEN et al., 2005). Entretanto, alguns autores, sugerem que o HCV pode utilizar suas proteínas não

estruturais NS3-4A e 4B para bloquear a produção de IFN tipo 1 (PAWLOTSKY et al., 2004; XU et al., 2009).

As citocinas produzidas pelas células do hospedeiro quando infectadas pelo HCV vão ativar as células de defesa, principalmente os macrófagos que vão migrar para o local da infecção dando início ao processo inflamatório (HEYDTMANN; ADAMS, 2009). O processo de recrutamento de leucócitos do sangue periférico para o local da infecção é orientado pelo gradiente de concentração das citocinas produzidas pelas células infectadas ou próximas ao local da infecção (NEUBAUER et al, 2000). O recrutamento das células inflamatórias origina dano tecidual, devido ao fato destas células atuarem na eliminação dos hepatócitos infectados com HCV por meio da apoptose. Este processo pode resultar em “*clearance*” viral ou em repetidos ciclos de inflamação e danos teciduais, acarretando a indução e substituição do tecido danificado pela fibrinogênese, ocasionando a fibrose hepática, principal fator de progressão da doença (GUIDOTTI; CHISARI, 2006).

A ineficiência da resposta imune inata em resolver a infecção viral, leva o organismo a realizar uma resposta mais específica ao vírus e é onde se inicia a resposta imune adaptativa com a participação dos Linfócitos T-*helper* ($CD4^+$) e T-citotóxicos ($CD8^+$) que participam na patogênese viral seja, diretamente, destruindo as células infectadas, ou indiretamente, produzindo fatores solúveis como citocinas e quimiocinas que contribuem para o processo inflamatório e/ou inibem a replicação viral e com a produção de anticorpos neutralizantes principalmente para partículas virais a fim de tentar impedir a entrada do vírus em outras células, mas nem sempre o sistema imune tem sucesso, pois o vírus pode rapidamente produzir mecanismos de escape (CHANG, 2003; DIEPOLDER et al., 1995).

A resposta imune por linfócitos T $CD4^+$ depende do tipo de citocina produzida, as células T $CD4^+$ são modificadas em Th1 (linfócitos T *helper*-1), com conhecida função citotóxica através da ativação de linfócitos T $CD8^+$ e produção de citocinas antivirais como IFN- γ , IL-12 e inflamatórias como TNF- α e IL-1, ou são diferenciadas em Th2 (linfócitos T

helper-2), com produção de IL-4 ou IL-10 suprimindo a resposta Th1 com a inibição da secreção de IFN- γ e IL-12 (FUKUDA; NAKANO, 2003).

A resposta Th1 por linfócitos T CD4⁺ contra proteínas não estruturais do vírus, principalmente a fração NS3 e possivelmente NS4 e NS5 podem contribuir para o sucesso do "clearance" viral. Os Linfócitos TCD8⁺ podem também contribuir com "clearance" com uma resposta intra-hepática multiespecífica e policlonal contra o vírus, enquanto que a persistência viral tem sido relacionada, principalmente, à alta variabilidade do HCV que permite o surgimento de mutações de escape (COX et al., 2005; RAY et al., 2005; TIMM et al., 2004).

As células reguladoras (Tregs) participam da resposta imune suprimindo a resposta pelos Linfócitos TCD8⁺ o que favorece a replicação viral, por outro lado, esta ação diminui os danos hepáticos da infecção crônica (GODKIN et al., 2008; RUSHBROOK et al., 2005).

Com os conhecimentos atuais sobre a ação do sistema imunológico sobre a infecção do HCV ainda não se conhecem os elementos que condicionam o desenvolvimento de um ou outro tipo de resposta imunológica (GRÜNER et al., 2000). Um fator que pode estar relacionado com a persistência da infecção após a fase aguda é o genótipo do vírus. Estudos já mostraram que 92% dos pacientes expostos ao genótipo 1b evoluem para a cronicidade e pacientes com infecção causada pelo genótipo 3 evoluem com intensa esteatose podendo acelerar o desenvolvimento de cirrose dependendo também de outros fatores adjuvantes (STRAUSS, 2001).

A lesão hepatocelular ocorre devido ao reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição. Acredita-se que o processo inflamatório contínuo e ineficiente, em termos de eliminação total do vírus, constitui o principal responsável pela agressão hepática. A progressão da lesão hepática, da hepatite crônica para cirrose, pode ainda estar relacionada com fatores do hospedeiro, como: sexo, idade, uso de álcool, concomitância com outros vírus e estado imunológico (STRAUSS, 2001).

1.2.5 Diagnóstico

O teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico do HCV é um teste imunoenzimático (ELISA) que detecta anticorpos contra o vírus da hepatite C. Os ensaios imunoenzimáticos evoluíram dos produtos de primeira geração que incorporavam proteínas não estruturais NS4 para os ensaios de terceira geração que incorporam as proteínas do CORE (estrutural), protease/helicase NS3, NS4 e NS5 replicase (não estruturais) (CONTE, 2000).

Embora extremamente útil, o ELISA costuma apresentar resultado negativo nos primeiros meses após a contaminação. Em resultados duvidosos, é necessário realizar testes confirmatórios como o Imunoblot que detecta mais especificamente anticorpos contra as partículas virais (Figura 4).

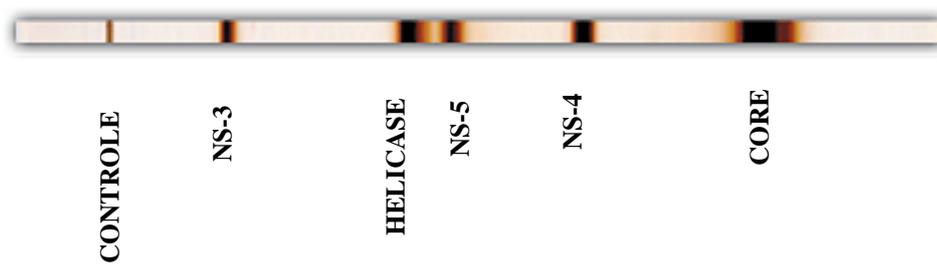


Figura 4 – Tira do Imunoblot que identifica anticorpos contra partículas do HCV.

As técnicas de biologia molecular para detecção do RNA do vírus da hepatite C se firmaram como necessárias para confirmação diagnóstica, comprovando a presença do vírus em todas as fases da infecção. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas de biologia molecular mais utilizada, que amplifica parte do genoma do vírus, sendo extremamente sensível. A determinação qualitativa do RNA do HCV é utilizada para confirmação diagnóstica, enquanto que a determinação quantitativa (carga viral) é empregada antes do início do tratamento, juntamente com a determinação do genótipo, para definir a duração do tratamento e monitorar a resposta terapêutica (STRAUSS et al., 2001).

1.3 Hemofilia associada à infecção pelo HCV

A infecção pelo vírus da hepatite C é freqüentemente observada em hemofílicos, principalmente aqueles que receberam concentrados de fatores de coagulação até meados dos anos 80. De fato, até 1985 quando este tipo de tratamento foi introduzido, os concentrados não eram submetidos à inativação viral durante a preparação e foram amplamente responsáveis pela transmissão da hepatite C em hemofílicos (FRANCHINI et al., 2002).

Teoricamente, todos os hemofílicos que receberam o concentrado de fatores da coagulação antes da utilização das técnicas de inativação viral foram infectados pelo vírus da hepatite C no momento da primeira infusão. Isto ficou demonstrado em estudos realizados na Itália com 83% de pacientes infectados; uma prevalência maior foi encontrada na Holanda com 98% (MAUSER-BUNSCHOTEN et al., 1995).

Após a introdução das técnicas de inativação viral no preparo do concentrado de fatores da coagulação e da triagem sorológica para HCV em bancos de sangue, a contaminação de pacientes hemofílicos pelo vírus da hepatite C foi bastante diminuída. Barbosa et al. (2002) demonstraram este fato em trabalho realizado na cidade de Goiânia (região central do Brasil) onde analisaram a sorologia de 90 hemofílicos pelo ELISA, encontrando 55 amostras positivas para HCV, sendo todas estas, de pacientes que receberam concentrados de fatores da coagulação antes da introdução de teste de triagem sorológica nos bancos de sangue.

A prevalência da infecção do HCV depende do teste realizado para sua detecção. Nos primeiros estudos, que utilizaram o teste ELISA de primeira geração para detectar anticorpos dirigidos contra o HCV, observou-se uma subestimação da real prevalência; posteriormente com a introdução de testes de segunda e terceira geração e os testes confirmatórios, reconheceu-se que a prevalência variou de 89 a 98% dos hemofílicos expostos a concentrados de fator VIII não submetidos à inativação viral (BAPTISTA, 2002).

Silva et al. (2005) estudando hemofílicos no Estado da Bahia (nordeste do Brasil) encontraram uma prevalência de 42,2% de HCV positivos. Sendo que em 77,3% destes pacientes foi detectado viremia; onde o genótipo 1 foi o mais prevalente (74%), seguido do 3 (22%) e 2 (4%). Estes resultados indicam que a prevalência do HCV ainda é alta entre os hemofílicos, muito embora a contaminação não tenha sido observada entre os menores de 5 anos neste estudo.

Outro estudo de soroprevalência de HCV em hemofílicos, em Minas Gerais (região sudeste do Brasil), observou-se uma prevalência de 44,6%. Além disso, os autores relataram que na maioria dos pacientes foi verificado viremia, indicando a necessidade de cuidados e tratamento especializados nestes pacientes (CARMO et al., 2002).

Muitos estudos publicados recentemente em hemofílicos infectados pelo HCV tiveram como objetivo elucidar o tempo entre a infecção e o início das complicações (cirrose hepática, problemas hepáticos e hepatocarcinoma) e fatores que influenciam no curso da doença (STEPHEN; MORGAN, 2006).

Estudos sobre a história natural da hepatite C em hemofílicos são limitados por dois fatores. A primeira limitação é representada por estudos histológicos do fígado, pois a biópsia hepática é fortemente recomendada em pacientes não hemofílicos infectados pelo HCV e possui indicação duvidosa em pacientes hemofílicos. O segundo fator limitante é determinado pelo grande número de hemofílicos co-infectados por outros vírus, em particular o HIV que é um fator de risco bem conhecido por causar uma progressão mais rápida de doenças hepáticas (THEODORE, 2006).

A terapia profilática dos hemofílicos consiste em receber concentrados de fatores de coagulação para prevenir o aparecimento dos sintomas da hemofilia como hemorragias e artropatias. Entretanto, o uso extensivo destes produtos derivados do sangue, provoca alterações no sistema imune dos hemofílicos. Estas alterações compreendem diminuição da relação dos Linfócitos T $CD4^+/CD8^+$, diminuição da secreção de Interleucina 2 (IL-2) e na

função dos monócitos. Essas alterações podem ser devido a exposição prolongada as proteínas do sangue como o fibrinogênio, albumina, IgG, IgM e albumina, além das infecções virais e doenças hepáticas (GOMPERTS., 1992).

Balkan et al. (2005), investigaram as possíveis alterações no sistema imune dos hemofílicos que receberam fatores de coagulação sanguínea com nível de pureza intermediário, e demonstraram que não houve mudança significativa na relação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ e nem nos outros tipos de linfócitos. Apesar disso, a resposta antígeno específica e o teste para avaliação de hipersensibilidade tardia foram relativamente menores nos hemofílicos.

Delladetsima et al. (2002), avaliaram pacientes hemofílicos HCV positivos e co-infectados com HIV e demonstram que esta co-infecção pode agravar o curso da hepatite C e que o Genótipo 1 do HCV é o que mais está relacionado com a doença hepática grave. A distribuição dos genótipos virais do HCV foi demonstrada por Parodi et al. (2008), em estudo com 288 hemofílicos, eles observaram a prevalência de 72% para o genótipo 1, 10% para o genótipo 2, 12% para o genótipo 3 e 2,5% para o genótipo 4, ainda neste estudo foi relatado ainda 5,6% de infecções com mais de genótipo do HCV.

Vários estudos têm demonstrado que curso natural da infecção pelo HCV, em pacientes hemofílicos é similar aos pacientes sem hemofilia, entretanto, são poucos os dados na literatura que mostram a resposta imunológica contra o HCV nesses pacientes (FRANCHINI et al.,2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estimar a soroprevalência do vírus da hepatite C (HCV), associar a resposta imune e relacionar ao genótipo e carga viral nos pacientes hemofílicos atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM

2.2 Específicos

- 2.2.1 Estimar a soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e outras infecções (HIV, HTLV, HBV, doença de chagas e sífilis) em pacientes hemofílicos;
- 2.2.2 Estudar a distribuição dos genótipos virais e carga viral do HCV dentro da população de portadores de hemofilia;
- 2.2.3 Descrever o perfil da resposta imune humoral e celular nos pacientes hemofílicos infectados pelo HCV;
- 2.2.4 Associar a resposta imune, o genótipo do HCV, a carga viral e as concentrações de transaminases (AST e ALT) encontrados nos pacientes hemofílicos.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

O estudo realizado foi do tipo transversal onde os pacientes foram selecionados por demanda espontânea no momento que foram atendidos no ambulatório, na emergência e no setor de fisioterapia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

3.2 População de Estudo

3.2.1 Participantes

Participaram do estudo 78 pacientes hemofílicos, independente de terem ou não infecção pelo HCV, que procuraram a Fundação HEMOAM no período de janeiro a dezembro de 2008. Todos os participantes do estudo são do sexo masculino e apresentam idade entre 2 e 52 anos.

3.2.2 Critérios de Inclusão/Exclusão

Foram incluídos na pesquisa todos pacientes hemofílicos em qualquer faixa etária que procuraram a Fundação HEMOAM no período de realização da pesquisa. Os pacientes hemofílicos menores de 18 anos só foram incluídos no estudo após a autorização dos pais ou responsável conforme estipulado pelo CEP-HEMOAM. Os pacientes que não apresentaram reatividade para nenhuma doença infecciosa participaram do estudo como grupo controle para

comparação da resposta imunológica. Os pacientes que aceitaram em fazer parte deste estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) do HEMOAM (APÊNDICE A). Projeto submetido ao CEP HEMOAM. Data: 07/12/2007 e aprovado na reunião de 13/12/2007 sob parecer N. 0024.0.112.117-07 – Versão 001/07 (APÊNDICE B)

3.3 Procedimentos

3.3.1 Coleta

Os participantes que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE, foram encaminhados para o setor de coleta da Fundação Hemoam onde foi obtido uma amostra de sangue de aproximadamente 20 mL, divididos em 5 tubos (1 sem anticoagulante para a bioquímica; 1 com EDTA para Hematologia/Citometria; 1 sem anticoagulante para a sorologia; 1 com EDTA para a PCR e 1 com EDTA para a quantificação de citocinas).

3.3.2 Análises hematológicas e bioquímicas

As análises hematológicas (HEMOGRAMA) e bioquímicas (AST, ALT) foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Fundação Hemoam e os resultados foram obtidos no programa X-Clinic onde ficam armazenados todos os resultados dos exames realizados no LAC-HEMOAM.

3.3.3 Diagnóstico sorológico

As análises sorológicas foram realizadas no laboratório de sorologia da Fundação Hemoam. Foi realizada pesquisa de anticorpos contra os vírus HCV, HBV, HIV e HTLV além de sífilis e doença de chagas.

O método para detecção dos anticorpos Anti-HCV foi o ELISA. Este método consiste na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos de superfície do vírus da hepatite (C, NS3, NS4 e NS5). A reação é considerada positiva quando a densidade óptica (absorbância) da amostra é superior ao valor do cutoff. Foi utilizado o kit Abbott anti-HCV versão 4.0.

Para a confirmação do diagnóstico sorológico foi feito o Western Blot que é um teste mais específico para de detecção de anticorpos Anti-HCV contra as proteínas virais. Para esta análise foi utilizado o Kit CHIRON[®] RIBA[®] HCV 3.0 SIA.

3.3.4 Citometria de fluxo

Com a citometria de fluxo qualificamos e quantificamos as sub-populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ para definir o perfil imunológico celular. Além disso, verificamos a presença da molécula de superfície CD69⁺ em todas as sub-populações de leucócitos (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) a fim de definirmos o grau de atividade destas células.

A primeira etapa da citometria de fluxo é fazer a marcação das células com anticorpos monoclonais que se fixam nas moléculas da superfície celular dos leucócitos. Estes anticorpos são marcados com fluorescência e estas são captadas pelo citômetro de fluxo. Para este estudo utilizamos três tubos para alcançar o objetivo proposto. No primeiro tubo (Tubo controle) não utilizamos os anticorpos marcadores e este serviu de controle para verificarmos se não houve

nenhuma contaminação no procedimento e além disso serviu para fazermos os ajustes na leitura da população celular e eliminarmos a auto-florescência das células (SETUP). No segundo tubo (Tubo MIX) colocamos três anticorpos monoclonais marcados: O anti-CD3⁺ marcado com TC (terceira cor-LARANJA- Code MHCD0306, lote 60010708, marca CALTAG), anti-CD4⁺ marcado com PE (ficoeritrina-VERMELHA- Code MHCD0404, lote 23031206, marca CALTAG) e anti-CD8⁺ marcado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína-VERDE - Code MHCD0801, lote 08090506, marca CALTAG). A molécula de superfície CD3⁺ é específica dos Linfócitos T, portanto, para dizermos com certeza se os linfócitos T são CD4⁺ ou CD8⁺ eles precisam apresentar em sua superfície as duas moléculas: O linfócito TCD4⁺ apresenta as moléculas de superfície CD3⁺ e CD4⁺ e o linfócito TCD8⁺ apresenta as moléculas CD3⁺ e CD8⁺ na superfície. O terceiro tubo (Tubo CD69⁺) foi colocado apenas o anticorpo anti-CD69⁺ FITC (Isotiocianato de fluoresceína-VERDE- code MHCD6901, lote 04120906, marca CALTAG).

Foi utilizado 1µL de cada anticorpo, em seguida adicionado 50 µL de sangue total com EDTA e incubados por 20 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após os 20 minutos da incubação, foi adicionado 2 mL de solução de lise (FACS Lysing solution, BD[®]) de hemácias em cada tubo. Os tubos foram homogeneizados e incubados por mais 10 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passados os 10 min., as células foram lavadas com PBS (Solução fisiológica tamponada com fosfato): Centrifugaram-se os tubos por 7 minutos a 1.300 RPM (rotações por minuto), desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 2 mL de PBS em cada tubo, em seguida, os tubos foram homogeneizados novamente e centrifugados mais uma vez por 7 min. a 1300 RPM.

Após esta centrifugação, desprezou-se novamente o sobrenadante e adicionamos 300 µL de PBS para fazer a leitura no citômetro de fluxo. A leitura foi feita no Citômetro de Fluxo Becton Dickinson (BD) – FACsCalibur[®] da Fundação HEMOAM.

A identificação das populações celulares foi feita por tamanho e granulosidade (FSC x SSC) utilizando-se o programa Cell-Quest[®]. Para identificar as população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, utilizaram-se gráficos “dot plot” (Fig. 5). Após a seleção da região de interesse, analisou-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células marcadas em cada população celular, utilizaram-se também gráficos “dot plot” de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 3 (FL3) e de fluorescência 2 (FL2) versus fluorescência 3 (FL3) como demonstrado na figura 6. Após a definição das regiões, o percentual de células positivas foi determinado utilizando-se de um histograma simples de análise da região.

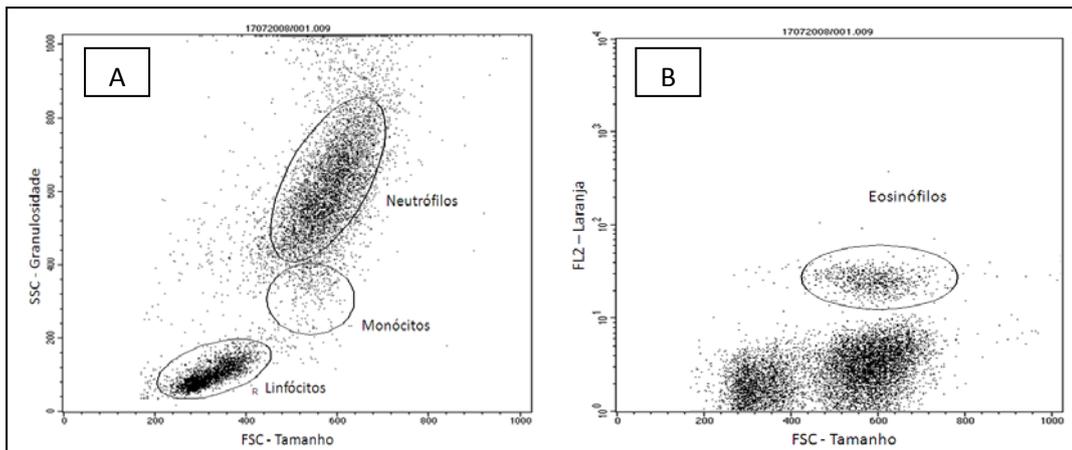


Figura 5 - Identificação das populações leucocitárias no programa Cell Quest[®] do citômetro de fluxo FacsCalibur[®]. Gráfico A – Identificação da população de linfócitos, monócitos e neutrófilos e gráfico B – Identificação da população de eosinófilos.

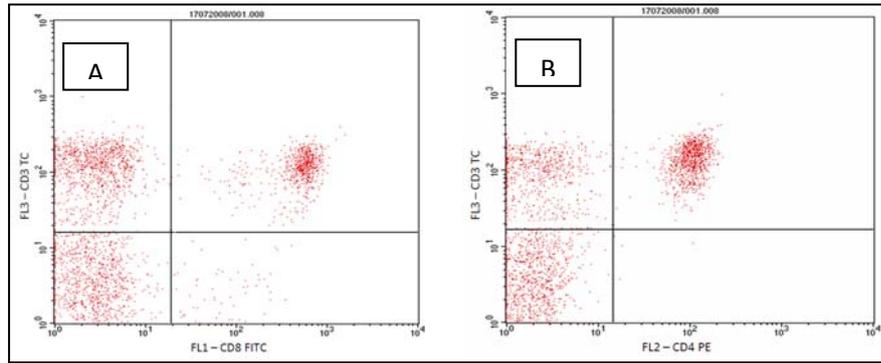


Figura 6 - Identificação das células marcadas com anticorpos monoclonais para separação e quantificação das sub-populações leucocitárias.

3.3.5 Diagnóstico Molecular do HCV (PCR) e Determinação da Carga Viral

Após os testes de triagem (sorologia e Western blot) os pacientes que foram positivos ou indeterminados para o HCV foram submetidos ao diagnóstico molecular por PCR onde foram determinadas, em caso de positivo, a carga viral de cada paciente. A determinação da carga viral nas amostras foi feita seguindo as orientações do kit AMPLICOR HCV MONITOR[®] Test, version 2.0 (Roche) baseada em cinco processos principais: preparação das amostras, transcrição reversa do RNA alvo (síntese do cDNA alvo), amplificação por PCR, hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica.

Este teste usa os iniciadores KY78 e KY80 que define uma seqüência de 244 nucleotídeos dentro de uma região altamente conservada do genoma HCV e o programa utilizado na PCR está descrito na quadro 1.

Quadro 1

Etapas que foram utilizadas na PCR para amplificação do cDNA do HCV

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO
Desnaturação Inicial	50°C	05 min.
Desnaturação	62°C	30 min.
Anelamento	90°C	10 seg.
Extensão	58°C	20 seg.
Final	91°C	< 2h

} 35 CICLOS

3.3.6 Sequenciamento e Genotipagem do HCV

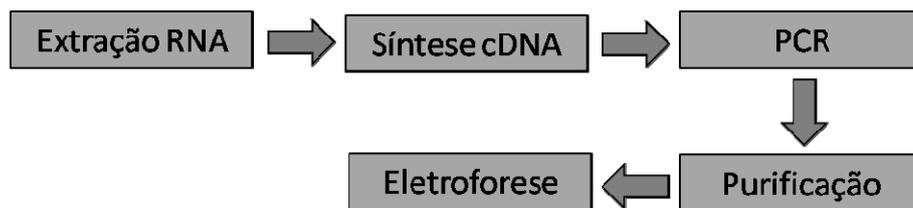


Figura 7 – Procedimentos para realização do sequenciamento e genotipagem do HCV

- **Extração de RNA**

Para a extração do RNA do HCV, foram seguidas as instruções do fabricante do Kit **QIAmp® Viral RNA** (Quiagen, Uniscience do Brasil-SP). Pipetou-se 560µL de solução buffer AVL contendo “carrier RNA” dentro de um eppendorfs de 1,5 ml. Adicionou-se 140µL de soro no tubo homogeneizando por 15 seg. Incubou-se o material a 37°C por 15 seg. e centrifugou-se. Após a centrifugação, adicionou-se 560 µL de etanol (96-100%), homogeneizando por mais 15 seg. Aplicou-se 630 µL da solução de etanol na coluna fornecida pelo Kit inserida em um microtubo de 2 mL. Após isto, centrifugou-se a 8000 RPM por 1 seg. e transferiu-se para outro tubo de 2mL limpo. Repetiu-se a etapa anterior. Abriu-se

a coluna e adicionou-se 500 μL do buffer AW1 e centrifugou-se a 8000 RPM por 60 seg. Colocou-se a coluna em outro tubo de 2ml limpo. Após esta etapa, abriu-se a coluna e adicionou-se 500 μL do buffer AWZ e centrifugou-se a 140000 RPM por 4 seg. Transferiu-se novamente a coluna para um novo tubo de 1,5 mL limpo. Abriu-se a coluna e colocou-se 60 μL do buffer AVE a 37°C. Fechou-se a coluna e deixou-se descansar por 60 seg. Passado este tempo, centrifugou-se a 8000 RPM por 60s e finalmente transferiu-se para um tubo de 1,5 mL limpo para a realização da síntese do DNA complementar (cDNA).

- **Síntese de DNA complementar (cDNA)**

A síntese de cDNA foi realizada pela da reação de RT-PCR, utilizando-se reagentes da InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. O volume final da reação foi de 40,1 μL nas seguintes condições: Tampão PCR 1X minus Mg, 0,2mM de dNTP (2,5mM), 5mM de MgCl₂ (50mM), 10⁻³M de DTT, 2,5 μM de iniciadores randômicos, 1 unidade de enzima inibidora de RNase, e 2,5 unidades de enzima Transcriptase Reversa Moloney Murine Leukemia Vírus (M-MLV).

As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos no termociclador 65°C por 5 minutos, 22°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos.

- **Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

Após a etapa de síntese do cDNA, este foi amplificado através da técnica de PCR, utilizando-se reagentes da InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, nas seguintes condições: PCR buffer 1X, 0,2mM de dNTP, 4mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada iniciador

(HC11 e HC18) (quadro 2), 1,25 unidades de Taq DNA polimerase, 5mM de cDNA, para uma reação com volume final de 50µL.

Quadro 2

Iniciadores utilizados na PCR para HCV

Iniciador	SEQUENCE 5'3'	BASES
HC 18	GGTGCACGGTCTACGAGACCT	21
HC 11	GGCGACACTCCACCATAGATCACT	24

O programa que utilizado para a amplificação do cDNA está descrito na quadro 3:

Quadro 3

Programa utilizado na PCR para amplificação do cDNA do HCV para genotipagem

ETAPAS	TEMPERATURA	TEMPO
Desnaturação Inicial	95°C	05 min.
Desnaturação	94°C	30 seg.
Anelamento	55°C	30 seg.
Extensão	72°C	01 min.
Final	72°C	07 min.

} **40 CICLOS**

O produto amplificado pelos iniciadores HC11 e HC18 gerou um fragmento de 308pb da região 5'UTR do genoma do HCV.

- **Purificação dos produtos amplificados**

A purificação dos produtos amplificados foi realizada com a utilização de colunas do kit Microcon Centrifugal Filter Devices-Millipore YM-100 seguindo as seguintes etapas:

Colocou-se uma coluna Microcon-100 dentro de um eppendorf de 1,5mL para cada produto de PCR; Adicionou-se 300 μ L de água destilada e deionizada no topo de cada coluna com cuidado para não tocar na membrana. Colocou-se todo o volume do produto de PCR no centro da coluna sem tocá-la. Centrifugou-se por 15 minutos a 550 xg, à temperatura ambiente. Em seguida inverteu-se a coluna em outro eppendorf de 1,5mL e adicionou-se 35 μ L de água destilada e deionizada no centro da coluna e centrifugou-se por 5 minutos a 650 xg.

- **Quantificação dos produtos de PCR**

Após a purificação, o produto amplificado foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 μ L/mL de brometo de etídeo em tampão TAE (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para tanto, aplicou-se 5 μ L do produto amplificado e purificado juntamente com 5 μ L de Tampão 2X (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 4 μ L do marcador Low DNA Mass Ladder (Gibco).

- **Reação de seqüenciamento**

As reações de seqüenciamento foram realizadas seguindo orientações do kit *Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com volume final de 20 μ L nas seguintes concentrações: 4,4 μ L de Save Money Buffer 5X, 2,0 μ L de Mix Big Dye, 3,2 pmol de iniciador HC11, 100 ng de Template, H₂O qsp 20 μ L.

As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação de temperatura nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, 25 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 45 segundos, 70°C por 1 minuto seguidos de 15 ciclos de 94°C por 25 segundos e 70°C por 2 minutos.

- **Reação de Precipitação**

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada das dNTPs não incorporadas. Foram adicionados 80 μ L de isopropanol 75% ao produto da reação de seqüenciamento e em seguida, foram levadas ao vortex por 15 segundos e incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos sendo centrifugadas “full speed” por 20 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 160 μ L de etanol 80% ao “pellet”. As amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e centrifugou-se novamente “full speed” por 5 minutos. Em seguida, aspirou-se o sobrenadante e secou-se o “pellet” a 45°C por 10 minutos. O “pellet” foi ressuspendido em 4,0 μ L de loading buffer, reagente fornecido no kit *Big Dye*[®] Terminator v3.1 *Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Posteriormente as amostras foram incubadas por 2 minutos a 95°C para desnaturação das fitas de DNA e, imediatamente após a incubação, foram colocadas em banho de gelo até o momento da aplicação no gel, para o seqüenciamento das amostras.

- **Análise das Seqüências**

Foi realizada análise das seqüências obtidas utilizando-se comparação visual com seqüências dos tipos e subtipos virais do HCV (Genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6). As seqüências foram analisadas também pela de comparação com as seqüências depositadas no banco de dados “HCV Los Alamos” no site <http://hcv.lanl.gov>.

3.3.7 Quantificação de citocinas (ELISA)

Foram quantificadas as citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interferon gama (IFN- γ). Foi utilizado o método ELISA para a quantificação destas citocinas seguindo o protocolo preconizado pelo Kit BD OptEIA™ Set Human da BD Biosciences.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços, onde foi colocado 100 μ L/poço de Anticorpos de Captura (Anticorpo primário AC-1°), diluído em tampão de ligação (Carbonato de Sódio 0,1 M) conforme instruções do fabricante. A placa foi envolvida em papel laminado e incubada a 4°C/*overnight*. Após o período de incubação da primeira etapa, lavamos a placa 3 vezes com 300 μ L de tampão de lavagem (PBS + 0,05% de Tween-20%).

Após a lavagem, as placas foram invertidas em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. Em seguida, foi aplicado na placa 200 μ L de tampão de bloqueio (Solução Salina Tamponada de Fosfato - PBS + 10% de Soro Bovino Fetal - SBF) em cada poço e a placa foi incubada por mais 1h a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Durante essa incubação foi preparado a curva padrão para o cálculo da concentração das citocinas na amostra conforme estipulado pelo fabricante no KIT (figura 8). As diluições foram realizadas em microtubos (*eppendorf*) utilizando-se um volume inicial de 500 μ L no primeiro tubo e, em outros 7 tubos, foram adicionados 250 μ L do tampão de bloqueio. Depois de acrescentado o volume exigido de citocina no primeiro tubo, foram transferidos 250 μ L para o próximo tubo, agitando entre cada transferência, até o último tubo completando a diluição seriada.

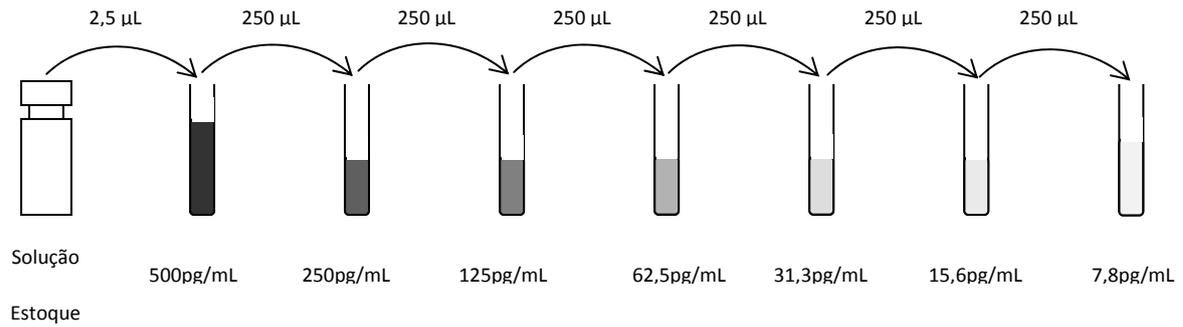


Figura 8 - Esquema da diluição seriada do padrão de citocinas, conforme recomendações do *kit Opteia[™] Set Human* (BD).

Fonte: Catálogo do *kit Opteia[™] Set Human* (BD)

Passada a incubação anterior de 1h, as placas foram lavadas novamente por 3 vezes, com 300 µL de tampão de lavagem e, em seguida, invertidas em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. Em seguida, aplicamos 100 µL de cada tubo da curva padrão, das amostras e controle (tampão de bloqueio) dentro dos poços apropriados, a placa foi novamente incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas. Após as duas horas de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com 300 µL de tampão de lavagem e invertidas em papel absorvente.

Logo em seguida, foram adicionados 100µL da solução de detecção (Anticorpo secundário + enzima SAV-HRP diluídos em tampão de bloqueio conforme instruções do fabricante) em cada poço. Novamente, a placa foi incubada por 1h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação de 1h, as placas foram lavadas por 7 vezes com 300 µL de tampão de lavagem e deixando de molho por 30 segundos a cada lavagem, ao final, foram invertidas em papel absorvente. Em seguida, foi adicionado em cada poço da placa 100 µL de solução substrato TMB e incubou-se por mais 30 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passada esta incubação, adicionamos 50 µL de solução de parada da reação (H₂SO₄ 2N) e fizemos a leitura da placa em espectrofotômetro (ASYS - *Microplate reader* v.1.14) no comprimento de onda de 450 nm.

3.4 Armazenamento, análise estatística e apresentação dos dados

Os resultados das variáveis (identificação do paciente, número do registro no LAC, data do nascimento, data da coleta, sexo, idade, resultado dos testes sorológicos, moleculares e imunológicos) foram armazenados e analisados no programa Epi-Info versão 3.5.1 para Windows[®] e os gráficos foram confeccionados pelo programa Prisma[®] versão 4.0 e Excel[®] 2007. O nível de significância fixado para os testes foi de 5%.

Para a apresentação dos dados foram utilizados gráficos e tabelas de frequências, nas análises das medidas de tendência central e variabilidade. Utilizou-se a média aritmética e o desvio padrão quando os dados encontravam-se normalmente distribuídos por meio do teste de Bartlett, quando não satisfeita a hipótese de normalidade utilizou-se a mediana. Na análise da carga viral e citocinas os valores foram transformados utilizando logaritmo devido a não normalidade. Na análise dos dados paramétricos utilizou-se o teste t de Student, e nos dados não paramétricos utilizou-se o teste Mann-Whitney. Na análise da correlação utilizou-se o coeficiente de Pearson e o teste T para testar a hipótese de correlação (VIEIRA, 2004).

3.5 Considerações Éticas

Este estudo somente foi iniciado após a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM, obedecendo às diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, a Resolução 196 de 10 de outubro de 1996. Os resultados de todos os pacientes envolvidos na pesquisa foram encaminhados para o setor responsável pelo atendimento deles no HEMOAM, onde foram todas as medidas necessárias para a melhor informação dos pacientes.

4. RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

Foram estudados 78 pacientes hemofílicos, todos do sexo masculino, que compareceram a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas no período de janeiro a dezembro de 2008 e que aceitaram participar do estudo. Os pacientes estudados apresentaram média de idade de $19,5 \pm 11,4$ anos (intervalo de 2 a 52 anos) e foram distribuídos em dois grupos: um com idade igual ou acima de 18 anos e outro com idade abaixo de 18 anos, como demonstrado no gráfico 1.

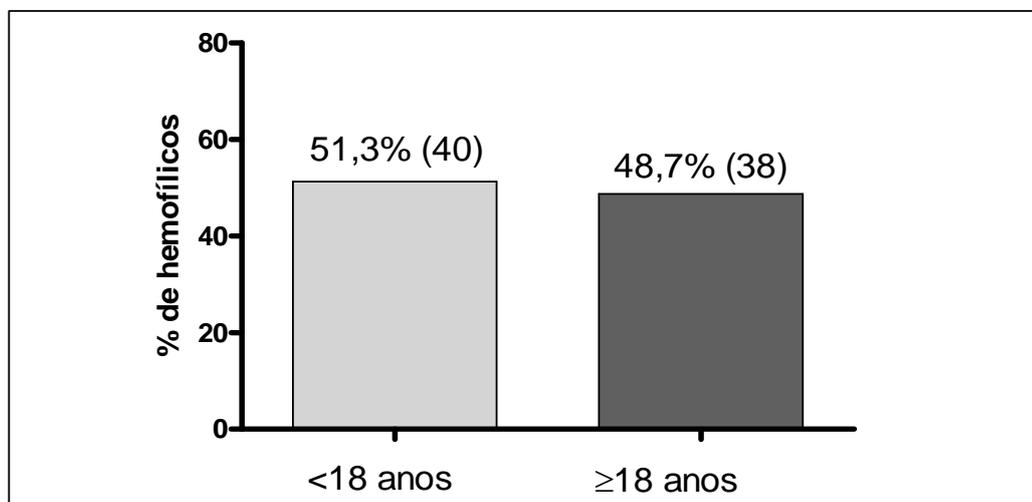


Gráfico 01- Percentual de pacientes hemofílicos com idades abaixo e acima de 18 anos que participaram do estudo. A média de idade foi de $19,5 \pm 11,4$ anos.

4.2 Soroprevalência de doenças infecciosas transmitidas pelo sangue

As análises sorológicas para anticorpos contra HIV, HCV, HTLV, HBV, *Trypanossoma cruzii* (Doença de chagas) e Sífilis estão demonstradas no gráfico 2. Nenhum dos pacientes estudados apresentou reatividade nos exames sorológicos para HIV, HTLV, doença de Chagas ou Sífilis. No entanto, dos 78 pacientes estudados, 30,8% (24) apresentaram reatividade para anticorpos anti-HCV. As amostras também foram testadas para anticorpos anti-HBc e como podemos observar no gráfico 2, obteve-se uma prevalência de 19,2%.

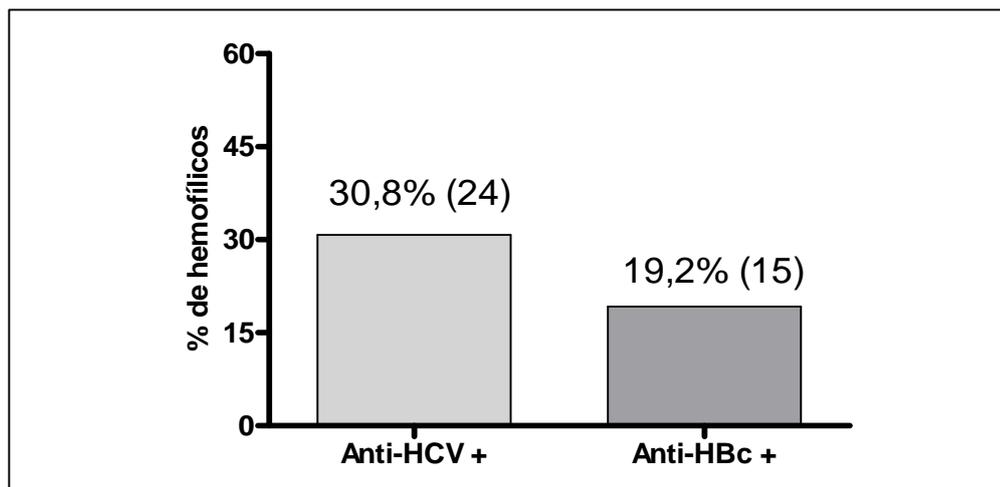


Gráfico 02- Percentual de pacientes hemofílicos que apresentaram reatividade para os anticorpos Anti-HCV e Anti-HBc pelo teste ELISA. A prevalência de Anti-HCV foi de 30,8% (24) e de Anti-HBc foi de 19,2% (15).

Como mostra a tabela 1, ao analisarmos a co-reatividade de anticorpos anti-HCV e anti-HBc, dos 24 (30,8%) pacientes com anticorpos Anti-HCV reativos, 12 (50,0%) também apresentaram reatividade para Anti-HBc. Enquanto que nos pacientes que não apresentaram reatividade para anti-HCV 54 (69,2%) um total de 3 (5,6%) pacientes apresentaram anticorpos anti-HBc reativos.

Tabela 1

Frequência da co-reatividade para anticorpos Anti-HCV e Anti-HBc pelo ELISA no soro dos pacientes hemofílicos estudados.

Anti-HCV	Anti-HBc				Total
	Reativo (+)		Não reativo (-)		
	n	%	n	%	
Reativo (+)	12	50	12	50	24
Não Reativo (-)	3	5,6	51	94,4	54
Total	15	19,2	54	80,8	78

A idade é um dos fatores importantes na soroconversão dos pacientes infectados pelo HCV. Desta forma, como demonstra o gráfico 3, ao associarmos a idade dos pacientes estudados com a prevalência dos anticorpos anti-HCV, verificamos que nenhum dos pacientes com idade abaixo de 18 anos apresentou reatividade, já nos pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, a prevalência de anti-HCV foi de 63,2% e de anti-HBc de 39,5%.

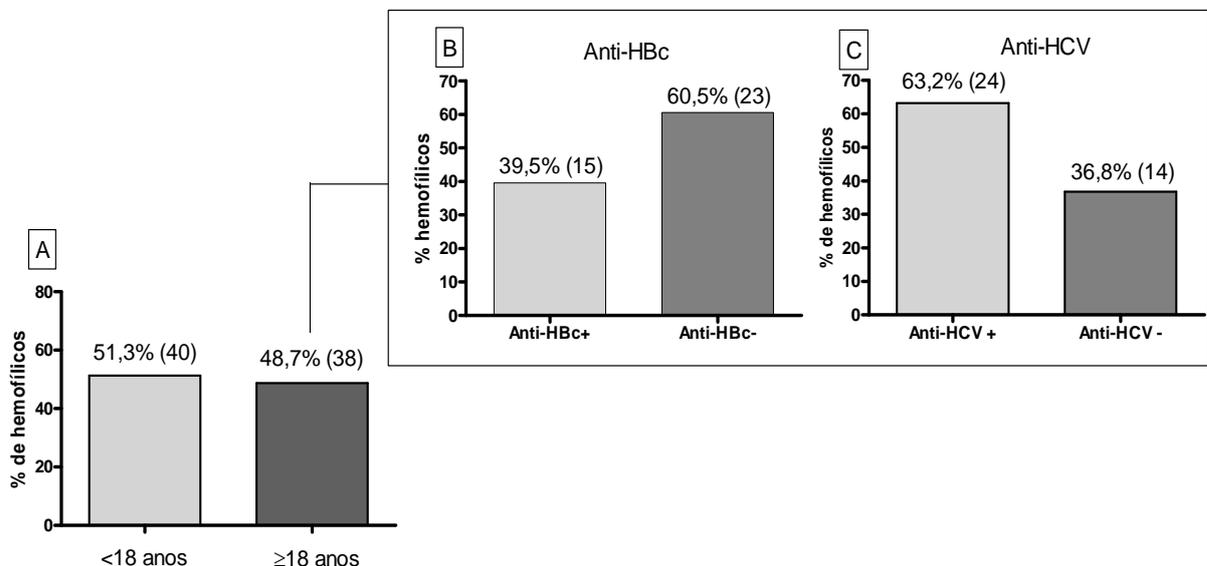


Gráfico 3- Percentual de hemofílicos com idade igual ou maior que 18 anos que apresentaram reatividade para anticorpos anti-HCV e anti-HBc em comparação com os pacientes com idade abaixo de 18 anos que não apresentaram soropositividade para nenhum destes anticorpos. O gráfico 3A mostra o percentual de hemofílicos com idade abaixo ou acima de 18 anos, o gráfico 3B mostra a prevalência de anti-HBc e o gráfico 3C mostra a prevalência de anti-HCV nos hemofílicos com idade igual ou maior a 18 anos.

As amostras que tiveram sorologia reativa no ELISA para anticorpos anti-HCV foram testados pelo teste complementar de Imunoblot. A tabela 2 mostra a distribuição da reatividade relacionada as bandas deste teste. Como podemos observar, 96% foram reativos para NS3 (c33c) e a proteína do core do vírus (c22p), enquanto que 83% foram reativos para NS4 (C100). Também observamos baixa reatividade para NS5, com apenas 58,3% de reatividade.

Tabela 2

Perfil de bandas de anticorpos para proteínas virais do HCV feito pelo teste complementar Imunoblot em pacientes hemofílicos com sorologia anti-HCV reativa no ELISA.

	Bandas			
	NS4 (C100)	NS3 (c33c)	Core (c22p)	NS5
Hemofílicos %	83%	96%	96%	58,3%

4.3 Concentrações de Alanina Amino-transferases (ALT) e Aspartato Amino-transferases (AST)

Como mostra o gráfico 4, foi feita uma comparação para das concentrações de alanina aminotransferase (ALT) entre os pacientes hemofílicos anti-HCV não reativos e anti-HCV reativos. Os valores de AST e ALT foram analisados por comparação das medianas utilizando o teste Mann-Whitney. As concentrações de AST (Gráfico 4A) nos pacientes Anti-HCV não reativos tiveram mediana de 23 UI/mL e os pacientes Anti-HCV reativos apresentaram mediana de 28,5 UI/mL. Já as concentrações de ALT (Gráfico 4B) nos pacientes Anti-HCV não reativos tiveram uma mediana de 14 UI/mL e nos pacientes Anti-HCV reativos, a mediana foi de 32,5 UI/mL. As diferenças foram estatisticamente significantes.

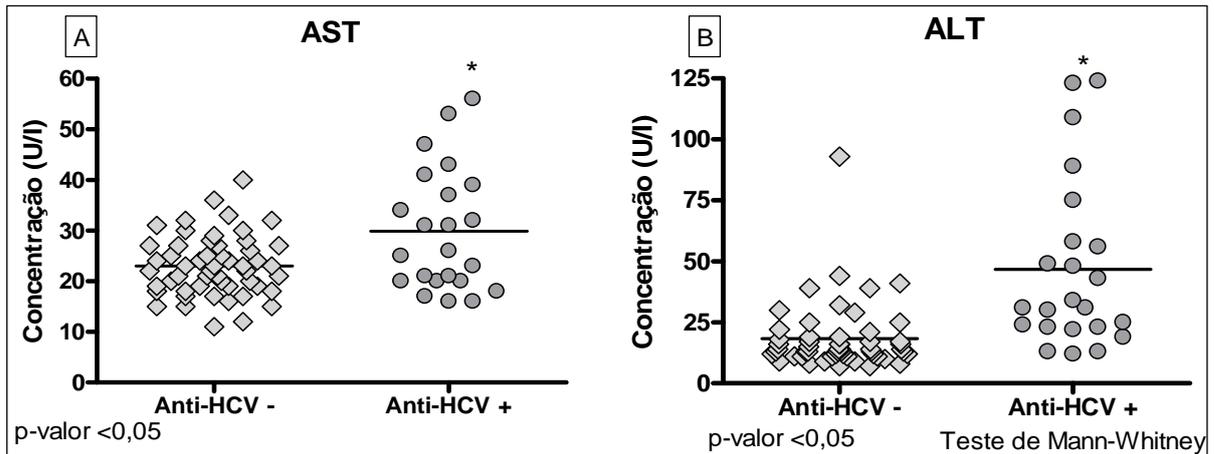


Gráfico 4 - Comparação das concentrações de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) em hemofílicos. Os dados apresentaram diferença estatística significativa nas duas análises ($p < 0,05$). Método estatístico utilizado – Mann-Whitney. O gráfico A e o gráfico B representam as concentrações de AST e ALT respectivamente.

4.4 Análise de populações de leucócitos no sangue periférico dos hemofílicos

Na tabela 3, mostramos as análises do perfil celular, pelo hemograma, dos pacientes hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos Anti-HCV, onde estão descritos os valores das médias, desvios padrões, medianas, os testes estatísticos utilizados e o p-valor. As populações celulares analisadas não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos. No gráfico 5, podemos visualizar o perfil celular onde fica nítida a distribuição homogênea entre as populações de leucócitos totais (gráfico 5A), linfócitos (gráfico 5B), eosinófilos (gráfico 5C), neutrófilos (gráfico 5D) e monócitos (gráfico 5E).

Tabela 3

Perfil de sub-populações de leucócitos do sangue periférico dos pacientes hemofílicos

Variáveis	Anti-HCV -			Anti-HCV +			p-valor
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
¹ Leucócitos totais	7,7	2,4	7,45	6,9	1,5	7,1	p>0,05
² Linfócitos	32,3%	8,0%	32,0%	30,1%	10,4%	28,5%	p>0,05
² Monócitos	5,3%	3,1%	5,0%	6,2%	3,3%	6,8%	p>0,05
² Eosinófilos	7,9%	5,8%	6,0%	5,4%	5,4%	4,0%	p>0,05
² Neutrófilos	54,4%	10,1%	54,0%	58,1%	9,7%	58,8%	p>0,05

¹Teste de Mann-Whitney

²Teste t de Student

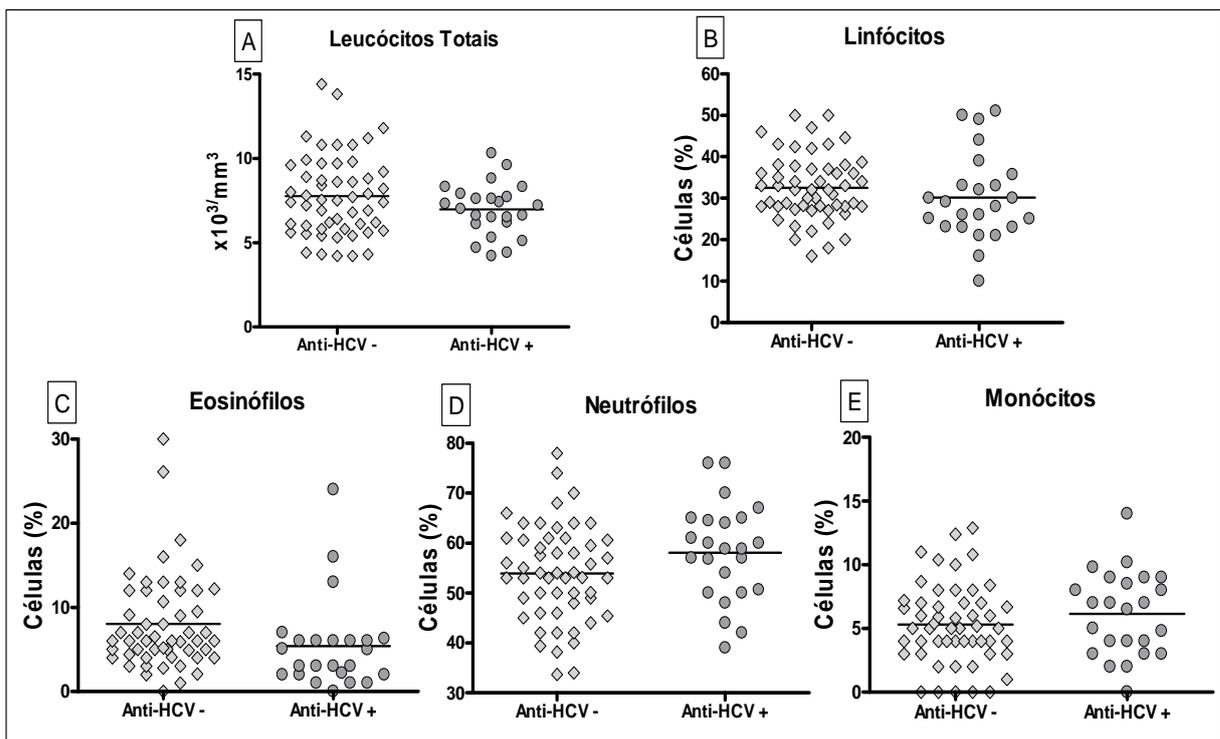


Gráfico 5 – Percentual das sub-populações e quantidade de leucócitos no sangue periférico de hemofílicos com sorologia para Anti-HCV não reativa e Anti-HCV reativa. Nenhuma das populações apresentaram diferenças estatísticas significativas (p>0,05). Gráfico A – leucócitos totais, Gráfico B – Linfócitos, Gráfico C – Eosinófilos, Gráfico D – Neutrófilos e Gráfico E – Monócitos.

4.5 Análise das sub-populações de linfócitos T por citometria de fluxo.

No gráfico 6, demonstramos a frequência de populações de linfócitos TCD3⁺/CD4⁺ (gráfico 6A) e LTCD3⁺/CD8⁺ (gráfico 6B) no sangue periférico de hemofílicos com sorologia reativa e não reativa para anticorpos anti-HCV. No gráfico 6C, está a comparação da relação LTCD4⁺/LTCD8⁺ entre os grupos. Os dados foram analisados utilizando o teste de t de Student. Os Linfócitos TCD3⁺/CD4⁺ (gráfico 6A) tiveram mediana de 34,3% nos pacientes anti-HCV reativos e 34,0% nos não reativos, não havendo diferença estatística significativa. A quantidade de Linfócitos TCD3⁺/CD8⁺ (gráfico 6B) entres os hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com mediana de 25,9% e 22,3% respectivamente. A relação de LTCD4⁺/CD8⁺ não apresentou diferença entre as populações de hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos.

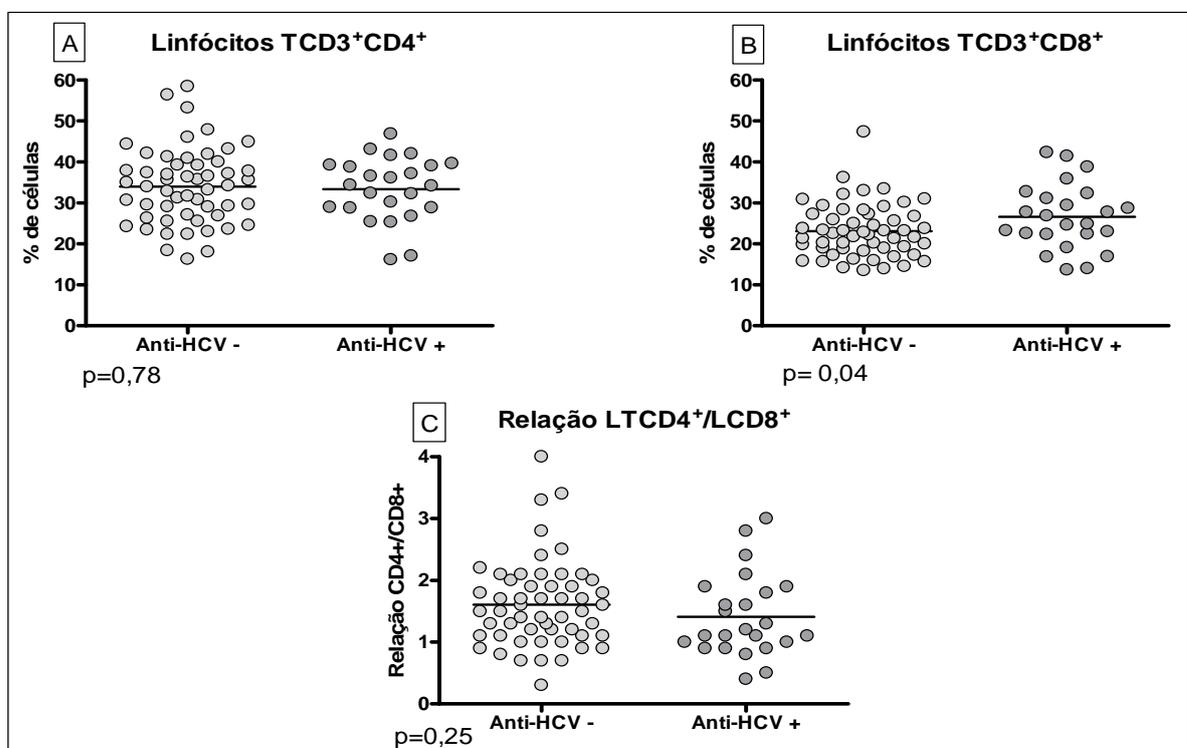


Gráfico 6 – Distribuição das populações de linfócitos LTCD3⁺/CD4⁺ (A), LTCD3⁺/CD8⁺ (B) e da relação LTCD4⁺/CD8⁺ (C) no sangue periférico de pacientes hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV (Teste t de Student).

4.6 Análise das populações de leucócitos CD69⁺ por citometria de fluxo

A distribuição da população de leucócitos: linfócitos CD69⁺ (gráfico 7A), neutrófilos CD69⁺ (gráfico 7B) e monócitos CD69⁺ (gráfico. 7C) não demonstraram diferença estatística significativa entre os hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV, quando analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Mas quando comparamos o percentual de eosinófilos CD69⁺, observamos um maior percentual de eosinófilos ativados nos pacientes hemofílicos com anticorpos anti-HCV reativos em relação aos anti-HCV não reativos, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (gráfico 7D). Na tabela 4, estão descritos os valores das médias, desvios padrões, medianas e os testes estatísticos utilizados na população hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos para análise dos leucócitos CD69⁺.

Tabela 4

Perfil das populações de leucócitos CD69⁺ no sangue periférico dos pacientes hemofílicos

Leucócitos CD69 ⁺	Anti-HCV -			Anti-HCV +			p-valor
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
¹ Linfócitos	7,5%	2,5	7,2%	9,4%	4,5	8,1%	$p > 0,05$
¹ Monócitos	9,2%	4,6	8,4%	10,2%	3,1	10,3%	$p > 0,05$
² Eosinófilos*	7,3%	3,5	6,1%	10,8%	4,8	9,5%	$p < 0,05$
¹ Neutrófilos	5,6%	4,7	4,6%	4,6%	3,3	3,8%	$p > 0,05$

¹Teste de Mann-Whitney

²Teste T de Student

*Estatisticamente significativa

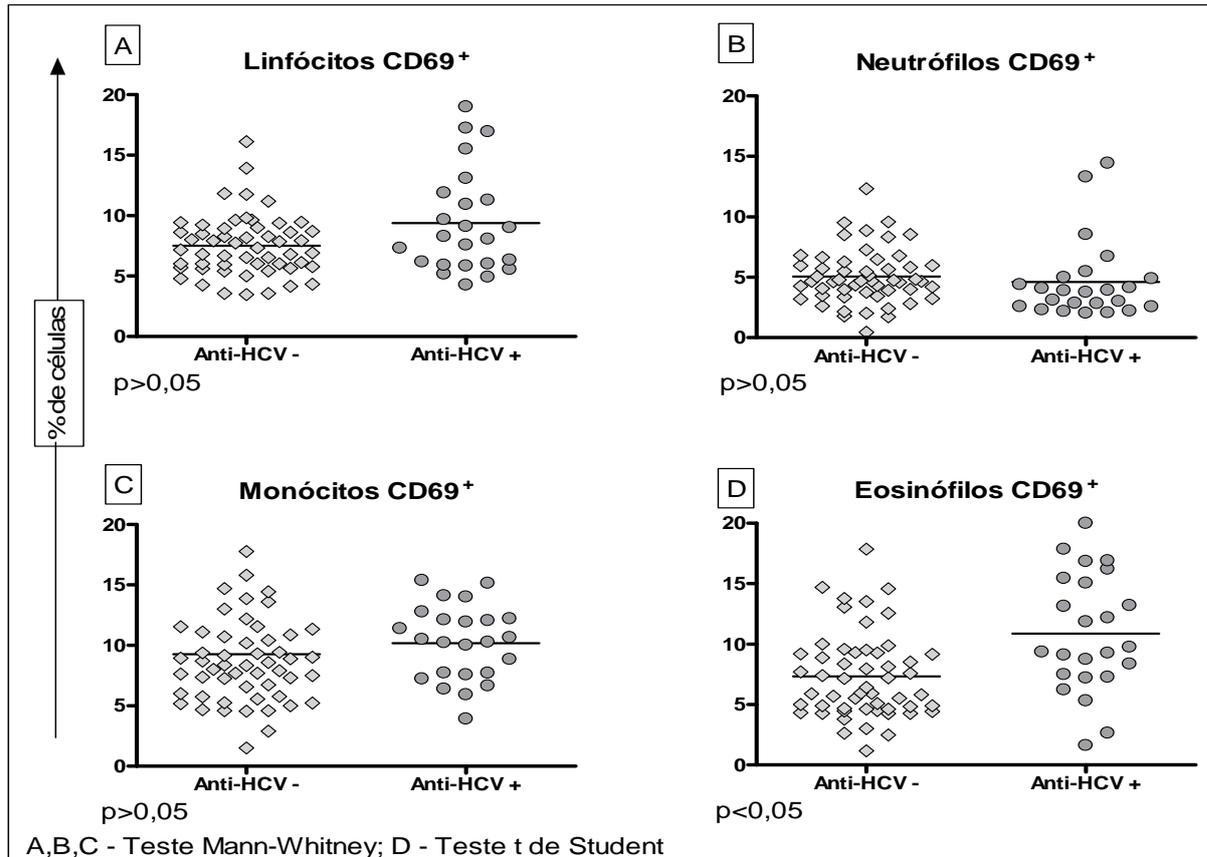


Gráfico 7 - Percentual das sub-populações de leucócitos ativados - linfócitos CD69⁺ (A), neutrófilos CD69⁺ (B), monócitos CD69⁺ (C) e eosinófilos CD69⁺ (D) no sangue periférico de pacientes hemofílicos com sorologia reativa e não reativa para anticorpos anti-HCV.

4.7 Análises das concentrações de citocinas séricas nos pacientes hemofílicos.

4.7.1 Citocina Th2 e supressora: IL-4 e IL-10

O gráfico 8A demonstra as concentrações séricas da citocina IL-4 na população de hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos. Os grupos foram comparados utilizando o teste t de Student e apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), mostrando que os hemofílicos com sorologia reativa para anti-HCV apresentaram concentrações maiores de IL-4 ($5,2 \pm 5$ pg/mL) do que nos hemofílicos anti-HCV não reativos ($2,2 \pm 3$ pg/mL).

Já as concentrações séricas de IL-10 (Gráfico 8B), apesar de terem apresentado média maior na população de hemofílicos anti-HCV reativos, não houve diferença estatística

significante ($p > 0,05$) entre os grupos anti-HCV reativos ($7,9 \pm 6$ pg/mL) e não reativos ($5,5 \pm 5$ pg/mL).

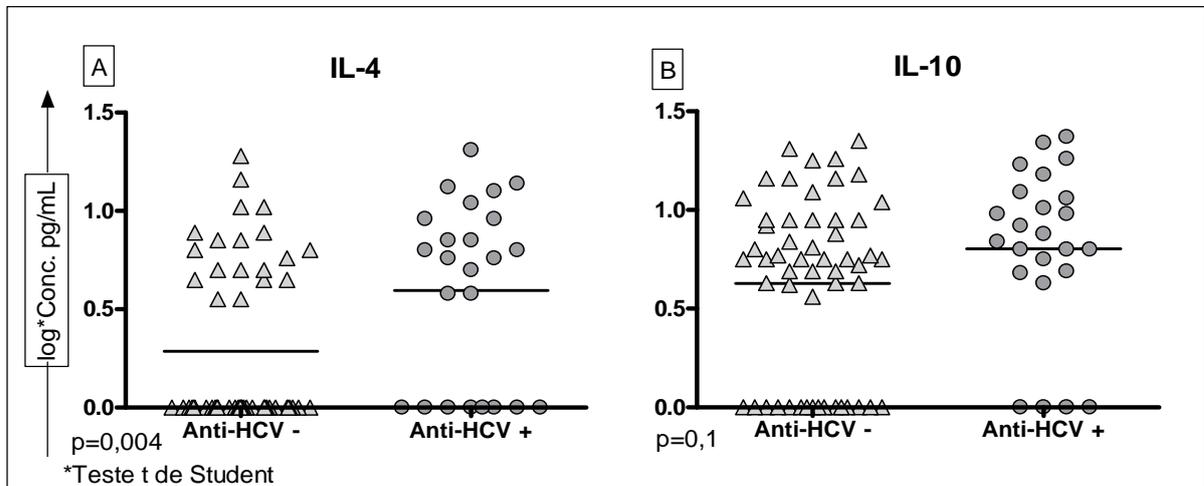


Gráfico 8 - Comparação das concentrações séricas de IL-4 (A) e IL-10 (B) entre os pacientes hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV. As concentrações de IL-4 foram maiores nos hemofílicos com anticorpos anti-HCV e as concentrações de IL-10 não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

4.7.2 Citocinas pró-inflamatórias: IL-6, IL-8 e TNF- α

Como podemos observar no gráfico 9, não houve diferença estatística significativa nas concentrações de IL-6 (Gráfico 9A) entre os hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV, apresentando média de $5,3 \pm 15$ e $3,1 \pm 4$ pg/mL respectivamente. As citocinas IL-8 (Gráfico 9B) e TNF- α (Gráfico 9C) também não apresentaram diferenças estatísticas entre estes grupos. A IL-8 teve uma concentração média de $9,2 \pm 9$ pg/mL nos hemofílicos anti-HCV reativos e $8,6 \pm 10$ pg/mL nos não reativos para os anticorpos anti-HCV, demonstrando uma tendência maior nos hemofílicos anti-HCV reativos, enquanto que o TNF- α teve uma concentração média de $6,6 \pm 9$ pg/mL nos hemofílicos anti-HCV reativos e $5,6 \pm 9,5$ pg/mL nos não reativos.

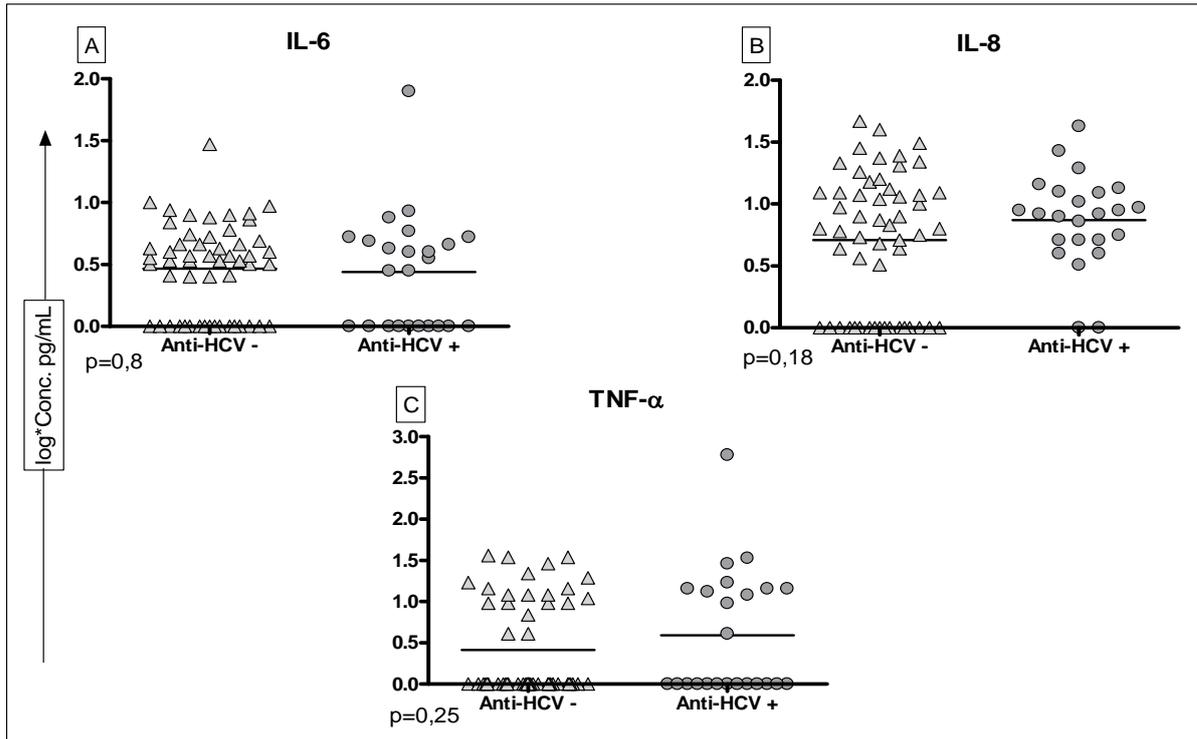


Gráfico 9 - Comparação das concentrações séricas de IL-6 (A), IL-8 (B) e TNF- α (C) entre os pacientes hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV. As concentrações destas citocinas não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Teste t de Student).

4.7.3 Citocinas Th1: IL-12 e IFN- γ

O gráfico 10 demonstra as concentrações das interleucinas Th1: IL-12 (Gráfico 10A) e IFN- γ (Gráfico 10B). As concentrações de IL-12 não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as populações de hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV. Por outro lado, as concentrações de IFN- γ apresentaram valores maiores nos hemofílicos anti-HCV reativos. O teste utilizado para análise estatística, para ambas citocinas, foi o teste t de Student.

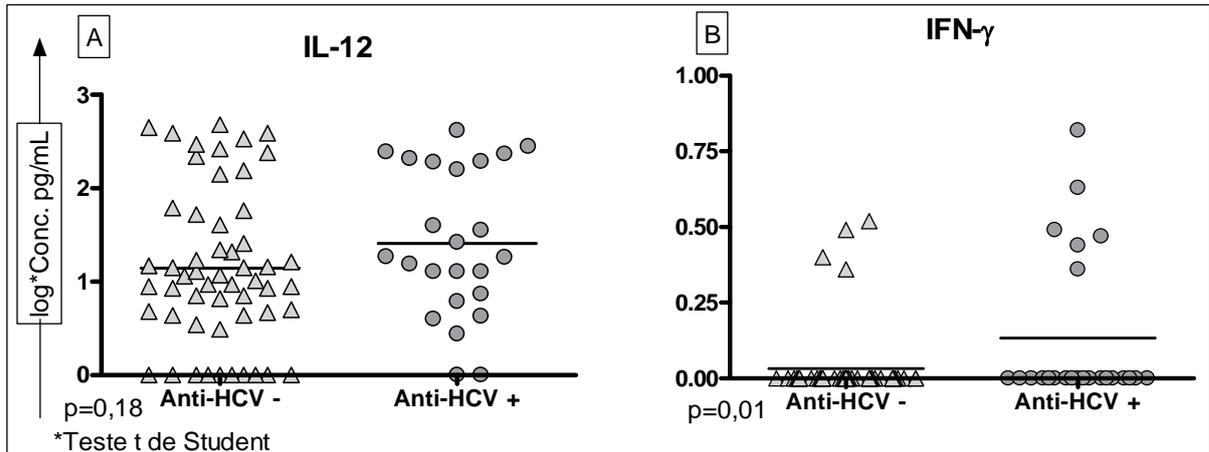


Gráfico 10 - Comparação das concentrações séricas de IL-12 (A) e IFN- γ (B) entre os pacientes hemofílicos com e sem sorologia reativa para anticorpos anti-HCV. As concentrações de IL-12 não apresentaram diferenças e as de IFN- γ foram maiores nos hemofílicos reativos quando comparados aos com sorologia não reativa para anticorpos anti-HCV.

4.8 Distribuição dos genótipos e carga viral nos pacientes hemofílicos

Nos 24 hemofílicos que apresentaram sorologia reativa para anticorpos anti-HCV, foi quantificada a carga viral do HCV presente e em seguida foi feita a genotipagem para a identificação dos genótipos virais. Destes hemofílicos, 33,4% (8) apresentaram carga viral no PCR quantitativo abaixo de 600 cópias/mL, enquanto que 37,5% (9) apresentaram carga viral entre 600 - 1 Milhão cópias/mL e 29,1% (7) acima de 1 Milhão cópias/mL (Gráfico 11).

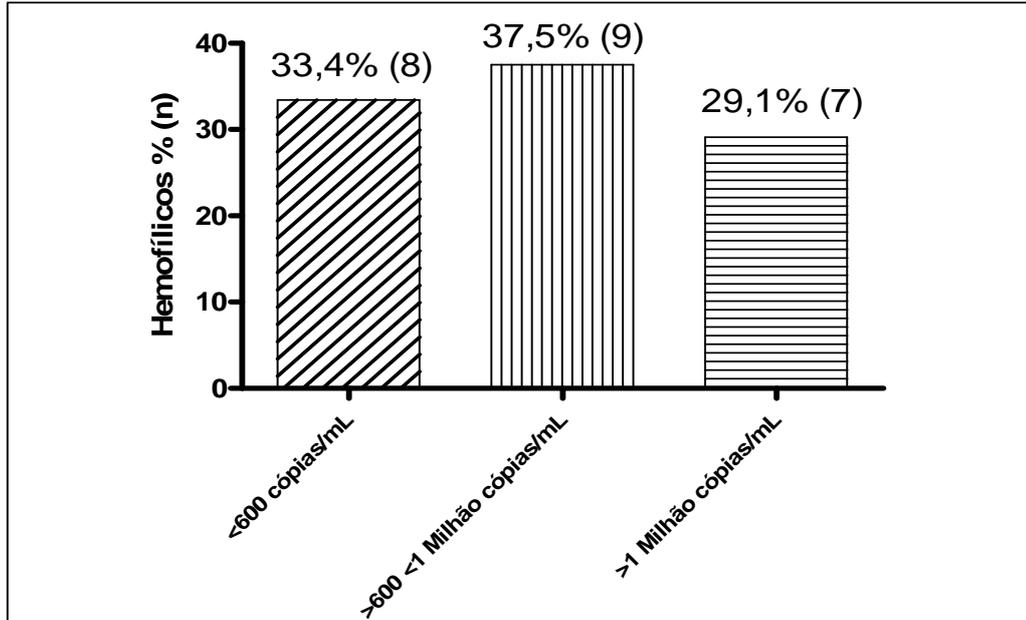


Gráfico 11 – Percentual de hemofílicos reativos para anticorpos anti-HCV que apresentaram carga viral no PCR quantitativo.

Dos 24 hemofílicos que apresentaram sorologia reativa para anticorpos anti-HCV, 16 apresentaram carga viral detectável (>600 cópias/mL), sendo que quando foi feita a PCR qualitativa para a genotipagem, apenas 62,5 % (10) dos pacientes amplificaram. Por problemas técnicos, apesar da alta carga viral nestes pacientes, foi possível genotipar somente 40% (4) das amostras amplificadas, como demonstrado na figura 9.

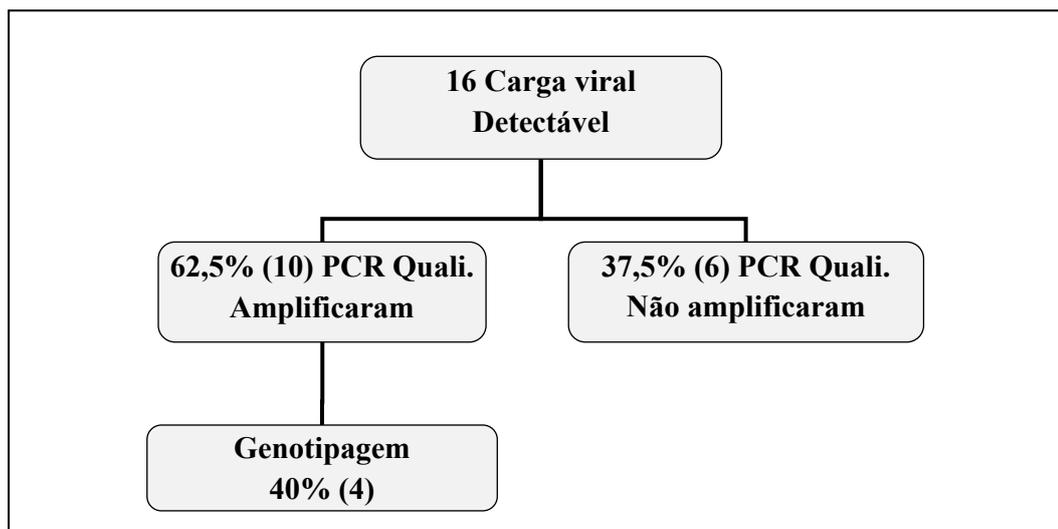


Figura 9 – Fluxograma dos resultados das análises de PCR quantitativo, PCR qualitativo e hemofílicos com sorologia positiva para anticorpos Anti-HCV que foram genotipados.

Nas amostras HCV positivas dos pacientes genotipados, 2 (50%) tinham o genótipo 1 e 2 (50%) tinham o genótipo 3. Na tabela 5, está demonstrada a relação dos genótipos encontrados com suas respectivas cargas virais.

Tabela 5

Demonstração dos genótipos encontrados e suas cargas virais em pacientes hemofílicos

Hemofílicos	Genótipo	Carga viral (cópias/mL)
01	1	9.001.684
02	1	3.966.026
03	3	10.557.000
04	3	72.450.000

4.9 Análise da correlação

4.9.1 Correlação entre carga viral (CV) do HCV e transaminases (AST e ALT) presente no sangue de pacientes hemofílicos

Analisando a correlação da carga viral com a concentração de AST (Gráfico 12A) no sangue dos pacientes hemofílicos podemos verificar que não houve uma diferença estatística significativa ($r=0,49$; $p=0,057$), apesar de podermos visualizar uma tendência da concentração de AST aumentar de acordo com a carga viral. Mas ao correlacionarmos as concentrações de ALT e carga viral de HCV (Gráfico 12B), podemos notar que houve correlação estatística significativa ($r= 0,56$; $p=0,028$), isto é, o aumento da carga viral do HCV está relacionado com o aumento de AST nos hemofílicos infectados.

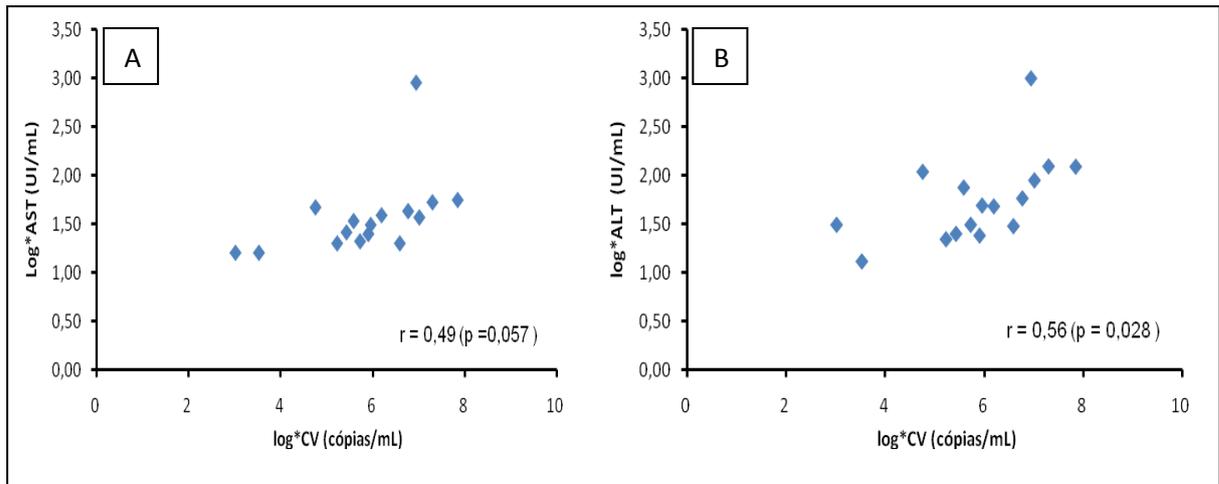


Gráfico 12 – Correlação da carga viral (CV) do HCV com a concentração das transaminases pelo coeficiente de Pearson e a análise pelo teste t. O gráfico A mostra a correlação de AST e o gráfico B mostra a correlação de ALT e carga viral do HCV nos hemofílicos.

4.9.2 Correlação entre carga viral (CV) do HCV e as citocinas

Com o objetivo de melhor compreendermos a resposta imune nos hemofílicos infectados pelo HCV, analisamos a correlação entre a carga viral e as citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α . Sendo que somente a correlação com as citocinas IL-4 e IL-10 foram estatisticamente significantes. O IFN- γ apesar de ter apresentado valores maiores nos pacientes com sorologia reativa para anticorpos anti-HCV, não apresentou correlação estatística significativa com a carga viral do HCV. Para as demais citocinas estudadas, como não se observou correlação com significância estatística, os gráficos não foram apresentados.

- **IL-4, IL-10 e IFN- γ**

Como podemos observar no gráfico 14, houve correlação de IL-4 (Gráfico 13A) e IL-10 (Gráfico 13B) com a carga viral do HCV nos pacientes hemofílicos, que foi estatisticamente significativa ($r=0,504$; $p=0,046$) e ($r=0,583$ e $p=0,023$), respectivamente.

Demonstramos que o aumento destas citocinas está relacionado com o aumento da carga viral do HCV no sangue destes pacientes.

As concentrações de IFN- γ foram maiores nos hemofílicos com anticorpos anti-HCV, no entanto, ao correlacionarmos a carga viral do HCV com a concentração de IFN- γ no sangue periférico dos pacientes hemofílicos, não houve nenhuma correlação com significância estatística desta citocina com a carga viral dos HCV destes pacientes ($r=0,159$; $p=0,558$). Entretanto podemos notar que houve uma tendência de aumento do IFN- γ relacionado com esta carga viral. A correlação do IFN- γ com a carga viral do HCV está demonstrada no gráfico 13C.

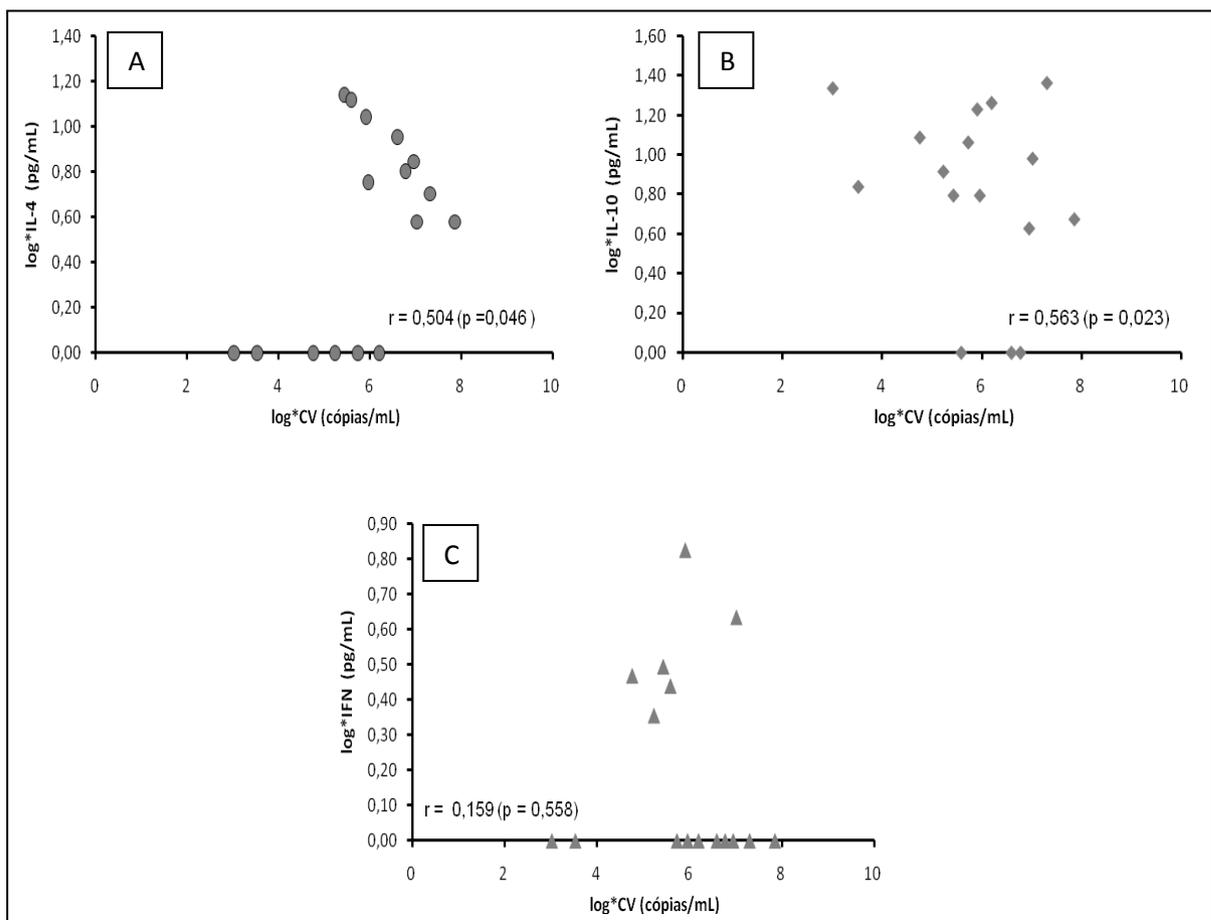


Gráfico 13 – Correlação da carga viral (CV) do HCV e concentração das citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ pelo coeficiente de Pearson e análise pelo teste t. O gráfico A mostra a correlação de IL-4, o gráfico B mostra a correlação de IL-10 e o gráfico C mostra a correlação IFN- γ com a carga viral do HCV.

5. DISCUSSÃO

A hepatite C é uma doença crônica, de evolução lenta e é uma das principais infecções a que os hemofílicos estão sujeitos. Portanto, neste trabalho, apresentamos possíveis alterações hepáticas e imunológicas causadas pelo HCV nesta população. É importante ressaltar que todos os hemofílicos estudados e diagnosticados para infecção pelo HCV neste trabalho, relataram nunca terem sido tratados para esta infecção.

5.1 Soroprevalência de doenças infecciosas transmitidas pelo sangue nos hemofílicos

Na população de hemofílicos estudada, não encontramos nenhum hemofílico com sorologia reativa para HIV, HTLV, doença de Chagas e sífilis. No entanto, alguns autores já demonstraram que os hemofílicos estão sujeitos a estas infecções. Silva et al. (2005), no Estado da Bahia, demonstraram em 208 hemofílicos uma prevalência de 10,4% para anticorpos anti-HIV, 3,7% de anti-HTLV, 4,1% de anticorpos contra *Trypanossoma cruzii* (Doença de chagas) e 1,1% para anticorpos contra *Treponema palidum* (Sífilis). Apesar de nossos pacientes não terem apresentado infecções para estes patógenos, é possível que, se trabalhássemos com uma população maior de hemofílicos, principalmente com aqueles que nasceram nos anos 80, encontraríamos uma prevalência maior para estas doenças.

Entretanto, a prevalência de anti-HCV entre os hemofílicos estudados foi de 30,8%, os quais se assemelharam ao trabalho realizado por Carmo et al. (2002) que estudaram 469 hemofílicos no Banco de Sangue de Minas Gerais, e demonstraram uma prevalência de 44,6% de anticorpos anti-HCV. Já Barbosa et al. (2002) encontraram uma prevalência maior (63,3%) na população de hemofílicos de Goiânia-GO.

Em nosso trabalho, encontramos ainda uma prevalência de 19,2% de pacientes anti-HBc, que foi menor do que a encontrada por Martins et al. (2004), em trabalho com 102 hemofílicos de Goiânia-GO, onde demonstraram uma prevalência de 37,2% . Em outros trabalhos, também já foram observadas altas taxas de prevalência de anti-HBc entre a população de hemofílicos, como as encontradas por Windyga et al. (2008) e Wharfe et al. (2002), que encontraram 54,4% e 36% respectivamente.

Apesar de nossos dados de prevalência de anti-HCV e anti-HBc em pacientes hemofílicos terem sido menores do que em outros trabalhos, eles mostram que os hemofílicos são um grupo que apresenta grandes chances de contaminação pelo HCV e HBV, principalmente, aqueles com idade acima de 18 anos.

Os hemofílicos, que tomaram fatores de coagulação ou receberam transfusões sanguíneas antes de 1992, possuem uma probabilidade maior de infecção pelo HCV, pois nesta época não havia sido implantado, no Banco de Sangue do Amazonas, a triagem sorológica para anticorpos anti-HCV. Isto ficou demonstrado quando analisamos os dados de idade relacionados com a prevalência dos anticorpos anti-HCV (Gráfico 3), onde se observou que nenhum hemofílico com idade abaixo de 18 anos apresentou sorologia reativa para anti-HCV, enquanto que, nos pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, a prevalência foi de 63,2%. Estes dados estão de acordo com trabalho feito por Silva et al. (2005), que verificaram que após a implantação dos testes sorológicos para anti-HCV, em 1992, houve diminuição dos casos de pacientes hemofílicos reativos para anti-HCV, e nos hemofílicos com idade acima de 19 anos, a prevalência foi de 70%. Dados semelhantes foram descritos ainda por Windyga et al. (2008), onde observaram que nos hemofílicos nascidos até 1990, a prevalência foi de 95% e nos nascidos na década de 90, a prevalência foi de 68%.

O mesmo aconteceu com os hemofílicos com sorologia reativa para anti-HBc, onde nenhum dos participantes abaixo de 18 anos apresentou reatividade, enquanto que naqueles com idade igual ou superior a 18 anos a prevalência foi de 39,5%.

Analisando a co-infecção anti-HCV e anti-HBc nos hemofílicos estudados, observou-se uma prevalência de 50,0%. Nossos dados corroboram os de Carmo et al. (2002) que mostraram uma taxa de co-infecção anti-HCV-HBc acima de 50% na população de hemofílico.

5.2 Concentração de ALT e AST entre os hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV

Nossos dados demonstram que as concentrações de ALT e AST nos pacientes hemofílicos com sorologia reativa para anticorpos anti-HCV foram estatisticamente maiores do que nos hemofílicos não reativos, o que pode estar indicando um comprometimento hepático devido ao HCV. Dados da literatura relataram que uma das formas de avaliar a evolução da hepatite C, em pacientes infectados pelo HCV, seria pela análise bioquímica das transaminases (ALT e AST) (OLUT et al 2005; GOUVEIA et al, 2004). Estes autores sugerem que o aumento destas enzimas estão relacionadas com um comprometimento hepático maior. Alguns autores demonstraram, em trabalho realizado em Maringá-PR com 69 hemofílicos, o aumento da AST em 10,1% e da ALT em 11,6% dos pacientes hemofílicos com HCV (FERREIRA et al., 2008). Enquanto que, em estudo realizado por Messik et al. (2001), com 272 pacientes hemofílicos, foi observado no grupo de hemofílicos com infecção pelo HCV, uma prevalência de 70% de ALT elevada, enquanto que nos hemofílicos HCV negativos os valores de ALT apresentavam-se normais. Dados observados por estes autores estão de acordo com os achados em nosso estudo e descritos anteriormente. Diferentemente

do relato em nosso estudo, Carmo et al. (2002), não encontraram aumento de ALT em hemofílicos infectados pelo HCV. Dados do nosso grupo de pesquisa, em trabalho com doadores de sangue anti-HCV reativos, também não demonstraram concentrações de ALT alteradas quando comparadas com o grupo controle (USUI, 2007).

A importância de avaliar, na infecção pelo HCV, as concentrações de ALT, é afirmada em trabalho feito por Buut et al. (2007), que demonstraram que pacientes, com longo tempo de infecção, apresentaram alta concentração de ALT, e conseqüentemente, maior chance de desenvolver uma doença hepática.

5.3 Análises das populações de leucócitos no sangue periférico dos hemofílicos

As alterações na contagem de leucócitos podem ser um indicativo de que o sistema imune está reagindo a alguma infecção. Nossos dados mostram que a contagem de leucócitos totais em pacientes hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos Anti-HCV não tiveram diferenças estatísticas significantes, o mesmo acontecendo com a contagem específica das sub-populações dos Leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos). O HCV gera uma infecção crônica com progressão muito lenta e isto pode explicar os valores não alterados na população de hemofílicos anti-HCV reativos.

5.4 Análise das populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺)

A infecção pelo HCV causa uma interação entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro, que representa um importante papel no controle viral e na patogênese da doença. Na medida em que a infecção viral progride, a resposta imune do hospedeiro é ativada e ocorre o aparecimento dos linfócitos TCD4⁺ e dos Linfócitos TCD8⁺ (KAPLAN et al., 2007).

Os Linfócitos TCD4⁺ desempenham múltiplas funções efetoras, incluindo a ativação direta de macrófagos e linfócitos B, assim como ativação de linfócitos TCD8⁺ (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2005). Estas células têm efeito direto na eliminação de células infectadas, por mecanismos citolíticos e não citolíticos, tendo dois efeitos distintos, um levando o paciente ao “clearance viral” e o outro aumentando o comprometimento hepático pela destruição dos hepatócitos (KAPLAN et al., 2007).

Em nossas análises comparamos as populações de LTCD4⁺ e LTCD8⁺ entre os pacientes hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV. A população de LTCD4⁺ não apresentou diferença entre os dois grupos, o que pode ser explicado pela baixa capacidade do HCV em estimular a proliferação destas células. Este fato pode ser observado no trabalho realizado por Semmo et al. (2006), que demonstraram que os linfócitos TCD4⁺ específicos para o HCV destes pacientes não possuíam capacidade proliferativa, em estudo “*ex-vivo*”. Já em trabalho realizado por Zhang et al. (2005), foi observado que os LTCD4⁺ não apresentaram diferença entre pacientes hemofílicos com e sem infecção pelo HCV, sendo que nos pacientes co-infectados com HIV, a população de Linfócitos TCD4⁺ foi significativamente menor.

Em nossos resultados, os linfócitos TCD8⁺ apresentaram valores maiores na população de hemofílicos com reatividade para anticorpos anti-HCV, o que difere dos valores encontrados por Zhang et al. (2005), que não encontraram diferença entre indivíduos hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos. Entretanto, em trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, em pacientes hemodialisados com sorologia reativa para anti-HCV, foram encontrados valores aumentados de LTCD8⁺ quando comparados a população com sorologia não reativa para anticorpos anti-HCV (MAIA et al., 2009). Já Thimme et al. (2002) observaram em indivíduos com hepatite C crônica, número baixo de LTCD8⁺ no sangue periférico, mas relataram altas quantidades destas células no fígado.

O aumento dos linfócitos TCD8⁺ pode indicar um comprometimento hepático maior, sendo necessárias outras análises para definir esta associação, como a comparação com a biópsia hepática, apesar de esta ser pouco indicada para pacientes hemofílicos.

5.5 Análise das populações de leucócitos CD69⁺ por citometria de fluxo

A análise da expressão da molécula CD69⁺ na superfície dos leucócitos indica se estas células estão ativadas para exercerem seu papel na resposta imune (TRAN et al., 1997). As sub-populações de leucócitos (monócitos, linfócitos, neutrófilos) não apresentaram diferenças entre os hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos. Apenas a população de eosinófilos CD69⁺ foi estatisticamente maior nos hemofílicos reativos para anticorpos anti-HCV.

Dados semelhantes aos encontrados por nós, foram demonstrados por Maia et al. (2009) que não encontraram diferença na população de monócitos e linfócitos CD69⁺ e aumento da população de eosinófilos CD69⁺, entretanto, demonstraram ainda, o aumento da população de Neutrófilos CD69⁺, sendo que este estudo foi realizado com pacientes hemodialisados com sorologia reativa para anticorpos anti-HCV.

Estes dados sugerem que em nossa população de estudo os linfócitos TCD4⁺/CD8⁺ não estariam respondendo efetivamente à infecção pelo HCV, o que poderia estar relacionado ao perfil de citocinas produzidos por estes indivíduos. Devido esta análise ser subjetiva, não podemos afirmar se o HCV ativa ou não estas células.

5.6 Análises das concentrações séricas de citocinas nos pacientes hemofílicos.

As citocinas produzidas pelo organismo são essenciais para defender o hospedeiro contra a infecção pelo HCV, sendo que, em alguns casos, elas estão associadas à lesão

hepatocelular, observada na maioria dos pacientes infectados cronicamente. Além disso, a infecção persistente perturba o equilíbrio entre citocinas imunoestimulatórias e inibitórias, o que pode prolongar a inflamação e levar a necrose, fibrose e doença hepática crônica (JACOBSON-BROWN e NEUMAN, 2001). Estas citocinas desempenham um papel imunorregulatório crucial na resposta do hospedeiro ao HCV. Enquanto citocinas de linfócitos Th1 (pró-inflamatórias, como o IFN- γ) são necessárias para a resposta imune antiviral, citocinas Th2 e regulatórias (como IL-4 e IL-10), regulam as citocinas Th1 e podem inibir o desenvolvimento de mecanismos eficazes para a eliminação viral (PRADO et al., 2003).

Como descrito em nossos resultados, não observamos diferenças significativas nas concentrações séricas de IL-10 entre os hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos. No entanto, demonstramos que as concentrações da citocina IL-4 apresentaram-se elevadas nos hemofílicos reativos para anticorpos anti-HCV. Vários estudos já demonstraram a participação destas citocinas na resposta imune contra o HCV, como no trabalho realizado por Abayali et al. (2003) que observaram que as concentrações das citocinas IL-4 e IL-10 estavam aumentadas em pacientes com infecção crônica pelo HCV e relacionaram o aumento destas citocinas como uma tentativa do organismo em diminuir a lesão hepatocelular, principalmente com a inibição da produção de IFN- γ e manter a infecção crônica. Reiser et al (1997); Chen et al. (2007) também encontraram concentrações altas de IL-4 e IL-10 em pacientes com infecção crônica pelo HCV, demonstrando, o mecanismo de escape viral, mantendo a infecção crônica e a evolução lenta da doença, como observado nesta população de pacientes.

As concentrações de IL-4 e IL-10 estão associadas com mecanismos de supressão da resposta Th1 e conseqüentemente uma diminuição na produção de IFN- γ e IL-12. Estas citocinas Th1 (IL-12 e IFN- γ) participam da resposta imune citotóxica e produzem uma resposta antiviral contribuindo com o “clearance” do HCV. Entretanto, o aumento de IFN- γ pode levar a um risco maior de dano hepático (CHEN et al., 2007).

Nossos resultados mostram que as concentrações de IL-12 não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os hemofílicos com e sem reatividade para anticorpos anti-HCV, o que difere do estudo realizado por Osna et al. (1997) onde observaram uma diminuição da produção IL-12 em pacientes com infecção crônica pelo HCV. Por outro lado, o IFN- γ se mostrou elevado em nosso grupo de hemofílicos anti-HCV reativos provavelmente devido a citocina IL-10 não estar elevada neste grupo, apesar de observarmos alterações nas concentrações de IL-4. Abayali et al. (2003) não encontraram diferença na concentração de IFN- γ em pacientes HCV positivos comparando com HCV negativos, entretanto, as concentrações de IL-10 estavam elevadas, demonstrando que esta citocina poderia modificar o perfil de resposta imune neste paciente.

Quando avaliamos as concentrações das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α amostras dos nossos grupos experimentais, verificamos que não houve diferenças estatísticas significantes entre os hemofílicos anti-HCV reativos e não reativos.

Dados da literatura mostram resultados controversos sobre as concentrações destas citocinas na infecção por este vírus. Enquanto que Chen et al. (2007) encontraram concentrações elevadas de TNF- α em pacientes com infecção pelo HCV, no trabalho de Spanakis et al. (2002) foram observadas concentrações menores desta citocina na população anti-HCV reativa.

Com relação às concentrações de IL-6, dados similares foram reportados por Spanakis et al. (2002) em pacientes com e sem sorologia reativa para o HCV, entretanto, em pacientes hemodialisados com anticorpos anti-HCV reativos, eles encontraram níveis séricos aumentados de IL-6.

No caso das concentrações de IL-8, autores já observaram o aumento desta citocina em pacientes infectados pelo HCV, como demonstrado por Rysz et al. (2006) e Polyak et al. (2001), que observaram em pacientes infectados cronicamente pelo HCV concentrações

maiores de IL-8 quando comparados a indivíduos saudáveis. No entanto, diferentemente do nosso estudo, estes autores incluíram somente pacientes que estavam com alterações clínicas evidentes e relacionaram ainda, o aumento da IL-8 com a resistência ao tratamento com IFN. É importante ressaltar, que nestes estudos, os autores não trabalharam com pacientes hemofílicos sem tratamento para HCV o que pode explicar a divergência entre estes resultados.

5.7 Carga viral e genótipos encontrados no pacientes hemofílicos

Dos 24 hemofílicos que apresentaram sorologia reativa para anticorpos anti-HCV, 16 apresentaram carga viral detectável. Sendo que por problemas técnicos, apenas 4 foram genotipados. Os genótipos encontrados foram o 1 (50,0%) e 3 (50%). Outros estudos já demonstraram a distribuição dos genótipos do HCV na população de hemofílicos, como no trabalho de Carmo et al. (2002) estudando 116 pacientes hemofílicos com carga viral detectável de HCV. Eles encontraram o genótipo 1 em 84,5% dos hemofílicos, o genótipo 3 em 8,6%, o genótipo 4 em 2,6% e o genótipo 2 em 0,9%, sendo que em 3,4% dos pacientes não foram possíveis determinar os genótipos virais. Outro estudo de prevalência dos genótipos do HCV em paciente hemofílicos demonstrou que o genótipo 1 foi o mais prevalente (72%), seguido do genótipo 3 (12%), genótipo 2 (10%), genótipo 4 (2,5%) e infecções mistas em 5,6% dos pacientes (PARODI et al., 2008). Outros estudos já demonstraram que o genótipo 1 do HCV é o mais encontrado na população de hemofílicos, com prevalência acima de 60% (TAKAYAMA et al., 1997; MAOR et al., 2006).

No Amazonas, dados do nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o genótipo 1 do HCV é o mais prevalente em diferentes populações estudadas. Torres et al., 2009 estudaram doadores de sangue positivos para HCV; Almeida, 2007 estudou pacientes com hepatite C crônica e Feitosa, 2008 estudou pacientes hemodialisados com HCV.

Takayama et al. (1997); Maor et al. (2006) observaram ainda que os hemofílicos infectados com o genótipo 1, apresentaram carga viral maior, o que difere dos nossos achados, onde os pacientes com genótipo 3 apresentaram carga viral maior, dados que não podemos comprovar estatisticamente, devido ao pequeno número de pacientes genotipados.

5.8 Correlação da carga viral (CV) do HCV com os níveis de transaminases (AST e ALT) nos pacientes hemofílicos

Afim de, compreendermos melhor as alterações hepáticas causadas pelo HCV nos pacientes hemofílicos, analisamos em nosso trabalho, a correlação das transaminases com a carga viral do HCV, e verificamos que o aumento da ALT está relacionado com o aumento desta carga viral. O mesmo não aconteceu com as concentrações de AST, onde não observamos correlação significativa. A importância desses resultados pode ser verificada no trabalho realizado por Eyster et al. (2004), em pacientes com HCV, onde foi relatado que o “clearance viral” está associado à concentração de ALT normal e carga viral não detectável do HCV. Resultados que corroboram com estudo feito por Messik et al. (2001), que observaram que os pacientes hemofílicos com carga viral indetectável do HCV, não apresentaram alteração na concentração da ALT, enquanto que, em 70% dos que apresentaram carga viral detectável, a concentração de ALT estava elevada. Sabin et al. (2002), em um estudo de coorte, observaram que as concentrações das transaminases (AST e ALT) aumentaram proporcionalmente com a carga viral do HCV ao longo do curso da infecção. Em contrapartida, Matthews-Greer et al. (2001) não verificaram associação das concentrações das transaminases e carga viral do HCV.

5.9 Correlação de IL4, IL-10 e IFN- γ com a carga viral (CV) do HCV nos hemofílicos

As citocinas Th1, como o IFN- γ , promovem uma resposta imune celular, aumentando a eliminação do HCV dentro dos hepatócitos. Já as citocinas IL-4 e a IL-10 agem inibindo a resposta Th1 e favorecem a proliferação viral. Devido a estes fatos, avaliamos a relação destas citocinas com carga viral detectável nos hemofílicos.

As concentrações de IL-4 e IL-10 apresentaram correlação significativa com a carga viral do HCV nos hemofílicos. Enquanto que as do IFN- γ , não se alteraram, apesar de terem apresentado concentrações maiores nos hemofílicos anti-HCV reativos.

Como citado anteriormente, estudos já mostraram a importância desta citocinas na resposta imune do HCV. Dados que mostram que o aumento destas está relacionado a um maior comprometimento hepático e inibição da resposta Th1 (CHEN et al., 2007).

Napoli et al. (1996), demonstraram a correlação entre as concentrações de IFN- γ e o aumento do comprometimento hepático em pacientes com hepatite C crônica, no entanto, a concentração de IL-10 nestes pacientes apresentou-se diminuída, juntamente com a carga viral. Em outro estudo, foi demonstrado que o tratamento com IFN além de diminuir a carga viral dos pacientes, diminuía a concentração de citocinas Th2 (CACCIARELLI et al., 1996). Dados publicados de Abayli et al. (2003), mostraram o aumento das citocinas IL-10 e IL-4 em pacientes com hepatite C crônica, sendo que os valores IFN- α não estavam aumentados nos pacientes infectados.

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa não demonstraram correlação desta citocinas com a carga viral do HCV. Sendo que, Feitosa (2008), trabalhou com pacientes hemodialisados com hepatite C e Almeida (2007), estudou pacientes com hepatite C crônica e não hemofílicos. A diferença nas populações estudadas pode explicar os resultados divergentes.

6. CONCLUSÃO

- Os hemofílicos ainda são um grupo com grandes possibilidades de contrair infecções por via sanguínea, entretanto, este estudo demonstrou um declínio das prevalências destas infecções nos últimos anos nesses pacientes;
- As concentrações altas de ALT e AST nos hemofílicos anti-HCV reativos sugerem que estes pacientes estão evoluindo para uma doença hepática;
- Os hemofílicos com alta carga viral do HCV no sangue, apresentaram chances maiores de desenvolver uma doença hepática devido à correlação com as transaminases. Dado que demonstra a necessidade desses pacientes fazerem o tratamento contra o HCV;
- A resposta imune com LTCD8⁺ e concentrações altas de IFN- γ no grupo de hemofílicos anti-HCV reativos não estão sendo suficientes para estes pacientes fazerem o “clearance” viral.
- A concentração de IL-4 se mostrou elevada nos hemofílicos com sorologia reativa para anti-HCV, entretanto, a concentração de IFN- γ mostrou-se também elevada, fato que pode ser explicado pela não alteração da IL-10 nos hemofílicos anti-HCV reativos.
- A correlação das citocinas IL-10 e IL-4 com a carga viral do HCV mostraram a importância dessas citocinas na resposta imunológica desses pacientes contra o vírus, pois o aumento destas está relacionado com o aumento da carga viral nos hemofílicos e possivelmente como um mecanismo de escape do HCV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAYALI, B., et al. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Turk. J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 1, p. 7-11, 2003.

ALEDORT, L.M. Hemophilia: yesterday, today, and tomorrow. **Mt Sinai J Méd**, v.63, n. 3-4, p.225-35, 1996.

ALMEIDA, C.M.O. **Avaliação da resposta imune associada a manifestações neurológicas e comportamentais do sono em pacientes com hepatite C**. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

ARRUDA, V.R. Detecção de portadoras e caracterização molecular da hemofilia em uma população brasileira. Campinas: UNICAMP, 1995. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 1995.

BALKAN, C. et al. The effect of clotting factor concentrates on the immune system in HIV-negative haemophilics. **Haemophilia**, v.11, p. 366 – 70, 2005.

BAPTISTA, H.A. Infección por hepatitis C em pacientes con hemofilia. **Rev Gastroenterol Mex**. v. 67(2), p. 75-9, 2002.

BARBOSA, A.P., et al. Prevalence of hepatitis C virus infection among hemophiliacs in central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97(5), p.643-44, 2002.

BOWEN, D.J. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. **J Clin Pathol: Mol Pathol**. v. 55, p. 1–18, 2002.

BOWIE, A.G.; FITZGERALD, K.A. RIG-I: tri-ling to discriminate between self and non-self RNA. **Trends Immunol.**, v.28, n.4, p.147–50, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. SEcretaria de atenção à saúde. Departamento de atenção especializado. **Manual do tratamento das coagulopatias hereditárias**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BURATTINI, M.N., et al. Correlation between HIV and HCV in Brazilian prisoners: evidence for parenteral transmission inside prison. **Revista de Saúde Pública**. v. 34(5), p. 431-36, 2000.

BUSEK, S; OLIVEIRA, G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v. 2(1), p.117- 23, 2003.

BUTT, A.A, et al. Biochemical and virologic parameters in patients co-infected with hepatitis C and HIV versus patients with hepatitis C mono-infection. **Am J Med Sci**, v. 333, p. 271-75, 2007.

CACCIARELLI, et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre-and posttreatment with interferon alpha. **Hepatology**. v.24, p.6-9, 1996.

CACOUB, P. et al. Mixed crioglobulinemia and hepatitis C virus. **Am J Med**. v. 96, p. 124-32, 1994.

CACOUB, P. et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: A prospective multicenter study of 321 patients. **Medicine**. v. 79, n. 1, p. 47-56, 2000.

CAIO, V.M., et al. Genética Comunitária e hemofilia em uma população brasileira. **Cad Saúde Pública**. v.17(3), p. 595-605, 2001.

CAMPIOTTO, S., et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v 38, p 41-9, 2005.

CARMO, R.A., et al. Hepatitis C virus infection among brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, p. 589-98, 2002.

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

CHEN, T.Y., et al. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection. **Translational Research**, v. 150, n. 2, p. 116-121, 2007.

CONTE, V.P. Hepatite Crônica por vírus C: Parte 1- Considerações gerais. **Arq Gastroenterol**. v. 37(3), p. 187-94, 2000.

COX, A.L., et al. Comprehensive analyses of CD8⁺T cells responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. **Hepatology**. vol. 42, n. 1, 2005

DELLADETSIMA, O. et al. Significance of immune status, genotype and viral load in the severity of chronic hepatitis C in HIV infected haemophilia patients. **Haemophilia**, v. 8, p. 668 – 73, 2002.

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

DOORNUM, G.J.J., et al. Prevalence of hepatitis C virus infections among heterosexuals with multiple partners. **Journal of Medical Virology**. v.35, p. 22-7, 1991.

EYSTER, M.E., et al. Viral clearance occurs very early during the natural resolution of hepatitis C virus infection in persons with haemophilia. **Haemophilia**, v. 10, p. 75-80, 2004.

FEITOSA, I.M.L. **Avaliação do perfil de citocinas séricas e genótipos do vírus da hepatite C em pacientes submetidos a hemodiálise**. Manaus: UFAM, 2008. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas), Universidade do Estado do Amazonas, 2008.

FERREIRA, M.R.M.N., et al. Hepatitis C serological and molecular diagnosis and genotype in haemophilic patients at the Regional Hemocenter of Maringá, Maringá PR Brazil. **Haemophilia**, v. 14, p. 810-815, 2008.

FOCACCIA, R., et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by serologic survey of a stratified, randomized and residence- based population. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 2, p. 269-84, 1998.

FRANCHINI, M., et al. Update of chronic hepatitis C in hemophiliacs. **Haematologica**, v. 87(5), p. 542-549, 2002.

FRANCHINI, M., et al. The natural history of chronic hepatitis C in a cohort of HIV-negative Italian patients with hereditary bleeding disorders. **Blood**, v.98, p.1836-41, 2004.

FUKUDA, Y; NAKANO, I. **Desafios ao desenvolvimento de uma vacina anti-HCV**. In: Focaccia, R. Tratado de Hepatites virais. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; p. 325-28, 2003.

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

GIANELLI, F., et al. Haemophilia B: data-base of point mutations and short additions and deletions. **Nucleic Acids Res.** v.26, p. 265-268, 1998.

GODKIN, A., et al. Expansion of hepatitis C-specific CD4₊CD25₊ regulatory T cells after viral clearance: a mechanism to limit collateral damage? **J Allergy Clin Immunol.**, v.121, p.1277-1284, 2008.

GOEDERT J.J., et al. Human immunodeficiency and hepatitis virus infections and their associated conditions and treatments among people with haemophilia. **Haemophilia**, v. 10 (4), p. 205-210, 2004.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Tratado de Medicina Interna. 22 .ed. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 1, 1280 p., 2005.

GOMPERS, E.D et al. The impact of clotting factor concentrates on the immune system in individuals with hemophilia. **Transfus Med Rev**, v.6, p. 44-54, 1992.

GORDEN, K.B., et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. **J Immunol**, v.174, p.1259-68, 2005.

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.

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

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

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

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

JACOBSON-BROWN, P.M.; NEUMAN, M.G. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. **Clin. Biochem.**, v.34, n. 3, p. 167-71, 2001.

KAISHO, T.; AKIRA, S. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. **Crit Rev Immunol.**, v.20, n.5, p.393-405, 2000.

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.

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

LOZACH, P.Y., et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.20358-66, 2003.

LUSHER J, et al. Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor in the treatment of previously untreated patients with hemophilia A: final report on a hallmark clinical investigation. **J Thromb Haemost.** v. 2(4), p. 574-83, 2004.

MAIA, L.P.V., et al. Hepatitis C virus screening and clinical monitoring of biomarkers in patients undergoing hemodialysis. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1220-31, 2009.

MANNUCI, P.M., TUDDENBAM, E.G. The haemophilias: progress and problems. **Semin Hematol.** v. 36(4 suppl 7), p. 104-117, 1999.

MAOR, Y., et al. Hepatitis C at the Israeli National Hemophilia Center. **Haemophilia**, v. 12, p. 68-74, 2006.

MARTINS, R.B.M., et al. Infecção pelo vírus da hepatite B em hemofílicos em Goiás: soroprevalência, fatores de risco associados e resposta vacinal. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 26(3), p. 183-88, 2004.

MATTHEWS- GREER, J.M., et al. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without Human Immunodeficiency Virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 690-4, 2001.

MAUSER-BUNSCHOTEN, EP, et al. Hepatitis C infection and viremia in Dutch hemophilia patients. **J Med Virol.** v.45, p. 241-46, 1995.

MESSIK, K., et al. Hepatitis C viral clearance and antibody reactivity patterns in persons haemophilia and other congenital bleeding disorders. **Haemophilia**, v. 7, p. 568-74, 2001.

MOLL, S., WHITE, G.C. Treatment of the hemophiliac. **Curr Opin Hematol**. v. 2(5), p. 386-394, 1995.

MUNOZ, G., et al. Prevalence and genotypes of hepatitis C virus in blood donors and in patients with chronic liver disease and hepatocarcinoma in a Chilean population. **Rev Med Chil**. v. 126(9), p. 1035-42, 1998.

NAPOLI, G., et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Hepatology**. v.24, n.4, p.759-65, 1996.

NEUBAUER, K., et al. Decrease of platelet-endothelial cell adhesion molecule 1-gene-expression in inflammatory cells and in endothelial cells in the rat liver following CCl(4)-administration and in vitro after treatment with TNF-alpha. **Immunol Lett.**, v. 74, p.153-164, 2000.

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

OLIVEIRA, M. L. A., 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.** v.32 p.1107-14, 1999.

OLSEN, E.H., et al. Comparative response of plasma VWF in dogs to up-regulation of VWF mRNA by interleukin-11 versus Weibel-Palade body release by desmopressin (DDAVP). **Blood**. v. 15 (2), p. 436-41, 2003.

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. 641-6, 2005.

OMS. Global surveillance and control of hepatitis C: Report of a WHO consultation organized in collaboration with the viral hepatitis prevention board. **J Viral Hepat**. v. 6, p. 35-47, 1999.

OSNA, N., et al. Chronic hepatitis C: T-helper1/T-helper2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. **Scand J Clin Lab Invest.**, v. 57, n. 8, p. 703-10, 1997.

PARANÁ, R., 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, 1999.

PARODI, C., et al. Evidence of occult HCV genotypes in haemophilic individuals with unapparent HCV mixed infections. **Haemophilia**. v. 14, p. 816-22, 2008.

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

PEREZ, C.M., et al. Seroprevalence of hepatitis C virus and associated risk behaviours: a population based study in San Juan, Puerto Rico. **Int J Epidemiol.** v. 34(3), p. 593-99, 2005.

PILERI, P., et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v.282, p. 938-41, 1998.

POHLMANN, S., et al. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. **J. Virol.**, v.77, p.4070-80, 2003.

POLYAK, S.J., et al. Elevated levels of Interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. **Journal of Virology**, v. 75, n. 13, p. 6209-11, 2001.

PRADO, I.B., et al. **Imunopatogenia das hepatites agudas e crônicas**. In: SILVA, L.C. Hepatites agudas e Crônicas. 3^a ed. São Paulo: Sarvier; Cap. 14, p. 99-106, 2003.

QUINTANA, M., et al. Progression of HIV infection and mortality by hepatitis C infection in patients with haemophilia over 20 years. **Haemophilia**. v. 9(5), p. 605-612, 2003.

RAMOS-CASALS, M., et al. Sjogren syndrome associated with hepatitis C virus: A multicenter analyses of 137 cases. **Medicine**. v. 84, n. 2, p. 81-89, 2005.

RAY, S.C., et al. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. **J. Exp. Med.**, v.201, p.1753-1759, 2005.

REITSMA, P.H. Genetic principles underlying disorders of procoagulant and anticoagulant proteins. In: Colman RW; Hirsch J; Marder VJ; Claves AW; George JN. Hemostasis and trombosis. **Basic principles and clinical practice 4th ed.** Philadelphia: Lipincott; Williams & Wilkins, pp. 59-87, 1994.

REISER, M. et al. Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatology**. v.26, n.3, p.471-8, 1997.

RIZZA, C.R. Haemophilia and related inherited coagulation defects. In: Bloom AL; Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD. **Haemostasis and trombosis**. 3rd. Edinburgh: Churchill Livingstone pp. 1819-41, 1994.

ROSEN, H.R.; GRETCH, D.R. Hepatitis C virus: current understanding and prospectives for future therapies. **Molecular Medicine Today**. v.5, p. 393-99, 1999.

RUMI, M.G., et al. Hepatitis C in haemophilia: lights and shadows. **Haemophilia**. v. 10(4), p. 211-215, 2004.

RUSHBROOK, S.M., et al. Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8-T cells during persistent hepatitis C virus infection. **J Virol.**, v.79, p.7852-7859, 2005.

RYSZ, J., et al. Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF alfa and IL-1 betain patients on maintenance hemodialysis. **Celular & Molecular Immunology**, v. 3, n. 2, p. 151-54, 2006.

- SABIN, C.A., et al. Long-term patterns of hepatitis C Virus RNA concentrations in a cohort of HIV seronegative men with bleeding disorders. **Journal of Medical Virology**. v.68, p.68-75, 2002.
- SCARSELLI, E., et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J**, v.21, p.5017–25, 2002.
- SEMO, N., et al. Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**. v.14, p. 492-502, 2006.
- SILVA, L.K., et al. Prevalence of hepatitis C virus infection and HCV genotypes among hemophiliacs in the State of Bahia, northeastern Brazil: analysis of serological and virological parameters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38(6), p. 496-502, 2005.
- SIMMONDS, P. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C genotypes. **Hepatology**. v. 42, p. 962-73, 2005.
- SPANAKIS, N.E., et al. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, p. 40-46, 2002.
- STEINMAN, R.M.; HEMMI, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.311, p.17–58, 2006.
- STEPHEN, L.C. & MORGAN, T.R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int. J. Med. Sci.** v. 3(2), p. 47-52, 2006.
- STRAUSS, E. Hepatitis C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34(1), p. 69-82, 2001.
- SZABO, G.; DOLGANIUC, A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. **Clin Liver Dis.**, v.12, p. 675-692, 2008.
- TAKAYAMA, S. et al. Virological characteristics of HCV infection in Japanese haemophiliacs. **Haemophilia**. v. 3. p. 131-6, 1997.
- TENGAN, F.M., et al. Sexual transmission of hepatitis C virus. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. v. 43(3), p. 133-37, 2001.
- THEODORE, M.M.J. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci**. v. 3, p. 41-46, 2006.
- THIMME, R., et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease . **PNAS**, v. 99, n. 24, p.15661-15668, 2002.
- TIMM, J., et al. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. **J. Exp. Med.**, v.200, p.1593–1604, 2004.
- TORRES, K.L., et al. Hepatitis C virus in blood donors, Brazil. **Emerging Infections Diseases**, v. 15, n. 4, p. 676-8, 2009.

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

URIBE, M; MENDEZ-SANCHEZ, N. Hepatitis C in México. **Rev Gastroenterol Mex.** v. 67, p. 7-8, 2002.

USUI, C.S.M. **Avaliação da resposta imune em doadores de sangue da cidade de Manaus infectados com o vírus da hepatite C (HCV)**. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

VASCONCELOS, HC, et al. Hepatitis B and C prevalences among blood donors in the south region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 89, p. 503-507. 1994.

VIEIRA, S. **Bioestatística: Tópicos Avançados**. 2 ed. Rio de Janeiro: Campus, 2004.

XU, J., et al. Identification of the nonstructural protein 4B of hepatitis C virus as a factor that inhibits the antiviral activity of interferon-alpha. **Virus Research**, v.141, p.55-62, 2009.

WHARFE, G. Seroprevalence of hepatitis C virus in haemophiliacs in Jamaica. **Hum Antibodies.** v. 11(3), p. 61-64, 2002.

WILDE, JT. HIV and HCV coinfection in haemophilia. **Haemophilia.** v. 10(1), p. 1-8, 2004.

WINDYGA, J. Prevalence of HCV, HBV and HIV infections among severe Polish haemophiliacs. **Przegl Epidemiol.** v. 62(2), p. 415-423, 2008.

ZAGO, MA; FALCAO, RP; PASQUINI, R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu, p.797-818. 2001.

ZHANG, J., et al. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. **J. Virol.**, v.78, p.1448-55, 2004.

ZHANG, M., et al. Lymphocyte subsets in hemophilic patients with hepatitis C virus infection with or without human immunodeficiency virus co-infection: a nested cross-sectional study. **BMC Blood disorders**, v. 5(2), p. 1-5, 2005.

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

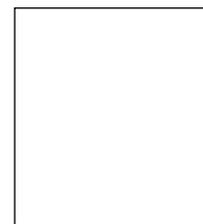
Convidamos o (a) Sr(a). para participar do Projeto de Pesquisa “HEPATITE C EM PACIENTES HEMOFÍLICOS: PERFIL IMUNOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES GENÓTIPOS VIRAIS”, que será realizado na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e pretende encontrar os tipos de vírus que causam a hepatite C nos pacientes hemofílicos e estudar a resposta imune, isto é, como o indivíduo desenvolve defesa contra esta infecção. Para isso, precisamos apenas coletar um pouco de sangue (20 mL) para fazer os exames necessários. Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha. O Sr.(a) foi escolhido porque possui hemofilia e não porque possui hepatite C ou outra infecção. Se você não tiver nenhuma infecção, a informação do seu sangue vai servir para sabermos se a doença altera ou não o valor do que estamos medindo. O Sr. (a) é quem decide se participa ou não deste estudo e se não quiser participar, isso não irá atrapalhar seu atendimento no HEMOAM. Se depois de autorizar a coleta, o Sr(a) não quiser que seu sangue seja usado, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta do sangue, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não terá nenhum benefício financeiro. A sua participação é importante para o melhor conhecimento desta doença (infecção pelo HCV) e de como pode ser melhor diagnosticada. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo para sempre. O seu sangue será armazenado e poderá ser utilizado em novas pesquisas realizadas por esta instituição desde que sejam aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemoam conforme Resolução CNS 347/2005. Para qualquer outra informação, o(a) Sr.(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelo projeto (João Paulo Pimentel e Adriana Malheiro) pelo telefone (92) 3655-0113.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo eu posso sair quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinada, que vou guardar. Autorizo os pesquisadores a armazenarem meu sangue para projetos futuros realizados por esta instituição.

(assinatura do pesquisador ou representante)

(assinatura do participante ou responsável)



Impressão dactiloscópica

Apêndice B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



IV- Comentários do CEP frente à Resolução 196/96 e complementares:

Na análise do protocolo observou-se que a metodologia está adequada aos objetivos da pesquisa, a população de estudo, critérios de inclusão e exclusão, orçamento, cronograma e currículo dos pesquisadores foram apresentados e que o TCLE atende aos preceitos éticos da Resolução 196/96, devendo o pesquisador mudar a redação onde está escrito “assinatura do participante” para “**assinatura do participante ou responsável**”, pois o projeto também analisará menores de 18 anos. Quanto a frase “ Autorizo os pesquisadores a armazenarem meu sangue para projetos futuros realizados por esta instituição” o pesquisador deverá transcrevê-la ao final do texto do TCLE e ainda **declarar que toda nova pesquisa a ser realizada com seu sangue será submetida para aprovação do CEP, conforme Resolução CNS 347/2005.**

V. Parecer do CEP:

Aprovado com Recomendação: Apresentar novo TCLE com as recomendações acima. Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 o pesquisador deverá apresentar a este CEP **relatórios** parciais e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: **19/06/2008.**

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

VI. Data da Reunião: 13.12.2007

VII. Data Parecer: 20.12.2007


JOSIANE NEVES
Secretária
CEP/HEMOAM