



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES COM
HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA**

GREENDA LEITE PEREIRA

MANAUS - AMAZONAS

2018

GREENDA LEITE PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM PACIENTES COM
HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM ANTIVIRAIS DE AÇÃO DIRETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilú Barbieri Victória

MANAUS – AMAZONAS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P436c Pereira, Grenda Leite
Caracterização da resposta imune celular em pacientes com
hepatite c crônica tratados com antivirais de ação direta / Grenda
Leite Pereira. 2018
161 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientadora: Marilú Barbieri Victória
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Vírus da hepatite C. 2. Antivirais de ação direta. 3. Resposta
imune. 4. Hepatite C crônica. I. Marie, Adriana Malheiro Alle II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

GREENDA LEITE PEREIRA

**Caracterização da resposta imune celular em pacientes com hepatite c crônica
tratados com antivirais de ação direta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

APROVADA EM: 06/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. José Eduardo Levi, Membro Externo
Universidade de São Paulo

Prof^a Dr^a Cintia Mara de Oliveira, Membro Interno
Universidade do Estado do Amazonas

Aos meus queridos e amados pais, Tereza Leite e Genilson Ferreira e a minha querida Avó Diva por todo apoio, incentivo, dedicação e amor incondicional.

As minhas irmãs Tamillys e Grenyelly pela inspiração e carinho e ao meu amado esposo Alberto pela paciência, compreensão e companheirismo.

Dedico

Agradecimentos

A Deus, por ser tão generoso comigo, Ele é o Senhor da minha Vida e dos meus caminhos a quem tenho confiado e depositado todos os meus sonhos.

Aos meus queridos e amados pais Tereza Leite e Genilson Ferreira e minha maravilhosa avó Diva de Brito, pela dedicação, apoio, incentivo, pelo amor incondicional e por serem para mim os grandes exemplos de vida. Vocês me permitiram realizar esse grande sonho. Serei eternamente grata.

As minhas queridas irmãs e companheiras Tamillys Leite e Grenyelly Leite por todo amor, carinho, força e ajuda nos momentos mais difíceis, eu amo demais vocês.

Ao meu amado esposo Alberto Júnior por todo amor, carinho, paciência e incentivo em todos os momentos, pois quando eu mais precisei você sempre esteve disponível.

Ao meu precioso sobrinho Théo Bruno quem me faz feliz todos os dias com seu sorriso encantador e sua doçura.

Aos meus cunhados Hero Bruno, Airton Silva e Léo Silva pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus tios Genete e Salomão Neto e primo Salomão Bisneto por todo acolhimento e apoio recebido, por sempre se preocuparem comigo meu muito obrigado.

A todos os meus grandes amigos da NAEF, em especial a minha amiga Diana Toro, Jéssica Albuquerque, Bianca Fabiane, Hiochelson Najibe e Péricles Abreu por todo carinho, atenção, amizade, companheirismo e por tornarem meu dia mais feliz.

Não poderia deixar de falar desses meus dois grandes amigos que me acompanham desde a iniciação científica, Priscila e Pedro nós somos o trio

fantástico, junto somos mais forte, jamais esquecerei o que fizeram por mim, agradeço a Deus pela vida de vocês. Vocês são minhas pedrinhas preciosas.

*A minha orientadora **Drª. Adriana Malheiro**, pela oportunidade, aprendizado, paciência e por contribuir na minha formação acadêmica. Orgulho de ter a senhora como minha orientadora.*

*A minha coorientadora **Drª. Marilú Victória**, por todo apoio, aprendizado e por sempre estar disposta a me ajudar, obrigada.*

*Ao **Dr. Flamir Victória** por toda atenção, apoio, disponibilidade e idéias de melhorias para o trabalho.*

*A pesquisadora e amiga de excelência **Andréa Tarragô** por todos os ensinamentos, dedicação, paciência, ajuda e atenção, os quais foram essenciais nesta jornada. Obrigada por sempre me incentivar e acreditar em mim.*

*Aos pesquisadores **Allyson Guimarães, Walter Luiz e Nadja Garcia** por toda a ajuda, amizade e por todos os momentos que juntos compartilhamos.*

*A todos os meus amigos da turma do Mestrado em Imunologia: **Danielle, Wellington, Dana, José, Valquiria, Poliane e Eliana** por sempre um ajudar o outro, pelo companheirismo, pelas prazerosas conversas e risos, pelas caronas e pela amizade.*

*Aos **Professores** do Programa de Pós Graduação em Imunologia pelo conhecimento e ensinamento, aos quais foram essenciais na minha formação.*

*A todos os indivíduos envolvidos nesta pesquisa, **pacientes** da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado e a todos os **candidatos a doação de sangue** da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas por aceitarem participar deste projeto, eu agradeço de coração.*

A Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado por ceder às amostras biológicas e pela parceria junto a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas pelo espaço e equipamentos oferecidos no laboratório para execução do projeto.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), seus Docentes e Técnicos pela oportunidade de capacitação e qualificação profissional.

A Universidade Federal do Estado do Amazonas pela oportunidade de poder cursar o curso de Imunologia Básica e Aplicada oferecido pelo Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa)

RESUMO

Introdução: A hepatite C é uma doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo. A estimativa global da infecção atinge cerca de 3% da população mundial. Com a introdução dos Antivirais de Ação Direta (DAAs) surge uma nova era livre de interferon. Os DAAs apresentam excelente eficácia, podendo curar mais de >90% das pessoas com infecção por hepatite C. Contudo, a compreensão das interações entre o HCV e o hospedeiro nos intriga a buscar informações quanto à restauração imunológica pós-tratamento livre de interferon.

Objetivo: Caracterizar a resposta imune celular, o perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes com hepatite C crônica, tratados com DAAs. **Material e Método:** Foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes diagnosticados com Hepatite C crônica (HCV⁺), antes e após o tratamento e de candidatos à doação de sangue (CN). Foi realizada imunofenotipagem das subpopulações de células a resposta imune inata e adaptativa e quantificação das concentrações séricas das citocinas e quimiocinas plasmáticas por Citometria de Fluxo. **Resultados:** Foram coletadas 82 amostras de pacientes HCV⁺ atendidos pela Fundação FMT-HVD e 50 Candidatos a doadores de sangue oriundo da Fundação HEMOAM. A média de idade foi maior no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (p<0.0001). Foi observado predomínio do sexo masculino no grupo controle e feminino nos pacientes HCV⁺. O genótipo do HCV predominante na população estudada foi o genótipo 1, seguido dos genótipos 3, 2 e 4 e apenas um paciente apresentou coinfeção pelos genótipos 1/2 do HCV. Observou-se que a maioria dos pacientes HCV⁺ apresentou fibrose <F2. Estes pacientes apresentaram níveis séricos elevados das transaminases ALT e AST. Enquanto que os níveis de plaquetas (p<0.0001) e leucócitos totais (p<0.0001) apresentaram-se diminuídos quando comparados ao grupo controle. Os pacientes tratados com DAAs apresentaram RVS >90% independentemente do genótipo. Os pacientes com hepatite C apresentaram os monócitos ativados circulantes diminuídos após o tratamento quando comparados com o grupo controle. Enquanto as células dendríticas plasmocitóides e mielóides, células NKT e TCD4⁺ apresentaram-se diminuídas antes do tratamento, estas populações encontram-se aumentadas no grupo de pacientes *naives* pós-tratamento quando comparados com controle e pacientes experimentados. Já os Linfócitos TCD8⁺ e Linfócitos B1 apresentaram-se reduzidos após o tratamento. As células NK, Linfócitos T regulatórios e Linfócitos B parecem não sofrer alterações importantes na população estudada. Além disso, pode-se observar que as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4 e IL-17A permaneceram aumentadas nos pacientes experimentados mesmo após o tratamento. As quimiocinas IL-8, MIG e IP-10 apresentaram-se aumentadas antes e após o tratamento tanto nos pacientes *naives* quanto os experimentados, quando comparados ao grupo controle. **Conclusão:** Ao final deste trabalho podemos concluir que o tratamento livre de interferon é bem tolerado e apresenta elevada taxa de resposta virológica sustentada, os genótipos do HCV circulantes no Amazonas são 1, 3, 2 e 4, o perfil celular acompanhado do perfil de citocinas e quimiocinas parecem não haver reversibilidade completa com 12 semanas após o término do tratamento, podendo estar relacionado com a presença de doença hepática instalada e o perfil de citocinas e quimiocinas podem prever biomarcadores putativos para o alcance da RVS, podendo fornecer subsídios para avaliações posteriores de estadiamento de doença hepática relacionada à hepatite C em pacientes tratados com DAAs.

Palavras-chaves: Vírus da Hepatite C, Antivirais de Ação direta e Resposta Imune.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C is a disease that affects millions of people around the world. The global estimate of infection reaches about 3% of the world's population. With the introduction of Direct Action Antivirals (DAAs) a new era of interferon free appears. DAAs have excellent efficacy and can cure more than 90% of people with hepatitis C infection. However, understanding the interactions between HCV and host intrigues us to seek information regarding immune restoration after interferon free treatment. **Objective:** To characterize the cellular immune response, cytokine and chemokine profile in patients with chronic hepatitis C treated with DAAs. **Material and Method:** Peripheral blood samples were collected from patients diagnosed with chronic hepatitis C (HCV +) before and after treatment and from blood donors (CN). Immunophenotyping of cell subpopulations was performed on the innate and adaptive immune response and quantification of serum cytokine and plasma chemokine concentrations by Flow Cytometry. **Results:** 82 samples of HCV + patients attended by the FMT-HVD Foundation and 50 candidates for blood donors from the HEMOAM Foundation were collected. The mean age was higher in the group of patients than in the control group ($p < 0.0001$). It was observed predominance of males in the control and female group in HCV + patients. The predominant HCV genotype in the studied population was genotype 1, followed by genotypes 3, 2 and 4, and only one patient had coinfection with HCV 1/2 genotypes. It was observed that the majority of HCV + patients presented fibrosis $<F2$. These patients had elevated serum levels of ALT and AST transaminases. While the levels of platelets ($p < 0.0001$) and total leukocytes ($p < 0.0001$) were decreased when compared to the control group. Patients treated with DAAs presented SVR $> 90\%$ regardless of genotype. Patients with hepatitis C had circulating activated monocytes decreased after treatment when compared to the control group. While plasmacytoid and myeloid dendritic cells, NKT and TCD4 + cells were decreased prior to treatment, these populations were increased in the treatment naive group of patients after treatment when compared to control and experienced patients. On the other hand, TCD8 + lymphocytes and B1 lymphocytes were reduced after treatment. NK cells, Tregulatory Lymphocytes and B lymphocytes do not appear to undergo major changes in the studied population. In addition, cytokines IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4 and IL-17A may be observed and remained increased in the patients experienced even after treatment. The chemokines IL-8, MIG and IP-10 were increased before and after treatment in both naive and experienced patients compared to the control group. **Conclusion:** At the end of this study we can conclude that free interferon treatment is well tolerated and presents a high rate of sustained virological response, the circulating HCV genotypes in Amazonas are 1, 3, 2 and 4, the cellular profile accompanied by the cytokine profile and chemokines do not appear to be fully reversible at 12 weeks after the end of treatment and may be related to the presence of established hepatic disease and the cytokine and chemokine profile may predict putative biomarkers for SVR outreach and may provide subsidies for subsequent evaluations of staging of hepatitis C-related liver disease in patients treated with DAAs.

Keywords: Hepatitis C Virus, Direct Action Anti Viral and Immune Response

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do vírus da hepatite C.	31
Figura 2: Estrutura do genoma do vírus da hepatite C.	32
Figura 3: Distribuição epidemiológica dos genótipos do vírus da hepatite C no Mundo.	34
Figura 4: Esquema do ciclo de replicação do vírus da hepatite C.	39
Figura 5: Mecanismo da Resposta imune na hepatite C.	42
Figura 6: Histórico da terapia contra o vírus da hepatite C.	46
Figura 7: Ação dos DAAS.	47
Figura 8: Fluxograma de atividades.	48
Figura 9: Identificação dos Linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺), Linfócitos ativados (CD69 ⁺), Linfócitos B (CD19 ⁺) e B1 (CD5 ⁺ CD19 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	51
Figura 10: Identificação dos Linfócitos Treg (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	52
Figura 11: Identificação das Células NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) e NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	53
Figura 12: Identificação dos Monócitos (CD14 ⁺) e Monócitos Ativados (CD14 ⁺ CD80 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	53
Figura 13: Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14 ⁻ CD11c ⁺ CD123 ⁻) e Plasmocitóides (CD14 ⁻ CD11c ⁻ CD123 ⁺) no programa <i>FlowJo</i> (v9.4).	54
Figura 14: Fluxograma dos resultados.	57
Figura 15: Ativação dos monócitos do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de monócitos (CD14 ⁺) e ativação celular (CD80 ⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos do grupo controle, obtido através do teste não paramétrico <i>Kruskal-Wallis</i> , seguido do pós-teste de <i>Dunn's</i>	62
Figura 16: Frequência das células dendríticas mielóides (mDC) no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de mDC (CD14 ⁻ CD11c ⁺ CD123 ⁻). Os	

resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos do grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*..... 63

Figura 17: Frequência das células dendríticas plasmocitóides (pDC) no grupo controle, pacientes Pré e Pós-(A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de pDC ($CD14^+CD11c^+CD123^+$). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos do grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*..... 64

Figura 18: Frequência de linfócitos T $CD4^+$ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ ($CD3^+CD4^+$). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*..... 65

Figura 19: Frequência e ativação de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ ($CD3^+CD4^+$) e ativação celular ($CD69^+$). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*..... 66

Figura 20: Frequência de linfócitos T $CD8^+$ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B).

Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*. 67

Figura 21: Frequência e ativação de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) e ativação celular (CD69⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*. 68

Figura 22: Frequência de linfócitos T reguladores (Treg) no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*. 68

Figura 23: Frequência de linfócitos B no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos B (CD19⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*. 69

Figura 24: Frequência de linfócitos B1 no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos B1 (CD5⁺CD19⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.70

Figura 25: Frequência das células NK no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem das células NK (CD3-CD16+CD56+). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.71

Figura 26: Frequência das células NKT no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.72

Figura 27: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array) foi usado para quantificar as concentrações de IL-2. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Foi considerada diferença estatística significativa quando p<0,05, representado por “*”73

Figura 28: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-6. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 74

Figura 29: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de TNF- α . Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 75

Figura 30: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IFN- γ . Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 76

Figura 31: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-10. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 77

Figura 32: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-4. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não

paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 78

Figura 33: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-17A. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 79

Figura 34: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-8(CXCL-8). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 80

Figura 35: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de MCP-1 (CCL-2). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 81

Figura 36: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de Rantes (CCL-5). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*” 82

Figura 37: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de MIG (CXCL-9). Os resultados foram expressos com

média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”..... 83

Figura 38: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IP-10 (CXCL-10). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”..... 84

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Caracterização de fibrose moderada e cirrose conforme valores de APRI e FIB-4.	38
Tabela 2: Descrição dos clones, lotes, número de catálogos, fluorescências, marca e perfil celular dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.....	49
Tabela 3: Características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais do grupo controle, pacientes pré-tto e pós-tto.....	60
Tabela 4: Características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes Pré e Pós-TTo extratificados conforme o grau de fibrose hepática.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina Aminotransferase

APC - Célula Apresentadora de Antígeno

APRI - AST to Platelet Ratio Index

AST – Aspartato Aminotransferase

CBA - Cytometric Bead Array

CDC - Centro de Controle de Doenças

CD - Célula Dendrítica

CD - Cluster Differentiation

CD81 - Receptor Tetraspanina

CHILD-PUGH – Child Turcotte Pugh

CLDN1 - Claudina -1

DAAS - Agentes Antivirais de Ação Direta

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

DCV - Daclatasvir

E1 - Glicoproteína do envelope 1

E2 - Glicoproteína do envelope 2

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration

FIB4 - Fibrosis-4

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FMT-HVD - Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

GAGs – Glicosaminoglicanos

Hb - Hemoglobina

HCC - Carcinoma Hepatocelular

Hct - Hematócrito

HCV - Vírus da hepatite C

HEMOAM - Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HSCs – Células estreladas hepáticas

HVR - Região hipervariável

IFN– Interferon

IFN- γ – Interferon-gama

PEGIFN – Interferon Peguilado

IL – Interleucina

IP-10 - Proteína 10 induzida por interferon-gama

ISG – Genes estimuladores de Interferon

Kb - Kilo Base

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LDL-R - Receptor de lipoproteína de baixa densidade

LT CD4⁺ - Linfócitos T auxiliares ou T Helper

LT CD8⁺ - Linfócitos T citotóxicos

MCP-1 - Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos

MEC – Matriz Extra Celular

METAVIR - Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis

MIG - Monocina Induzida pelo Interferon-gama

NAT – Teste de ácido nucleico

NK - Natural Killer

NKT – Natural Killer T

NLR - Receptor Tipo NOD

NS - Não estrutural

N-terminal - Extremidade amino - terminal (NH₂) da proteína

NTPase – Nucleotídeo - trifosfatase

OCLN - Ocludina

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - Fase de leitura aberta

PAMPs - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

Pb - Pares de bases

PBS-W – Solução Tamponada com Fosfato e Albumina

PBS-P – Solução Tamponada com Fosfato, Albumina e Saponina

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PE – Ficoeritrina

PEG - Peguilado

PEG-IFN - Interferon peguilado

PerCP - Clorofilpiridinina

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão

P7 - Proteína P7

Qpcr - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RANTES - Regulação da Ativação da Célula T Normal Expressada e Secretada

RBV - Ribavirina

RC - Replicação citoplasmática

RdRp - RNA dependente de RNA Polimerase

RE - Retículo Endoplasmático

RIBA - Ensaio Recombinante Immunoblot

RNA - Ácido ribonucléico

RVS - Resposta Viroológica Sustentada

RVR – Respost Viroológica Rápida

SMV – Simeprevir

SOF - Sofosbuvir

SRBI – Receptor Scavenger B tipo I

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador-beta

Th1 - Célula T auxiliar

TLR - Receptor do Tipo Toll

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-alfa

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1 Hepatite C: Aspectos gerais, Epidemiológicos e Clínicos.....	30
2.2 Estrutura e organização genômica do vírus da hepatite C	30
2.2.1 Proteínas Estruturais e Não Estruturais	31
2.3 Genótipos e subgenótipos	33
2.4 Transmissão do vírus da hepatite C	35
2.5 Abordagens Diagnósticas	36
2.6 Ciclo do vírus da hepatite C.....	38
2.7 Imunopatogênese da infecção do vírus da hepatite C.....	39
2.8 Históricos da abordagem terapêutica.....	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo Geral.....	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Modelo de Estudo	46
4.2 População de estudo.....	46
4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	46
4.4 Coleta dos dados e do material biológico	47
4.5 Imunofenotipagem Celular por Citometria de Fluxo.....	48
4.5.1. Identificação da População de Linfócitos T CD4 ⁺ , TCD8 ⁺ , Linfócitos T ativados CD69 ⁺ , Linfócitos B (CD19 ⁺) e B1 (CD5 ⁺ CD19 ⁺).....	51
4.5.2. Identificação dos Linfócitos T regulatórios (CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺)	52
4.5.3. Identificação da População de Células NK (CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺) e NKT (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	52
4.5.4. Identificação dos Monócitos (CD14 ⁺) e Monócitos Ativados (CD14 ⁺ CD80 ⁺).....	53
4.5.5. Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14 ⁻ CD11c ⁺ CD123 ⁻) e Plasmocitóides (CD14 ⁻ CD11c ⁻ CD123 ⁺).....	54
4.6 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas Plasmáticas por CBA (Cytometric Bead Array).....	54
4.7 Aspectos Éticos.....	55
4.8 Análises Estatísticas.....	55
5 RESULTADOS	57

5.1 Dados demográficos, características clínicas e epidemiológicas.....	58
5.2 Perfil de Resposta Imune Celular nos pacientes com Hepatite C.....	61
5.3. Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Hepatite C crônica e grupo controle.	72
5.3.1. Intensidade média de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th1 associado aos subgrupos <i>naives</i> e experimentados dos grupos Pré e Pós-Tto.	72
5.4 Citocinas Regulatórias (Treg) e Perfil Th2 e Th17.....	76
5.4.1. Intensidade média de fluorescência das citocinas séricas do perfil Treg, Th2 e Th17 associado aos subgrupos <i>naives</i> e experimentados dos grupos Pré e Pós-Tto.	76
5.4. Concentração das Quimiocinas Séricas nos pacientes com Hepatite C crônica e grupo controle.	79
5.4.1. Intensidade média de fluorescência das quimiocinas séricas associado aos subgrupos <i>naives</i> e experimentados dos grupos Pré e Pós-Tto.....	79
6 DISCUSSÃO	84
6.1 Análise das Características Clínicas e Epidemiológicas.....	84
6.2 Análise do perfil de Resposta Celular nos pacientes com hepatite C e grupo controle.	87
6.3 Análise da Quantificação das Citocinas Séricas Th1, Th2 e Th17 e Treg e das Quimiocinas Séricas nos pacientes com hepatite C e grupo controle.....	96
7 CONCLUSÃO.....	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
Apêndice 01: Termo de aprovação do comitê de ética em Pesquisa CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).....	126
Apêndice 02: Adeno de aprovação do comitê de ética em Pesquisa CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).....	129
Apêndice 03: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos pacientes com hepatite C.	132
Questionário e Ficha de Cadastro Individual dos pacientes com hepatite C.....	134
Apêndice 04: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos candidatos à doação de sangue	137
Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE.	137
Anexo 01: Artigo genótipo 4	141
Anexo 02: Artigo retratamento	145

*Introdução e
Revisão Bibliográfica*

1 INTRODUÇÃO

A prevalência global da infecção por hepatite C é estimada em 130-170 milhões de pessoas infectadas, correspondendo cerca de 3% da população mundial (HAJARIZADEH *et al.*, 2013). A infecção crônica por HCV afeta globalmente cerca de 71 milhões de pessoas, esse percentual representa um elevado impacto na saúde pública. A estimativa de pessoas que morrem a cada ano com doenças hepáticas relacionadas à hepatite C é de aproximadamente 399 mil pessoas, principalmente por cirrose e carcinoma hepatocelular (WHO, 2017).

A infecção pelo vírus da hepatite C apresenta-se de forma aguda e crônica, geralmente de forma assintomática, o que dificulta o diagnóstico precoce e reduz as chances de tratar os indivíduos infectados no início do processo infeccioso. Esta doença é uma das principais causas de transplantes no fígado em virtude do processo inflamatório causado pela infecção. A cronificação dos pacientes com hepatite C ocorre em média de 80% dos casos, porém 20% destes pacientes conseguem eliminar o vírus espontaneamente (BERSUSA *et al.*, 2012; MELLO, 2013; BRASIL, 2015b).

Dada a cronificação da doença, alguns fatores podem ser preditivos para a persistência da infecção e o avanço para as formas mais graves da doença, tais como, a idade avançada, sexo masculino, diabetes, obesidade, coinfeção pelos vírus HBV/HIV, esteatose hepática e etilismo. Estes por sua vez, podem contribuir com a suscetibilidade para o desenvolvimento da doença crônica e inflamatória, podendo conferir ao paciente maior predisposição a desenvolver a doença (SCHEEL; RICE, 2013).

Contudo, outro componente importante para a cronificação da doença hepática é a desregulação da resposta imunológica do hospedeiro, pois ela desempenha um papel importante na depuração imune viral. Um claro exemplo é a sinalização alterada e/ou exarcebada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que podem comprometer e eliminação do vírus e propiciar o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Neste contexto, nota-se que há uma grande necessidade de identificar possíveis biomarcadores precoces que auxiliem na identificação da predisposição ao desenvolvimento da forma mais grave da doença hepática (NELSON *et al.*, 2001; STEINKE & BORISH, 2006; FALLAHI *et al.*, 2012).

Uma terapia promissora aprovada pelo Ministério da Saúde para o manejo da hepatite C crônica aborda um novo regime livre de interferon. A terapêutica utilizada contém antivirais de ação direta (DAAs) que atingem com sucesso altas taxas de resposta virológica

sustentada (RVS) >90% dos casos, reduzindo o risco de mortes por cirrose hepática (BRASIL, 2015b).

Em contra partida, com o surgimento dos DAAs contra o HCV, o panorama do tratamento da hepatite C está sofrendo grandes modificações e ampliações no que diz respeito ao acesso rápido ao diagnóstico e tratamento dos pacientes com hepatite C aguda ou crônica. Uma melhoria substancial da RVS deve ser observada com estes novos antivirais de ação direta tanto para pacientes *naïves* quanto para aqueles pacientes com recidiva ou não responsivos. Esse fato reitera a importância de estudarmos a interação da resposta imunológica dos pacientes frente a presença ou ausência do vírus e o que pode estar relacionado à eficácia ou falha a terapia, tornando os pacientes vulneráveis ao HCV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatite C: Aspectos gerais, Epidemiológicos e Clínicos

O vírus da hepatite C constitui um dos problemas mais sérios de saúde pública do mundo, podendo causar doença crônica como fibrose hepática progressiva e carcinoma hepatocelular (HCC) em consequência da viremia persistente (WHO, 2017).

Na maioria dos casos, o curso natural da hepatite C é lento e progressivo e esse processo acaba induzindo a cronificação dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C. Por ser uma doença assintomática, em média 70% a 85% dos casos de infecção pelo HCV progredem para hepatite C crônica enquanto cerca de 10% a 20% dos indivíduos infectados são capazes de eliminar o vírus espontaneamente (GALE; FOY, 2005; BRASIL, 2008; LEITEMPERGUER; BECK, 2009; ALAZAWI *et al.*, 2010; ABDELWAHAB, 2016).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que aproximadamente 71 milhões de pessoas no mundo estejam cronicamente infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) sob o risco de desenvolverem cirrose e câncer de fígado (WHO, 2017). No Brasil, as regiões de maior prevalência de pessoas infectadas com o vírus da hepatite C são a região Norte com 2,1% da população, seguida da região Centro-Oeste 1,3%, região Sudeste 1,3%, região Sul 1,2%, Distrito Federal 0,8% e a região Nordeste com 0,7% (BRASIL, 2010).

2.2 Estrutura e organização genômica do vírus da hepatite C

A descoberta do vírus da hepatite C foi elucidada somente na década de 80 por Choo e colaboradores em 1989 nos Estados Unidos que identificou o vírus da hepatite não-A e não-B, denominando-o vírus da hepatite C (CHOO, QL *et al.*, 1989). A identificação do vírus sucedeu-se com sucesso através de técnicas de biologia molecular, utilizando o plasma de um chimpanzé cronicamente infectado pelo vírus da hepatite C (CHOO, QL *et al.*, 1991, 1994).

O vírus da hepatite C pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *Hepacivirus* (CHOO, QL *et al.*, 1989) medindo cerca de 30 a 60nm de diâmetro. A partícula viral é constituída por um envelope lipídico (no qual se encontram as glicoproteínas E1 e E2), um capsídeo protéico (formado por capsômeros) e pelo genoma (constituído por uma única hélice linear de fita simples de RNA ácido ribonucléico, com polaridade positiva de aproximadamente 9.600 nucleotídeos) (STRAUSS, 2001; SKLAN *et al.*, 2009). (**Figura 1**)

A cadeia de RNA é composta por duas regiões terminais altamente conservadas e não codificadoras (UTR) 5' e 3' presentes na partícula viral e necessárias para tradução e replicação do genoma. Entre estas, uma única poliproteína com 3.000 aminoácidos é capaz de clivar uma sequência codificadora chamada de ORF (do inglês open reading frame). A poliproteína é clivada por uma peptidase de sinal na região estrutural do gene em 10 diferentes proteínas virais; as estruturais são: Core, E1 e E2 e as não estruturais (NS): NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B e a membrana peptídica p7 (que separa as proteínas estruturais das não estruturais e que contribui na montagem das partículas virais do HCV) (LAUER; WALKER, 2001).

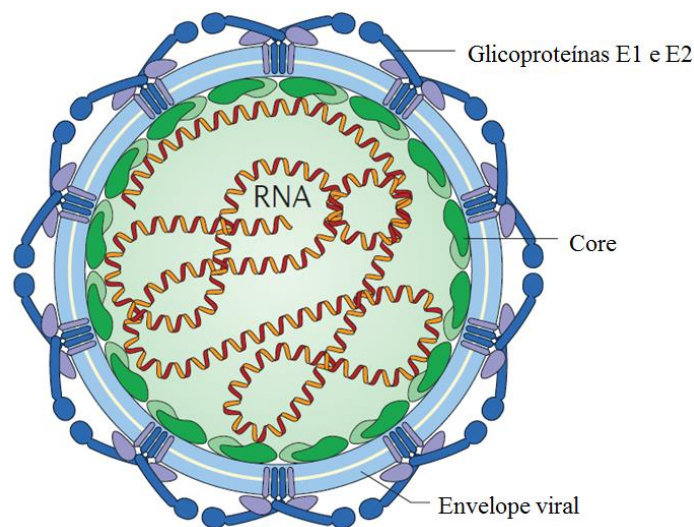


Figura 1: Representação esquemática do vírus da hepatite C.
Fonte: Adaptado de LINDEBACH; RICE, (2013).

2.2.1 Proteínas Estruturais e Não Estruturais

As proteínas estruturais do vírus são clivadas em três proteínas: a proteína do Core (altamente conservada) e as glicoproteínas do envelope viral (E1 e E2), que fazem parte da organização da partícula do vírus. A glicoproteína E2 contém regiões hiper-variáveis (HVR) que sofrem seleção constante por mutação. E essas mutações podem ocasionar a evasão da resposta imune do hospedeiro (SAEED et al., 2014). Estas glicoproteínas do envelope E1 e E2 do HCV facilitam a ligação e entrada do vírus nas células hospedeiras e são alvos de anticorpos neutralizantes (SUN; BRUSIC, 2015). **(Figura 2)**

A proteína **NS2** é uma autoprotease do HCV que desempenha atividades autocatalíticas e ainda pode estar envolvida no processo de montagem do vírus (SUZUKI *et al.*, 2007; POPESCU *et al.*, 2011). A proteína **NS3** é uma serina protease que medeia a liberação proteolítica das proteínas não estruturais NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (BLIGHT *et al.*, 2003; LINDENBACH; RICE, 2005). A proteína **NS4 - NS4A** é uma pequena proteína

essencial que atua como um cofator para serina protease NS3 (BLIGHT *et al.*, 2003) e a proteína **NS4B** que tem a função de atuar na formação de complexos de replicação do vírus, fazendo com que o RNA viral e as proteínas se associem durante a replicação viral (DIMITROVA *et al.*, 2003; SAEED *et al.*, 2014).

A proteína **NS5** - **NS5A** desempenha um importante papel na resistência contra o IFN- α , pois ela pode ser capaz de interferir com a atividade da proteína cinase (MACDONALD; HARRIS, 2004; APPEL *et al.*, 2005). A proteína **NS5B** é uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) considerada um alvo para o desenvolvimento de terapias antivirais. Ela também é capaz de replicar o genoma viral formando um complexo de replicação de RNA ligado à membrana. Todas as proteínas NS do vírus de alguma forma contribuem com o processo do ciclo de vida do HCV, este processo inclui ligação, entrada, fusão, tradução do RNA e replicação do vírus (EGGER *et al.*, 2002; KIM; CHANG, 2013). A proteína P7 é membro de uma classe de proteínas que alteram a permeabilidade viral denominada "viroporinas". As viroporinas são pequenas proteínas virais capazes de oligomerizar, formar poros hidrofílicos e canais iônicos na membrana de células hospedeiras. A consequência da expressão dessas proteínas durante a infecção é alterar as funções celulares e fisiológicas das células (STEINMANN *et al.*, 2007; STEINMANN; PIETSCHMANN, 2010; WOZNIAK *et al.*, 2010; KIM; CHANG, 2013; MADAN; BARTENSCHLAGER, 2015).

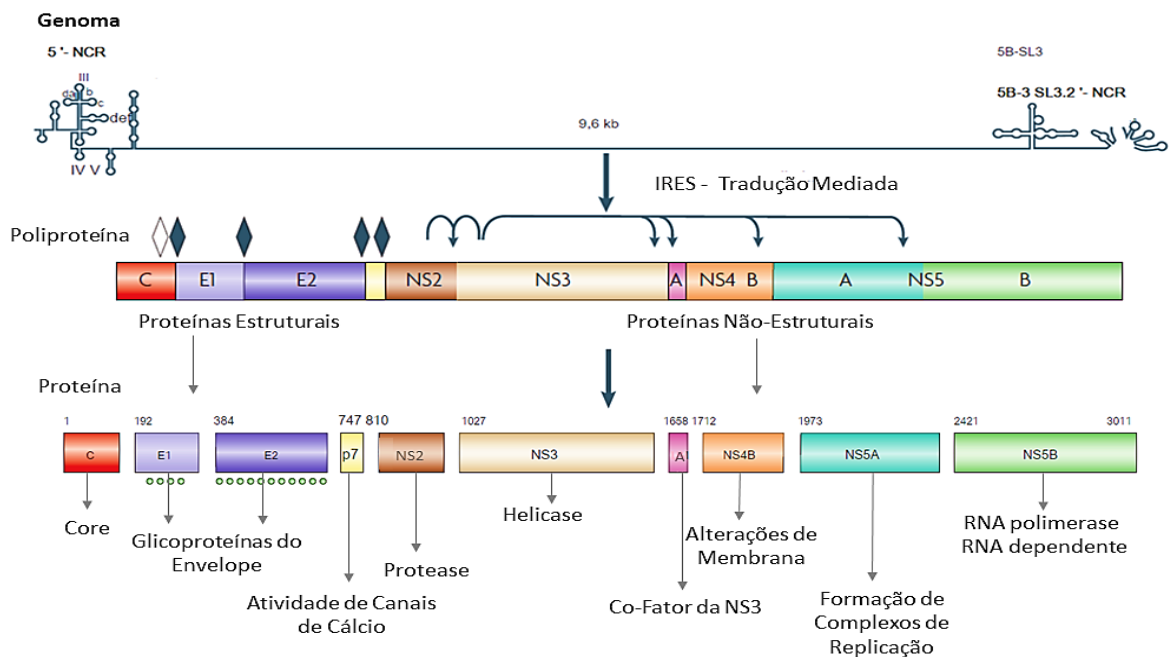


Figura 2: Estrutura do genoma do vírus da hepatite C.

Fonte: Adaptado de MOURADPOUR *et al.*, 2007.

2.3 Genótipos e subgenótipos

Os genótipos estão simultaneamente distribuídos no mundo todo (**Figura 3**). É notável que exista um padrão geográfico quanto à distribuição na diversidade genética do HCV. Após a descoberta do vírus da hepatite C inúmeros estudos foram feitos a fim de identificar os genótipos e seus respectivos subgenótipos. A antiga classificação do HCV incluíam-se seis genótipos, porém a classificação mais recente inclui sete genótipos (NAKANO *et al.*, 2011). A partir de sequenciamentos e análises filogenéticas estudos demonstraram a sequência completa das regiões codificantes do HCV e constataram que havia uma sequência adicional de novos isolados. Estes identificaram com precisão o genótipo sete a partir do sangue de emigrantes proveniente da República Democrática do Congo, sugerindo a presença deste genótipo do HCV até então não reconhecido na África Central (MURPHY *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2014).

O cenário epidemiológico dos genótipos do HCV no mundo tem prevalência do genótipo 1 em 83,4 milhões (46,2%), sendo que cerca de um terço deste genótipo está distribuído no Leste Asiático. O genótipo 3 também é prevalente a nível mundial, sendo responsável por 54,3 milhões (30,1%), sendo este prevalente no Sul da Ásia. Já os genótipos 2 - 16,5 milhões (9,1%), 4 - 15,0 milhões (8,3%) e 6 - 9,8 milhões (5,4%) são responsáveis pela maioria de casos remanescentes de hepatite C em todo o mundo. Estes genótipos são encontrados no Leste Asiático, Norte da África e no Oriente Médio, respectivamente. Por outro lado, o genótipo 5 é representado por um número muito baixo de casos de hepatite C, compreendendo 1,4 milhões (<1%) de todos os casos de hepatite C, encontrado em sua maioria no Sul e Leste da África Subsaariana. Observa-se ainda, que os genótipos do HCV são predominantes na maioria dos países do mundo, independentemente do status econômico (GOWER *et al.*, 2014; MESSINA *et al.*, 2015; ABDEL-GHAFFAL *et al.*, 2015).

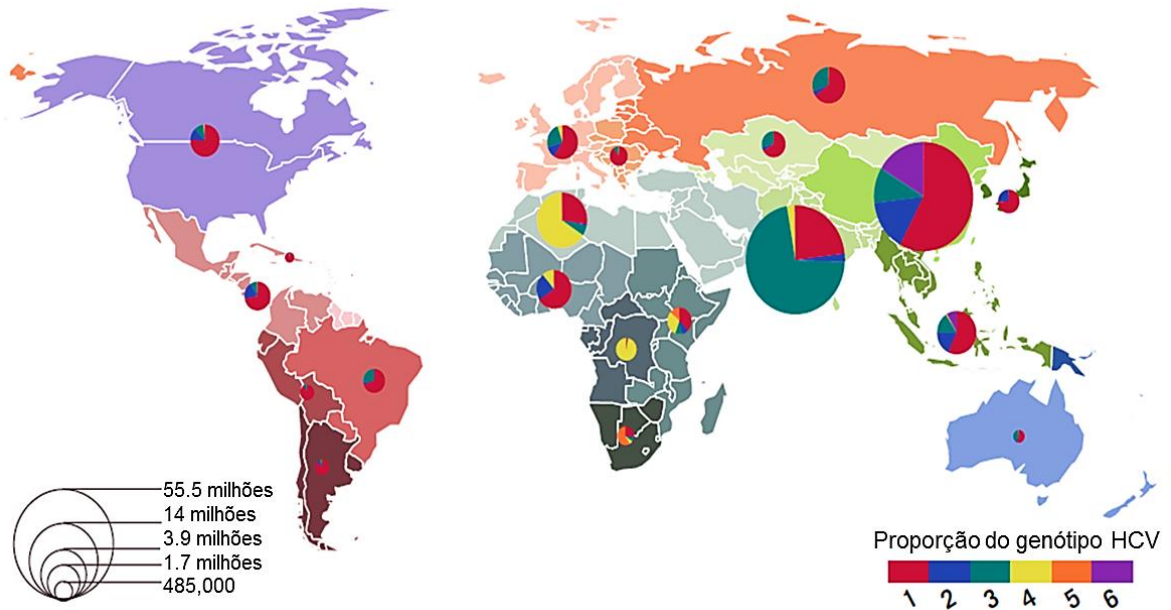


Figura 3: Distribuição epidemiológica dos genótipos do vírus da hepatite C no Mundo.

Fonte: MESSINA *et al.*, 2015; WHO, 2016.

No Brasil, um levantamento epidemiológico de todas as macro-regiões do país e do Distrito Federal entre 2005 a 2007, estimou em 1,38% a prevalência global de indivíduos infectados pelo HCV. As regiões que apresentaram maior índice de soropositividade pelo HCV são as regiões Norte e Nordeste, variando de 0,68% e 2,10%, respectivamente. De modo geral, o perfil de distribuição geográfica do Brasil em relação aos genótipos e subgenótipos têm predomínio do genótipo 1, subgenótipos 1a, 1b, seguido do genótipo 3, subgenótipos 3a e subgenótipo 2b. Este perfil de frequência dos genótipos e subgenótipos encontrados na população brasileira dentre as macro-regiões confirmam os dados descritos na literatura (PEREIRA *et al.*, 2013).

Estudo realizado por Torres *et al.*, (2009) no Estado do Amazonas entre o ano de 2005 a 2007 demonstrou um índice de descarte sorológico de bolsas reativas para o vírus da hepatite C de 0,32% em 82.851 doações de sangue. A frequência dos genótipos entre os doadores HCV-RNA positivos foi de 87,1% do genótipo 1 e 12,9% do genótipo 3. Um dado interessante apresentado neste estudo foi a prevalência do genótipo 3 encontrado somente na capital, Manaus, enquanto o genótipo 1 foi encontrado na capital e no interior do estado.

Dados semelhantes publicados por Araújo *et al.*, (2011) no Estado do Amazonas com 69 pacientes com HCV⁺ confirmam a maior prevalência do genótipo 1, seguido do genótipo 3 e 2. O estudo ainda mostrou a frequência dos genótipos em relação ao sexo masculino e feminino. Foi observada maior prevalência do genótipo 1 (76,1%), 2 (4,3%) e 3 (19,6%) nos homens quando comparados com as mulheres 1 (54,2%), 2 (20,8%) e 3 (25%). O genótipo 2 e

3 do HCV foram encontrados somente em pacientes moradores da cidade de Manaus, reforçando a hipótese de que a cidade é a porta de entrada para diferentes genótipos do HCV e posterior distribuição para o interior do Estado do Amazonas.

Análise filogenética de 231 cepas de HCV isoladas no Brasil de 1995 a 2007 por Lampe *et al.*, (2010) revelou variações importantes no padrão de transmissão do HCV entre os subgenótipos. Dentre os subgenótipos mais encontrados destacam-se os subgenótipos 1a = 89, 1b = 56 e 3a = 86. Os resultados indicam que provavelmente na segunda metade do século XX surgiram as principais variações do HCV no país.

Outro estudo de prevalência de genótipos e subgenótipos do HCV analisaram 698 sequências do gene NS5B do HCV em diversos estados brasileiros, incluindo: Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP) da região Sudeste, Goiás (GO) e Mato Grosso do Sul (MS) da região centro-oeste, Amapá (AP) e Rondônia (RO) da região norte e Rio Grande do Sul (RS) da região sul. As cepas mais prevalentes do HCV dentre esses estados brasileiros, estão inclusas 1a = 321, 1b = 170 e 3a = 185 subtipos do HCV. Nesta mesma análise filogenética ainda no Brasil, foram encontradas espécies de genótipos incomuns de HCV, revelando a existência de múltiplas introduções e transmissões autóctone do genótipo 2 = 13, genótipo 4 = 6 e genótipo 5 = 3 (LAMPE *et al.*, 2013).

2.4 Transmissão do vírus da hepatite C

Até o ano de 1993 houve um grande índice de infecção parenteral de indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados, pois não haviam testes de detecção para o vírus da hepatite C nos bancos de doação de sangue (BRASIL, 2008). Os maiores índices de infecção por HCV são de usuários de drogas intravenosas e de pessoas que tiveram exposição percutânea, como tatuagens, piercings, procedimentos odontológicos, procedimentos com podólogos e manicures que não utilizam material estéril ou material descartável (BRASIL, 2011).

A transmissão do vírus da hepatite C ocorre principalmente pela via parenteral. Entretanto, existem outras vias de transmissão, uma delas é através da transmissão sexual sendo pouco freqüente – menos de 1% em parceiros estáveis; essa estatística aumenta em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco (VANDELLI *et al.*, 2004). Uma pequena fonte de risco de transmissão é através da via vertical e perinatal. Outro risco que ocorre com menos frequência é através das secreções orgânicas, como a saliva, o leite

materno e o sêmen, pois podem conter algumas partículas infecciosas do vírus (PASTORE *et al.*, 2006; INDOLFI; RESTI, 2009).

A característica que a doença se apresenta é de forma assintomática, oligossintomática ou associada a sintomas inespecíficos. É importante destacar, que geralmente o diagnóstico ocorre de forma incidental (quando não há intenção), por vezes, ocorre durante a triagem sorológica para doação de sangue ou exames médicos de rotina (BRASIL, 2017).

Os pacientes que evoluem para um quadro de infecção crônica, frequentemente desenvolvem complicações como esteatose, fibrose hepática, aparecimento de nódulos regenerativos que podem resultar em insuficiência hepática, cirrose e descompensação hepática, caracterizada por alterações sistêmicas e hipertensão portal, evoluindo com ascite, varizes esofágicas e encefalopatia hepática (BATALLER; BRENNER, 2005; FRIEDMAN; 2008).

2.5 Abordagens Diagnósticas

Os testes virológicos desempenham um papel fundamental no diagnóstico da infecção por HCV no que diz respeito à tomada de decisões terapêuticas e avaliação da resposta virológica ao tratamento. Para determinar o diagnóstico virológico da infecção pelo HCV são realizados testes laboratoriais, que consistem em ensaios diretos capazes de detectar a presença de ácidos nucleicos do HCV (HCV-RNA), quantificar ou caracterizar os componentes das partículas virais e os ensaios indiretos que detectam a presença de anticorpos específicos para o HCV (anti-HCV) no soro do paciente (GHANY *et al.*, 2009; CDC, 2013; GUPTA *et al.*, 2014).

A partir da descoberta do vírus da hepatite C muitos testes têm sido desenvolvidos a fim de detectar, caracterizar e quantificar as partículas virais do HCV. Os ensaios laboratoriais ficaram cada vez mais sensíveis e específicos. Para a identificação do anti-HCV é realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) ou o ensaio de quimioluminescência. Além disso, também pode ser realizado o teste Recombinant Immunoblot Assay (RIBA) que detecta as proteínas do vírus. No entanto, para a confirmação da reatividade sorológica torna-se necessário a confirmação de testes moleculares que visam detectar o RNA do HCV, como o teste de ácidos nucleicos (NAT) que detecta a replicação ativa do HCV (GUPTA *et al.*, 2014).

Atualmente, para o diagnóstico e monitoramento da hepatite C o Ministério da Saúde juntamente com a Vigilância em Saúde e Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV/SVS/MS) recomenda a confirmação diagnóstica através de testes moleculares

qualitativos e quantitativos. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos são utilizados para genotipagem do HCV, uma ferramenta importante na gestão clínica, capaz de identificar diversos genótipos, subgenótipos e populações mistas do HCV (BRASIL, 2015b).

Para avaliação do grau de acometimento hepático é estabelecido o método de exame considerado padrão-ouro por meio da biópsia hepática. A biópsia hepática é um procedimento invasivo que requer uma estrutura apropriada e hospitalização. Portanto, quando indisponível ou contraindicada recomenda-se a realização de métodos não invasivos como a elastografia hepática transitória que permite a estratificação dos graus de fibrose realizada por diferentes metodologias e também por meio da aplicação dos escores APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) e FIB-4 (*Fibrosis-4*), ambos métodos são amplamente validados e recomendados pela OMS desde 2014 (WHO, 2014).

Os escores APRI e FIB-4 são métodos não invasivos, que determinam tanto o grau de fibrose hepática quanto definem o esquema terapêutico. Os valores dos escores APRI e FIB-4 são realizados através de cálculo matemático simples utilizando os resultados dos exames laboratoriais de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), contagem de plaquetas e a idade do próprio paciente durante o tratamento e acompanhamento do paciente com hepatite C crônica. Porém, esses valores devem ser calculados a cada seis meses a fim de obterem resultados fidedignos (BRASIL, 2015b; 2017).

Fórmula para calcular o valor de APRI (*AST to Platelet Ratio Index*):

$$\text{APRI} = \frac{\text{Valor de AST (UI/L)}}{\frac{\text{Limite Superior Normal de AST (UI/L)}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)}}} \times 100$$

Fórmula para calcular o valor de FIB-4 (*Fibrosis-4*):

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Idade (anos) x AST (UI/L)}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{) x } \sqrt{\text{AST (UI/L)}}} \times 100$$

Os resultados obtidos de APRI e FIB-4 devem ser correlacionados com a escala de METAVIR (*Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis*), observando os pontos de cortes preestabelecidos conforme descrito na **Tabela 1**. (BRASIL, 2017).

Tabela 1: Caracterização de fibrose moderada e cirrose conforme valores de APRI e FIB-4.

METAVIR	APRI (baixo corte)	APRI (alto corte)	FIB-4 (baixo corte)	FIB-4 (alto corte)
METAVIR \geq F2 (Fibrose moderada)	0,5	1,5	1,45	3,25
METAVIR F4 (Cirrose)	1,0	2,0	-	-

Fonte: (BRASIL, 2017).

O escore Child-Pugh (*Child-Turcotte-Pugh*) é um sistema de pontuação que serve para distinguir a cirrose compensada da cirrose descompensada e também é capaz de avaliar o grau de deteriorização da função hepática (BRASIL, 2015b).

2.6 Ciclo do vírus da hepatite C

A entrada do HCV representa o início de uma infecção, um processo altamente orquestrado e essencial para a infecção e disseminação viral. As etapas de entrada e replicação do vírus incluem a ligação e fixação do vírus nos receptores de superfície dos hepatócitos, fusão, transcrição do RNA, montagem e liberação das partículas virais do HCV (QIAN *et al.*, 2016).

Um dos fatores de entrada do HCV nos hepatócitos requerem inúmeras proteínas da célula do hospedeiro, inclusive glicosaminoglicanos (GAGs), o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R), receptor scavenger classe B tipo I (SRBI), tetraspanina CD81 encontrada na superfície de vários tipos de células, como os hepatócitos, linfócitos B e T, as lectinas ligadoras de manose (L- SIGN e DC-SIGN) e duas proteínas de junção: Claudina-1 (CLDN1) e Ocludina (OCLN). Essas proteínas são essenciais para a entrada do vírus, pois é provável que elas interajam na região hipervariável-I da glicoproteína E2 do nucleocapsídeo (PRECIADO *et al.*, 2014).

Recentemente foi mostrado que a infecção pelo HCV está firmemente associada com o metabolismo dos lipídios. É importante ressaltar que os lipídios desempenham um papel importante em vários processos do ciclo de vida do HCV, principalmente a endocitose (BRANCHE *et al.*, 2016).

O ciclo de replicação do HCV ocorre após a entrada bem sucedida do vírus que geralmente ocorre pela indução de endocitose mediada por clatrina e ocludina (BLANCHARD *et al.*, 2006; ZEISEL *et al.*, 2013; LYU *et al.*, 2015). O processo de replicação do vírus ocorre no citoplasma e as etapas são as seguintes: 1) a ligação dos receptores da célula alvo com receptores da proteína E2 do vírus; 2) a entrada na célula e liberação do RNA viral genômico no citoplasma; 3) tradução do RNA, processamento das poliproteínas virais estruturais e não estruturais e formação de um complexo de replicação associado à membrana intracelular; 4) replicação do RNA viral com a fita de RNA positiva para a síntese de uma fita de RNA negativa intermediária que serve como molde para a produção de novas cópias de moléculas positivas de RNA; e por último 5) liberação de vírions infecciosos na circulação a partir de células infectadas (BERTINO *et al.*, 2016) (Figura 4).

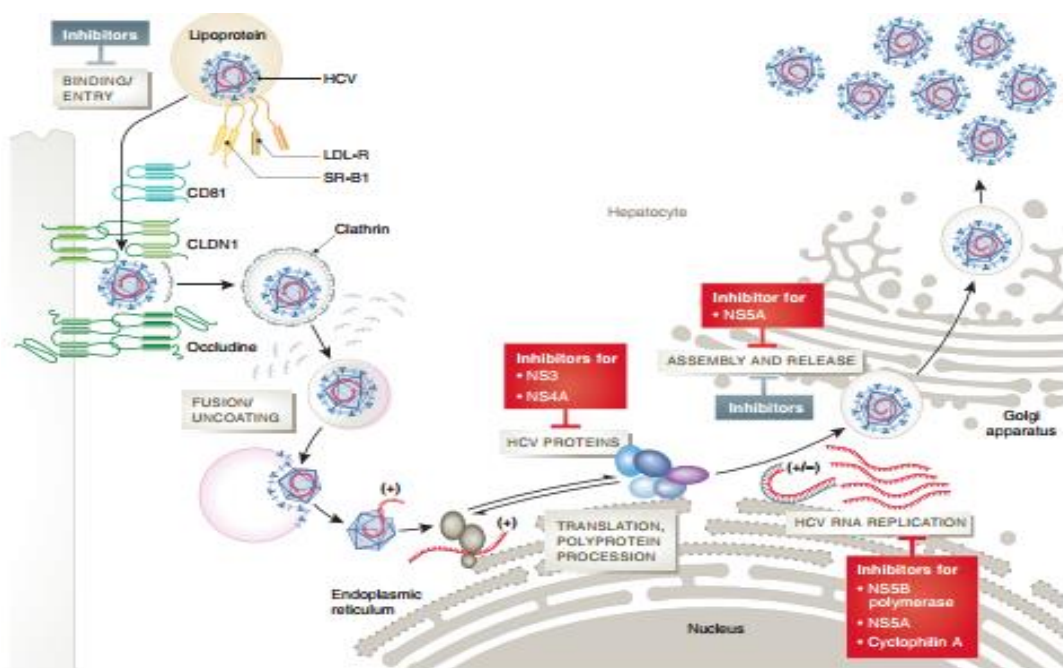


Figura 4: Esquema do ciclo de replicação do vírus da hepatite C.
Fonte: Lange *et al.*, (2014).

2.7 Imunopatogênese da infecção do vírus da hepatite C

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa ativa contra qualquer tipo de infecção. O principal papel da resposta imune inata é suprimir a replicação viral e induzir a produção de citocinas como o IFN do tipo I (α e β), capaz de causar um efeito antiviral nas células, conduzir a resolução da infecção e estimular a imunidade adaptativa. Após a entrada

do vírus na célula, a imunidade inata é desencadeada através do reconhecimento dos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) pelas células natural killer, células dendríticas e células de Kupffer através dos PRRs (receptores de reconhecimento padrão) resultando, portanto, no reconhecimento do RNA viral (IRSHAD *et al.*, 2013; SCHOGGINS; RICE, 2013).

A resposta imune no fígado é desencadeada pelo reconhecimento do patógeno através da sinalização e interação do RNA do HCV aos receptores do tipo Toll-like (TLR 3, TLR 7 e TLR 8) expressos no endossoma das células dendríticas, células de Kupffer e nos hepatócitos, então estas células farão o reconhecimento do RNA viral de cadeia dupla e o RNA de cadeia simples. Logo, ocorre à dimerização do TLR e a ativação da proteína adaptadora TRIF (domínio TIR contendo adaptador que induz IFN- β), conduzindo uma cascata de sinalização intracelular e a produção de diversas citocinas, incluindo o IFN do tipo I, que irá induzir uma das principais finalidades da defesa imune que é iniciar o recrutamento de células imunitárias e direcionar o tipo de resposta imune (LIU; JUNIOR, 2010; HORNER *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015).

Outro importante receptor da imunidade inata no reconhecimento de PAMPs é o sensor citoplasmático RIG-I (gene indutível por ácido retinóico I) que reconhece RNA viral contendo trifosfato 5' (ppp). Após a interação com PAMP, RIG-I serve para desencadear cascatas de sinalização intracelulares na célula infectada para estimular a produção de IFN e a expressão de genes estimuladores de Interferon (ISGs). Os fatores de transcrição de Interferon (IRF 3 e 7) e o fator de transcrição NF-Kappa β (NF- $\kappa\beta$) são os primeiros fatores de transcrição ativados em resposta a infecção por HCV. A produção de IFN tipo I consiste em suprimir a infecção pelo HCV com funções antivirais e imunomoduladoras (SAITO *et al.*, 2008; KAWAI; AKIRA, 2008; LIU; JUNIOR, 2010; ROSEN, 2013; PARK *et al.*, 2014; REHERMANN, 2015; GARDINER, 2015; KELL *et al.*, 2015).

Durante a infecção pelo HCV as células Natural Killer (NK) desempenham um papel importante no processo de erradicação do vírus. As células NK são as mais abundantes do fígado e normalmente são ativadas na fase precoce da infecção. Ao serem ativadas pelo IFN-I, as células NK podem eliminar os hepatócitos infectados pelo vírus de forma direta, ou seja, por mecanismo citolítico ou de forma indireta, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o IFN- γ e o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral - alfa), essas citocinas pró-inflamatórias irão, portanto, induzir um estado antiviral nas células do hospedeiro. Além disso, as células NK possuem um importante papel na proteção contra agentes infecciosos e na destruição de células tumorais. As células NK intra-hepáticas têm função anti-fibrótica

através da inibição das HSCs (células estreladas hepáticas). Supreendentemente, as células NK hepáticas ativadas contribuem no controle da lesão hepática. Por outro lado, quando essas células NK estão inativas ou comprometidas, elas permitem que o vírus continue invadindo as células do hospedeiro. E a continuação desse processo irá resultar numa infecção persistente (GOLDEN-MASON; ROSEN, 2013).

Os antígenos do HCV são detectados e capturados no fígado pelas células dendríticas mielóides e então são levados para os linfonodos, onde maturam e expressam na sua superfície o antígeno leucocitário humano (HLA) classe I e II e as moléculas co-estimulatórias que servem para estimular as células T helper (Th) “naive” a se diferenciarem em células Th1 através da produção da interleucina 12 (IL-12). As células Th1 quando ativadas secretam IL-2 e IFN- γ para induzir a ativação e proliferação das células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs). Os CTLs quando sensibilizados, se encaminham para o fígado e reconhecem peptídeos do vírus através da apresentação via HLA classe I na superfície dos hepatócitos infectados. Os CTLs liberam perforinas, granzimas, FAS ligante e TNF- α , que por sua vez, conduz à morte das células infectadas, a erradicação do HCV e o início do processo inflamatório (HIROISHI *et al.*, 2010).

Os sistemas imunes inatos e adaptativos funcionam de forma cooperativa com objetivo de controlar a invasão de diversos patógenos. A resposta imune adaptativa é estabelecida após a estimulação de antígenos através da interação entre o MHC I, II e o TCR presentes em linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺, respectivamente. A produção de citocinas possui um papel relevante na ativação de células, estado antiviral, inflamação e eliminação do patógeno (HIROISHI *et al.*, 2010).

A produção de citocinas é frequente em indivíduos que tentam resolver a infecção pelo HCV (clearance viral), o que sugere uma associação entre a produção de citocinas antivirais e uma evolução clínica favorável (LLOYD *et al.*, 2007). Existem alguns mecanismos dos quais a resposta de células T não são bem sucedidas, e isso incluem alguns fatores, como: a exaustão de células T, o escape viral no reconhecimento de células T e o aumento na produção de células T reguladoras (Tregs) (HALLIDAY *et al.*, 2011) (**Figura 5**).

A população de células Tregs expressam constitutivamente CD25⁺ e secretam a citocina IL-10, que tem sido implicado na supressão da resposta das células TCD4⁺ e TCD8⁺ de forma ativa, portanto, aumentam os riscos de desenvolvimento de uma infecção crônica (HALLIDAY *et al.*, 2011). Os linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3 (Tregs) exercem seu papel em diferentes apresentações clínicas, bem como à supressão da resposta das células TCD4⁺, o controle da inflamação crônica e os danos hepáticos (BOLACCHI *et al.*, 2006).

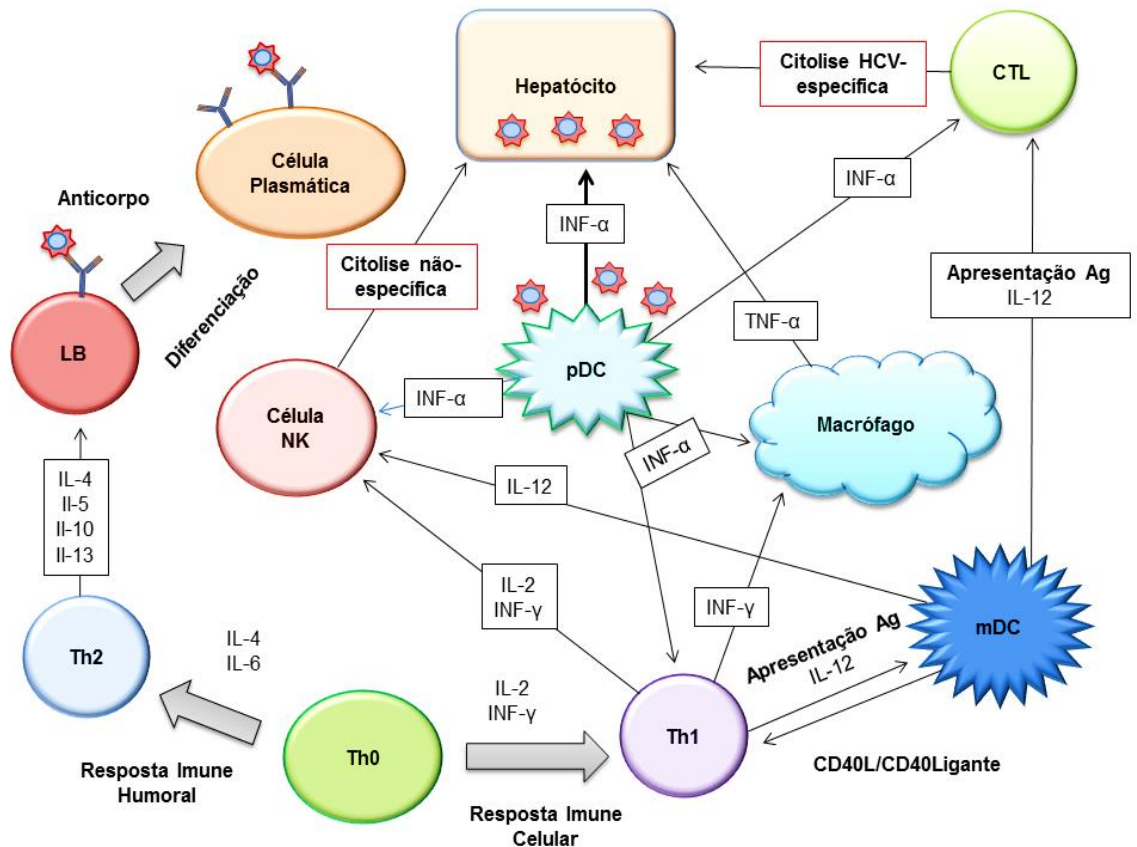


Figura 5: Mecanismo da Resposta imune na hepatite C.
Fonte: Adaptado de HIROISHI *et al.*, (2010)

Um estudo feito por Manigold *et al.*, (2016) com uma coorte de chimpanzés revela os dados de que as células Tregs suprimem a produção de IFN- γ e induzem a morte celular na infecção aguda e crônica por HCV. As células Tregs controlam as células T específicas do HCV não só na infecção crônica, mas também após a recuperação, de modo que elas contribuem ativamente para a manutenção das células TCD8⁺ de memória, controlando a sua ativação e a prevenção na apoptose.

Além das citocinas, as quimiocinas são pequenas moléculas quimiotáticas envolvidas na resposta imune inflamatória. As quimiocinas e seus receptores têm a finalidade de modular o influxo das células efetoras imunes. Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias como a MCP-1 - Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos (MCP-1/CCL2), Regulação da

Ativação da Célula T Normal Expressada e Secretada (RANTES/CCL5) e a Interleucina 8 (IL-8/CXCL8) que após a secreção podem ser induzidas durante a resposta imune para o sítio de infecção, enquanto outras quimiocinas são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos (LE et al., 2004; DEVRIES *et al.*, 2006; PALOMINO & MARTI, 2015). Em contra partida, algumas quimiocinas têm dupla função: inflamatória e homeostática, como por exemplo, a quimiocina Monocina Induzida pelo Interferon-gama (MIG/CXCL9) e a Proteína 10 induzida por interferon-gama (IP-10/CXCL10) que agem de acordo com o microambiente (LE et al., 2004). Além disso, as quimiocinas estão sendo estudadas e relacionadas na terapêutica do câncer, pois elas parecem estar envolvidas no melhor prognóstico e eficácia clínica da imunoterapia de tumores sólidos (DUBINETT *et al.*, 2011).

O dano hepático causado na infecção crônica pelo HCV é constitutivamente atribuído aos mecanismos imunomediados pela resposta do hospedeiro. A alta produção de citocinas pró-inflamatória IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17 e anti-inflamatória IL-10 e o fator de crescimento transformante (TGF- β) estão intimamente relacionados com o aumento da lesão hepática e sistêmica pelo HCV. A lesão hepática crônica é a resposta do tecido hepático manifestada pela constante deposição da matriz extracelular (MEC) fibrótica e nódulos altamente aparentes, dando origem à troca gradual do tecido hepático normal por tecido fibrótico não funcional, resultando em quadros de fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC) uma doença terminal que resulta em insuficiência hepática e requer transplante hepático (TREYER; MUSCH, 2013; MARTINEZ-ESPARZA *et al.*, 2015).

A cirrose hepática é orquestrada por diversas vias de sinalização que medeiam à produção de citocinas pelas HSCs, uma das principais células que conduzem a fibrose no fígado, pois elas produzem em excesso colágeno tipo I e o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMPS) durante o desenvolvimento da fibrose hepática. O TGF- β , TNF- α e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) são importantes na iniciação e manutenção da fibrose no fígado, pois medeiam a fibrogênese hepática e também estimulam a expressão do gene da MEC nas HSCs (ZHOU *et al.*, 2014; LURIE *et al.*, 2015; SEKI; BRENNER, 2016).

2.8 Históricos da abordagem terapêutica

Considerando a alta prevalência de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite C é de grande relevância obter um tratamento eficaz a fim de eliminar o vírus. Os principais

objetivos do tratamento da hepatite C são: 1) Obter resposta virológica sustentada; 2) Evitar a progressão da infecção e suas consequências, tais como cirrose, carcinoma hepatocelular e óbito; 3) Aumentar a qualidade e a expectativa de vida do paciente e 4) Diminuir a incidência de novos casos e reduzir a transmissão da infecção pelo HCV (BRASIL, 2018).

O Interferon alfa (IFN- α) serve para interromper a replicação viral através da estimulação da resposta imune, principalmente na ativação das células natural killer, células dendríticas e células de Kupffer. Além disso, o IFN- α aumenta o reconhecimento do antígeno pela apresentação aos linfócitos T e causa um efeito antiviral nas células (SAMUEL, 2001). O IFN- α convencional surgiu no final da década 80 antes mesmo de identificarem o vírus Não-A e Não-B, sendo um dos primeiros fármacos contra a infecção pelo HCV, as taxas de RVS na terapia com interferon são consideradas abaixo do ideal, alcançando um percentual de cura de aproximadamente 15% (HOOFNAGLE *et al.*, 1986). Habitualmente, os pacientes com hepatite C crônica eram tratados com interferon alfa2a ou interferon alfa2b por aplicações de injeções semanais num longo período de tempo, que duraria em média de 24 semanas até 48 semanas (THOMPSON, 2014).

A Ribavirina (RBV) é um análogo de guanosina que interfere com o metabolismo do RNA requerido para a replicação viral. De uso oral, a RBV foi adicionada juntamente com IFN- α para o tratamento contra o vírus da hepatite C. No Brasil, até o ano de 2015, o tratamento padrão para os pacientes com hepatite C era a administração de IFN- α -2b combinado com a ribavirina, obtendo uma eficácia considerável e aumento de 41% nas taxas de resposta virológica, que resulta na diminuição de complicações e recaídas após o tratamento. Estudos que avaliaram a eficácia do IFN- α quando administrado sozinho, sugerem que a terapia com IFN- α + RBV é mais eficaz do que o IFN- α por si só, pois a RBV melhora a cinética da resposta precoce à terapêutica de pacientes em tratamento inicial (MCHURCHISON *et al.*, 1998; MANNIS *et al.*, 2001; FRIED *et al.*, 2002; HOOFNAGLE, 2005; FELD *et al.*, 2010).

A terapia dupla de IFN-peg+RBV foi implantada em 2001 para aumentar as taxas de cura no tratamento da hepatite C crônica, uma vez que o IFN-peguilado tem um aumento maior na sobrevida da farmacocinética do medicamento do que o IFN convencional. Estudos mostram que pacientes que aderiram à terapia tripla de IFN-peg+RBV obtiveram uma boa resposta virológica. Entretanto, ainda era visto uma grande dificuldade na continuidade deste esquema terapêutico, que geralmente está associado principalmente aos efeitos colaterais, a forma farmacêutica e o longo período de tempo, variando de 24 a 48 semanas, esses são

alguns fatores que reduziam potencialmente as taxas de adesão ao tratamento em muitos pacientes (ADINOLFI; GUERRERA, 2015).

No entanto, no ano de 2011, um novo passo foi dado em relação ao tratamento, quando a Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (EUA) aprovou uma série de agentes antivirais de ação direta (DAAs), que relataram resultados promissores em resposta ao tratamento (**figura 6**). Dentre os DAAs, o Boceprevir e o Telaprevir, são pertencentes á primeira classe de inibidores de proteases para o tratamento de pacientes crônicamente infectados com genótipo 1 do HCV. Esses fármacos agem especificamente nas proteínas não estruturais do vírus NS3/NS4A e NS5A e são importantes alvos terapêuticos a fim de erradicar o vírus (MILAZZO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-YUNQUEIRA *et al.*, 2013).

Outra estratégia terapêutica para inibir a replicação viral foi aprovada em 2013, na tentativa de melhorar os cuidados para os indivíduos infectados. Os inibidores de polimerase interferem na replicação viral ao se ligarem a NS5B RNA dependente da RNA polimerase (RdRp) do HCV. O Sofosbuvir demonstrou eficácia >90% no tratamento de pacientes infectados com o vírus da hepatite C (SOLVALDI, 2015).

Nos anos de 2014 e 2015, houve um grande marco para a história da hepatite C, a novidade era o surgimento de novos DAAs com a combinação de fármacos que não requerem a administração em associação com Interferon. Surge então uma nova era livre de IFN peguilado (ASSELAH; MARCELLIN, 2013; BERTINO *et al.*, 2016) que permite um curto tempo de duração do tratamento, menos efeitos colaterais e que atinge altas taxas de RVS, além de obter maior adesão ao tratamento (GENTILE *et al.*, 2016). A administração oral diária de um único comprimido consiste em inibidores de proteases (IP): Simeprevir (VAIDYA; PERRY, 2013), Daclatasvir e (GOHIL, 2015), Ledipasvir (KUMTHIP; MANEEKARN, 2015). Estes novos medicamentos inibem a ação das proteases, impedindo com que novas cópias do vírus sejam feitas.

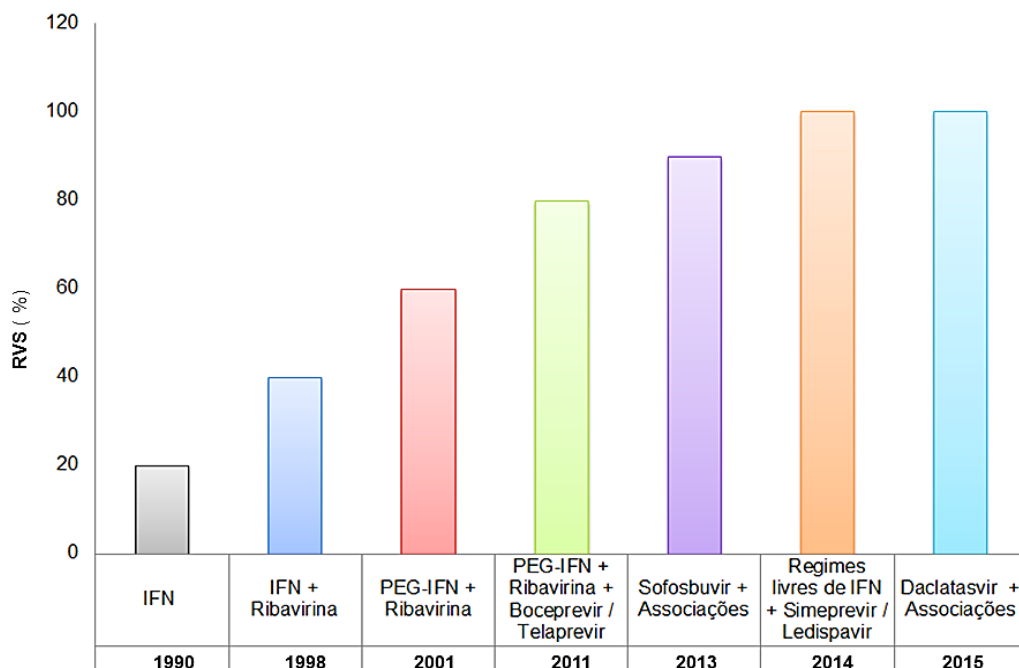


Figura 6: Histórico da terapia contra o vírus da hepatite C.

Fonte: Adaptado de ADINOLFI *et al.*, (2015); HAJARIZADEH *et al.*, (2013).

Dentre os revolucionários antivirais de ação direta o protocolo de diretrizes das hepatites virais aborda os fármacos aprovados em 2015 pelo Ministério da Saúde e Vigilância Sanitária e que estão sendo disponibilizados pelo SUS para o tratamento da hepatite C crônica. Dentre eles estão: Sofosbuvir em associação com Simeprevir / Daclatasvir, estes são antivirais de ação direta que agem diretamente nas proteínas do vírus impedindo o processo de replicação (BRASIL, 2015a). Também está disponível no SUS a associação dos fármacos Ombitasvir (3D) (inibidor de NS5A), Dasabuvir (inibidor não nucleosídico da polimerase NS5B), Veruprevir (inibidor de protease NS3/4A) e Ritonavir (potencializador farmacocinético) (BRASIL, 2017), Ledispavir (inibidor do complexo enzimático NS5A), Elbasvir (inibidor do complexo enzimático NS5A) e Grazoprevir (inibidor da protease NS3/4A), essas novas opções terapêuticas tem o objetivo de expandir o acesso à assistência ao paciente para o tratamento desta doença, de modo a proporcionar melhoria na qualidade e expectativa de vida dos pacientes. A associação desses fármacos deve ser administrada de acordo com o genótipo e a interação medicamentosa (BRASIL, 2018).

A terapia preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil obedece alguns critérios de avaliação e monitoramento aos pacientes, incluindo: pacientes portadores de histórico de terapia antiviral para hepatite C designados “paciente experimentado com tratamento anterior”, pacientes nunca tratado para hepatite C crônica designados “pacientes virgens de tratamento”, pacientes com fibrose hepática F2 (há mais de três anos), fibrose hepática avançada F3 ou F4, pacientes com linfoma, gamopatia monoclonal, mieloma múltiplo e

outras doenças malignas, coinfeção com o HIV independentemente do grau de fibrose hepática, entre outros. Esses medicamentos atuam diretamente nas proteínas do vírus impedindo sua replicação, além de constituir um avanço no tratamento da hepatite C crônica (BRASIL, 2015b).

Sofosbuvir (SOF) é um potente inibidor análogo nucleotídeo da RNA polimerase dependente de RNA na região NS5B. Ele atua no bloqueio da ação da polimerase, uma enzima essencial para a replicação do vírus. O tratamento de Sofosbuvir tem duração de 12 a 24 semanas, administrado por via oral, em dose única de 400mg. É aprovado para o tratamento da infecção crônica por HCV para os genótipos 1, 2, 3 e 4. Sofosbuvir pode ser administrado em combinação com Daclatasvir, Simeprevir ou Ribavirina. Para obtenção da sua eficácia nunca é indicado ser administrado sozinho (HEPATITE-SOFOSBUVIR, 2014; SOLVALDI, 2015) (figura 7).

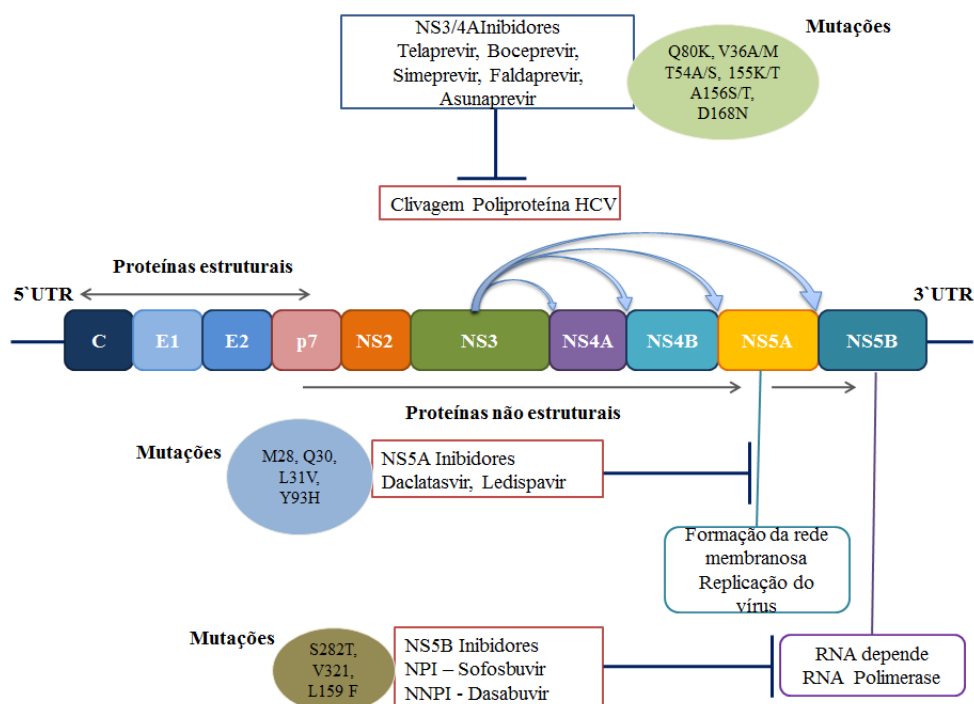


Figura 7: Ação dos DAAS.

Fonte: Adaptado de AHMED, FELMLEE, (2015).

O resultado positivo do tratamento da hepatite C é a ausência do RNA do HCV determinado pela RVS. Pacientes infectados com HCV genótipos 1, 2 e 3 que alcançaram RVS reduziram significativamente o risco de morte pela doença (BACKUS *et al.*, 2011). O tratamento com Daclatasvir mais Sofosbuvir em pacientes infectados com HCV genótipo 1, 2, ou 3, obtiveram taxas de RVS >90%, em apenas 12 semanas de tratamento, inclusive em pacientes que não responderam ao tratamento anterior com Telaprevir ou Boceprevir (ASSELAH, 2014).

Simeprevir (SMV) é um inibidor da protease NS3/NS4 do vírus da hepatite C de segunda geração. Além disso, Simeprevir é um composto macro cíclico que se liga não covalentemente e inibe a ação da serina protease do HCV NS3 / 4A, uma proteína que é responsável pela clivagem e processamento da poliproteína do HCV codificada. Ele tem maior especificidade e afinidade de ligação nas proteínas NS3 / 4A do vírus da hepatite C (HEPATITE-SIMEPREVIR, 2016).

O tratamento de Simeprevir tem duração de 12 a 24 semanas, administrado por via oral, em dose única de 150mg. É indicado para pacientes com genótipo 1, com ou sem cirrose. Podendo ser administrado com Sofosbuvir / Ribavirina, mas nunca é indicado ele sozinho (HEPATITE-SIMEPREVIR, 2016). Um estudo aberto de fase 2, randomizado, incluíram 167 pacientes com hepatite C crônica, genótipo 1, tratados com Sofosbuvir e Simeprevir, com ou sem ribavirina, por 12 ou 24 semanas. E o resultado foi obtido com apenas 12 semanas de tratamento e uma elevada taxa de RVS >90% nos pacientes infectados com o vírus (LAWITZ *et al.*, 2014).

Daclatasvir é um inibidor da proteína não estrutural NS5A, uma proteína codificada pelo HCV. Ele tem a função de inibir o complexo de replicação do RNA viral e a montagem do vírus (GAO *et al.*, 2010; GOHIL, 2015). O tratamento de Daclatasvir tem duração de 12 e 24 semanas, administrado por via oral, em diferentes doses de 30 e 60mg. Podendo ser administrado com Sofosbuvir / Ribavirina. É indicado para os genótipos 1, 3 (EASL, 2015; DAKLINZA, 2016) e 4 (BRASIL, 2015a).

Um estudo de fase III incluindo 152 pacientes com hepatite C, tratados com Sofosbuvir em associação com Daclatasvir alcançaram taxas de RVS com 96% em 12 semanas de tratamento para o genótipo 3 (NELSON *et al.*, 2015). Esta mesma combinação de drogas antivirais para pacientes infectados com HCV genótipo 1 alcançaram RVS de 95% com 12 semanas de tratamentos para pacientes não cirróticos e 24 semanas para aqueles pacientes com cirrose hepática (POL *et al.*, 2016).

Até pouco tempo, a única opção terapêutica para a hepatite C crônica era a terapia baseada em IFN que visava deter a progressão da doença hepática. Porém, os resultados desse tratamento eram bastante limitados devido à baixa eficácia, pouca tolerabilidade e frequentes efeitos colaterais.

Em contra partida, com o surgimento dos novos antivirais de ação direta (DAAs) contra o HCV, o panorama do tratamento da hepatite C está sofrendo grandes modificações, especialmente em pacientes considerados difíceis de tratar, trazendo a esperança de melhoria para aqueles pacientes que possuem o vírus da hepatite C. No entanto, pouco se sabe das

alterações imunes estimuladas pela utilização deste novo regime, tais como, a produção de citocinas e quimiocinas que podem atuar como preditores de resposta ao tratamento devido a estimulação imune, o que poderia estar intimamente relacionado à eficácia ou não do tratamento.

Em virtude dessa vulnerabilidade, é fundamental identificar a relação dos novos medicamentos com o organismo devido a forte interação do vírus x hospedeiro e potencialmente identificar biomarcadores de resposta terapêutica que poderiam ser identificados precocemente, antes mesmo da falha ou sucesso relacionados à nova terapia com DAAs.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a resposta imune celular, perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes com hepatite C crônica tratados com antivirais de ação direta.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever o genótipo do vírus da hepatite C;
- Caracterizar as subpopulações de linfócitos T e B, células NK e NKT, células dendríticas e monócitos em pacientes com hepatite C crônica antes e após tratamento com antivirais de ação direta e no grupo controle;
- Quantificar as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TNF- α e quimiocinas MCP-1 (CCL-2), IL-8 (CXCL-8), RANTES (CCL-5), IP-10 (CXCL-10) e MIG (CXCL-9) em pacientes com hepatite C crônica antes e após tratamento com antivirais de ação direta e no grupo controle.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo para caracterização da resposta imune celular, perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes com hepatite C crônica tratados com antivirais de ação direta.

4.2 População de estudo

Para a realização deste estudo foram selecionados os grupos de pacientes (HCV⁺) e grupo controle (CN), coletados na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), respectivamente. Ambas as fundações estão localizadas na cidade de Manaus, Estado do Amazonas.

As amostras de pacientes HCV⁺ foram estratificadas com base na resposta virológica sustentada definida como a ausência de RNA do HCV plasmático detectável 12 semanas após o término do tratamento e a Não RVS, definida como presença de RNA de HCV plasmático 12 semanas após o término do tratamento. Estes pacientes também foram selecionados em pacientes não tratados anteriormente (*naives*) e pacientes previamente tratados com outros regimes (experimentados).

4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes diagnosticados com hepatite C crônica, de ambos os sexos, com presença ou ausência de fibrose, pacientes com insuficiência renal crônica, pós-transplante de fígado e outros órgãos sólidos, sinais clínicos ou evidências ecográficas sugestivas de cirrose hepática (varizes de esôfago, ascite, alterações da morfologia hepática compatíveis com cirrose), insuficiência hepática, ausência de carcinoma hepatocelular, entre outras, que correspondiam as indicações de tratamento do protocolo clínico e diretrizes terapêuticas do Ministério da Saúde que procuraram atendimento na FMT-HVD.

Foram excluídos pacientes co-infetados para os marcadores de triagem sorológica para o vírus da Hepatite B (HBsAg, NAT-HBV), HIV (anti-HIV, NAT-HIV), HTLV (anti-HTLV), Doença de Chagas (teste de ELISA) e Sífilis (VDRL).

Os indivíduos enquadrados no grupo controle foram candidatos a doação de sangue da fundação HEMOAM, de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 a 65 anos, que não apresentaram sorologia positiva para os testes de triagem sorológica para o vírus da Hepatite C (anti-HCV, NAT-HCV), Hepatite B (anti-HBc, HBsAg, NAT-HBV), HIV (anti-HIV, NAT-HIV), HTLV (anti-HTLV), Doença de Chagas e Sífilis (VDRL).

4.4 Coleta dos dados e do material biológico

Os pacientes com hepatite C crônica foram selecionados por demanda espontânea do atendimento de rotina do ambulatório de **hepatopatologia** da FMT-HVD no período de Abril de 2016 a Março de 2018. E os **indivíduos** do grupo controle foram coletados na Fundação HEMOAM no período de Maio a Setembro de 2016.

Os participantes deste estudo foram convidados a participar da pesquisa assinando o *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* (TCLE). Em seguida, foi aplicado um questionário contendo variáveis demográficas, tais com: o nome do candidato, a data do nascimento, número de registro, data da coleta, sexo e presença de comorbidades.

Alguns dados clínicos e bioquímicos foram coletados do prontuário eletrônico dos pacientes na FMT-HVD, incluindo o grau de fibrose, carga viral, genótipo do HCV e transaminases ALT/AST (Alanina aminotransferase e Aspartato aminotransferase), respectivamente.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa em tubos com sistema de coleta a vácuo, foram 2 tubos de 5 mL, um tubo contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2 Franklin Lakes, New Jersey, USA) e um tubo contendo gel separador (Gel BD SST® II Advance® Franklin Lakes, New Jersey, USA). Todas as amostras coletadas foram transportadas ao Laboratório Multidisciplinar da **Fundação** HEMOAM para realização da imunofenotipagem das subpopulações de células e quantificação das citocinas e quimiocinas. O fluxograma de atividades desenvolvidas nesta pesquisa foram demonstradas na **Figura 8**.

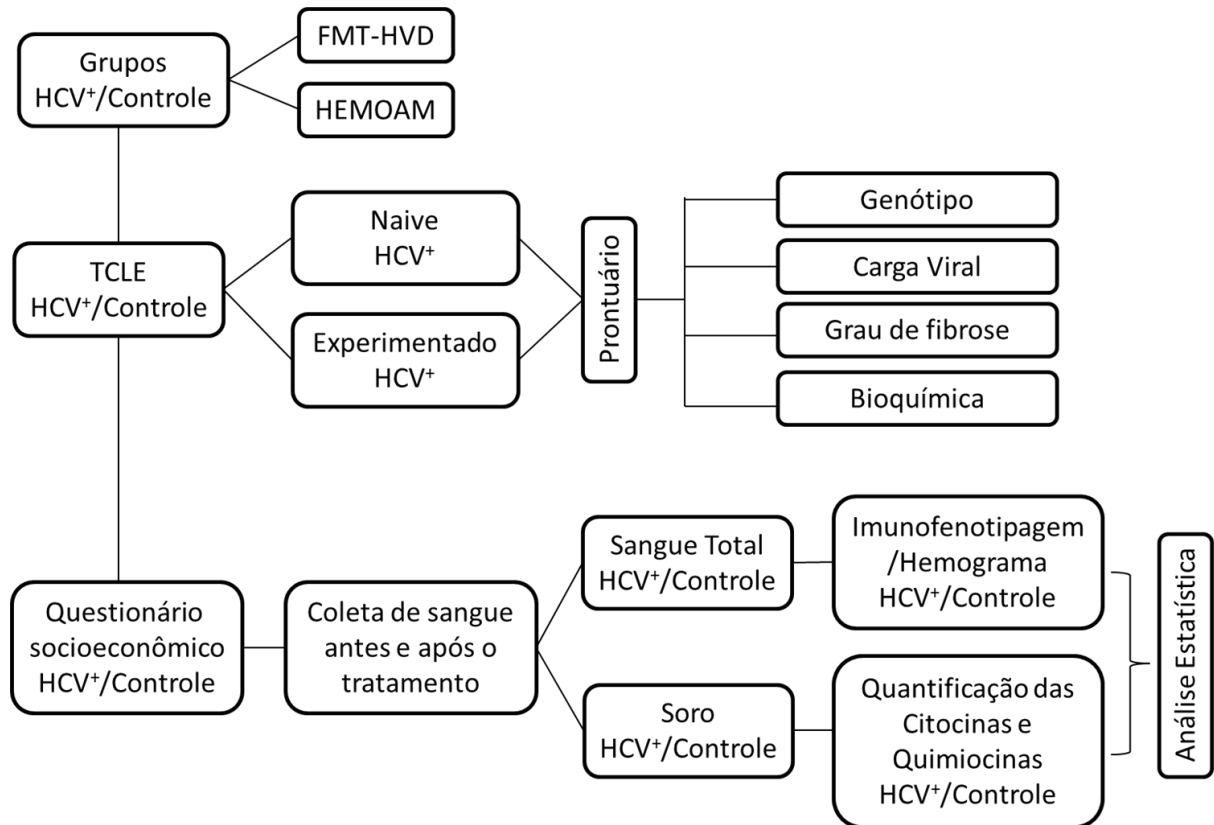


Figura 8: Fluxograma de atividades.

4.5 Imunofenotipagem Celular por Citometria de Fluxo

A Imunofenotipagem das subpopulações de células foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo através de células obtidas de sangue periférico.

As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se liga a epítomos específicos, essas amostras foram analisadas pelo Citômetro de Fluxo para a caracterização das subpopulações celulares. Neste estudo foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais, divididos em 08 tubos para a caracterização das populações celulares descrito abaixo: **(Tabela 2)**.

Tabela 2: Descrição dos clones, lotes, número de catálogos, fluorescências, marca e perfil celular dos anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.

Tubo	Anticorpo	Fluorescência	Clone	Lote	Cat.Nº	Marca	Perfil Celular
01	-	-	-	-	-	-	CN
02	Human Anti-CD3	PercP	SK7	2229903	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. T CD4 ⁺ CD8 ⁺ e Ativação Celular CD69 ⁺
	Human Anti-CD4	PE	MT310	00070964	R0805	<i>Dako</i>	
	Human Anti-CD8	FITC	B9.11	34	A07756	<i>Beckman Coulter</i>	
	Human Anti-CD69	APC	FN50	68183	555533	<i>BD® Biosciences</i>	
03	Human Anti-CD5	FITC	UCHT2	63832	555352	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. B e B1
	Human Anti-CD19	PE	HIB19	66211	555413	<i>BD® Biosciences</i>	
04	Human Anti-CD3	PercP	SK7	2229903	347344	<i>BD® Biosciences</i>	Células NK e NKT
	Human Anti-CD16	FITC	368	70067	555406	<i>BD® Biosciences</i>	
	Human Anti-CD56	PE	B159	05803	555516	<i>BD® Biosciences</i>	
05	Human Anti-CD14	APC	M5E2	87809	555399	<i>BD® Biosciences</i>	Monócitos e Células Ativadas
	Human Anti-CD80	PE	L307.4	57050	557227	<i>BD® Biosciences</i>	
06	Human Anti-CD14	APC	M5E2	87809	555399	<i>BD® Biosciences</i>	Células Dendríticas
	Human Anti-CD11c	PE	3.9	B140910	301606	<i>BioLegend®</i>	
	Human Anti-CD123	FITC	6H6	B140008	306014	<i>BioLegend®</i>	
07	-	-	-	-	-	-	CN
08	Human Anti-CD4	FITC	RPA-T4	75982	555346	<i>BD® Biosciences</i>	Linf. Treg
	Human Anti-CD25	PercP	MEM-181	521760	PC218T100	<i>BD® Biosciences</i>	

Inicialmente foi incubado 100µL de sangue total nos tubos 1-6 e 200µL nos tubos 07 e 08 com 1µL de cada anticorpo nos seus respectivos tubos. Estes foram homogeneizados e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2ml de solução de lise (*BD FACS™ Lysing Solution, Cat. N° 349202, Lot: 24299, BD® Biosciences San Jose, CA, USA*), diluída 10 vezes em água destilada.

Os tubos contendo a solução de lise foram incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado por inversão e acrescentado 2 mL de PBS-W (8,0g de NaCl, 1,16g de Na₂HPO₄, 0,2g de KH₂PO₄, 0,2g de KCl e 5,0g de BSA, qsp 1L H₂O destilada, pH: 7,2) para lavagem do pellet formado. Posteriormente, os tubos contendo PBS-W foram homogeneizados e centrifugados novamente a 1500rpm/5min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão e adicionado 300µL de solução fixadora (40,0g de HO(CH₂O)_n CH₂OHNaCl, 0,106g de NaOH, 40,04G de C₂H₄AsOONa e 26,6g de NaCl, qsp 200mL de H₂O destilada, pH: 7,2) nos tubos 1-7, sendo armazenados em geladeira até o momento da leitura.

Aos tubos 07 e 08, foi adicionado 2mL de PBS-P (8,0g de NaCl, 1,16g de Na₂HPO₄, 0,2g de KH₂PO₄, 0,2 de KCl, 5,0g de BSA e 5,0g de Saponina, qsq 1L H₂O destilada, pH: 7,2) para permeabilização celular. Os tubos foram homogeneizados novamente e incubados por mais 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500rpm/5min.

O sobrenadante foi descartado e acrescentado 2mL de PBS-W para lavagem do pellet formado. Os tubos contendo PBS-W foram homogeneizados e centrifugados novamente. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi incubado por mais 20 minutos com PBS-P (tubo 07) e 100µL de anticorpo intracelular anti-FoxP3 AF647, diluído (1:10) em PBS-P (tubo 08) complementando o protocolo.

Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS-W e centrifugadas a 1500rpm/5min. Ao final o sobrenadante foi desprezado por inversão e adicionado 300µL de Solução Fixadora e armazenadas na geladeira até o momento da leitura.

A aquisição das amostras foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemoam, no Citômetro de Fluxo *FACSCalibur®* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*). Para a identificação morfométrica e imunofenotípica das células foi utilizado o programa *FlowJo* (v9.4), com o auxílio de “*gates*” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinaram características morfológicas (tamanho e

granulosidade) com características imunofenotípicas através das fluorescências dos anticorpos monoclonais utilizados para identificar as células alvos. Os gráficos utilizados foram do tipo “dot plot”, “contour plot” e histograma, pois apresentam uma melhor visualização das estratégias de análise.

4.5.1. Identificação da População de Linfócitos T CD4⁺, TCD8⁺, Linfócitos T ativados CD69⁺, Linfócitos B (CD19⁺) e B1 (CD5⁺CD19⁺).

A identificação das populações de Linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), Linfócitos T ativados (CD69⁺), Linfócitos B (CD19⁺) e B1 (CD5⁺CD19⁺) foram realizados primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 9A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Em seguida foram elaborados seis gráficos: 1) CD3 PercP x CD4 PE (**Figura 9B**); 2) CD3 PercP x CD4 PE x CD69 APC (**Figura 9C**); 3) CD3 PercP x CD8 FITC (**Figura 9D**); 4) CD3 PercP x CD8 FITC x CD69 APC (**Figura 9E**); 5) CD19 PE (**Figura 9F**); 6) CD5 FITC CD19 PE (**Figura 9G**). Em seguida foram selecionadas as populações positivas para CD3⁺CD4⁺ (Linfócitos T CD4⁺), CD3⁺CD8⁺ (Linfócitos T CD8⁺), CD19⁺ (Linfócitos B), CD5⁺CD19⁺ (Linfócitos B1).

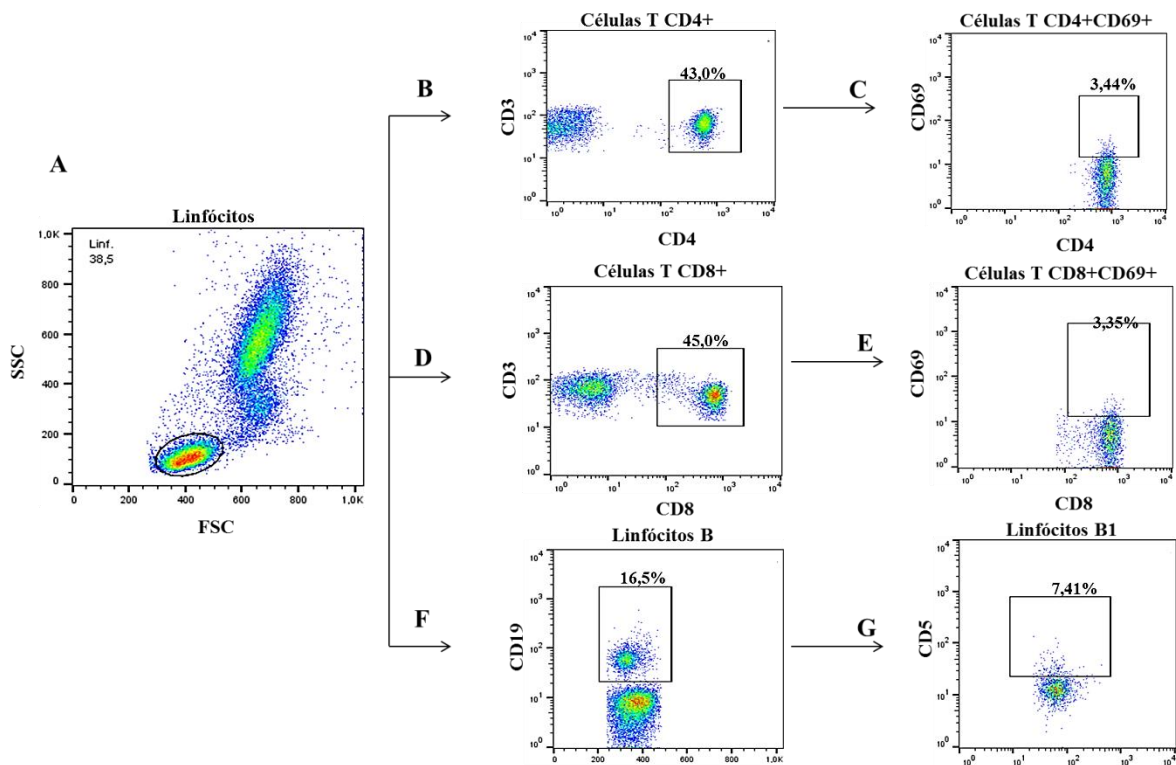


Figura 9: Identificação dos Linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), Linfócitos ativados (CD69⁺), Linfócitos B (CD19⁺) e B1 (CD5⁺CD19⁺) no programa *FlowJo* (v9.4).

4.5.2. Identificação dos Linfócitos T regulatórios (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)

A identificação dos Linfócitos T regulatórios (Treg) foi feita com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 10A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após a criação da gate, foi elaborado um gráfico de SSC x CD4 PE (**Figura 10B**). Em seguida foi criado um gráfico CD25 FITC x FoxP3 AF647 (**Figura 10C**); 3) com a população de LT CD4⁺. A população positiva para CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ foi selecionada, caracterizando os linfócitos Treg.

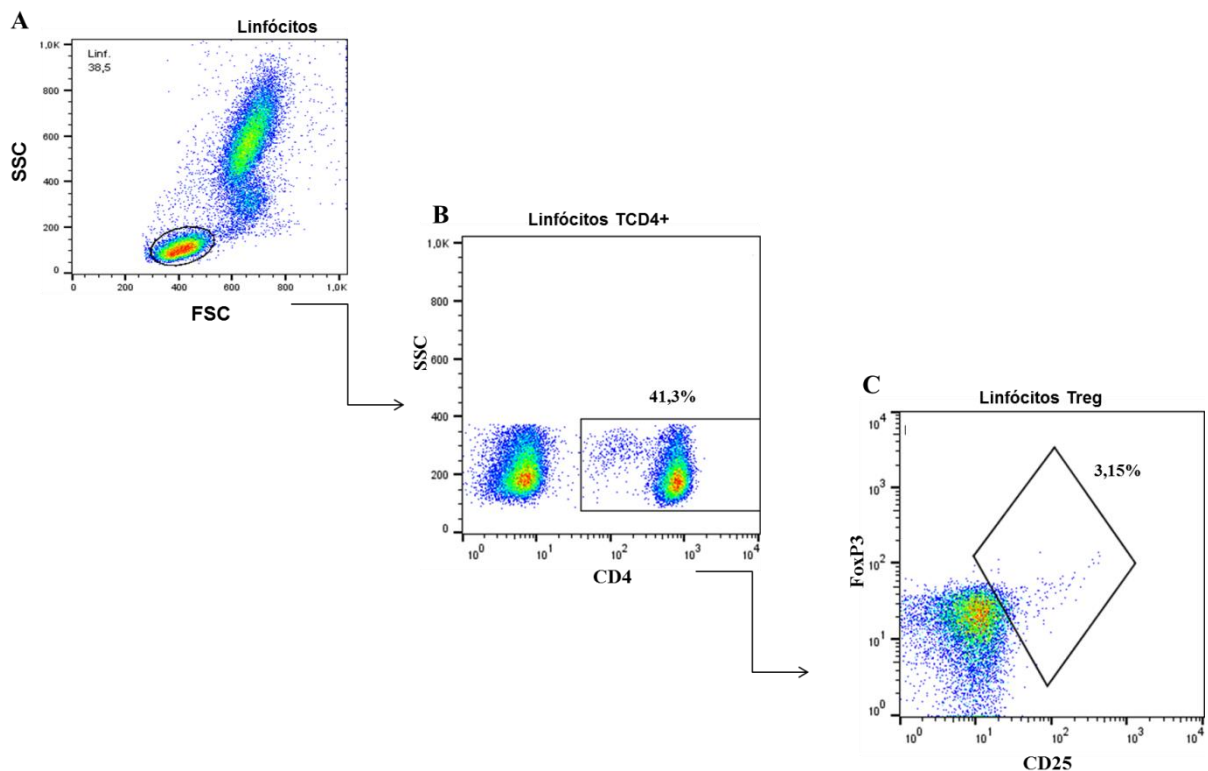


Figura 10: Identificação dos Linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) no programa *FlowJo* (v9.4).

4.5.3. Identificação da População de Células NK (CD3⁻CD16⁺CD56⁺) e NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺)

A identificação das populações de Células NK (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺) e NKT (CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺) foi realizada primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 11A**) e uma “gate” foi criada na região de linfócitos totais. Após, foi elaborado um gráfico de SSC x CD3 Percp (**Figura 11B**). Em seguida foram elaborados dois gráficos: 1) CD3⁺ PercP e CD56 PE x CD16 FITC (**Figura 11C**); 2) CD3⁻ PercP e CD56 PE x CD16 FITC (**Figura 11D**). Ao final foram selecionadas as populações CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ (Células NK) e CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺ (Células NKT).

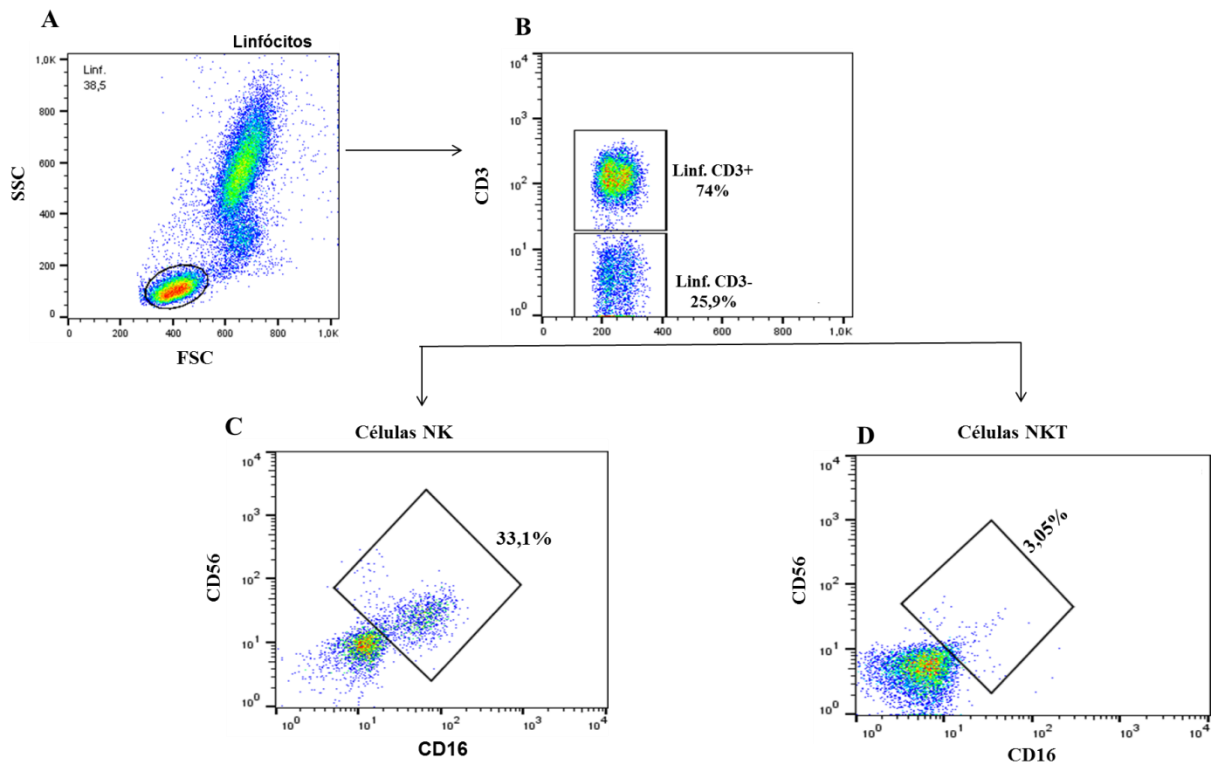


Figura 11: Identificação das Células NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$) e NKT ($CD3^+CD16^+CD56^+$) no programa *FlowJo* (v9.4).

4.5.4. Identificação dos Monócitos ($CD14^+$) e Monócitos Ativados ($CD14^+CD80^+$)

Para identificação de Monócitos e monócitos ativados foi realizado um gráfico de SSC x $CD14$ FITC (**Figura 12A**) e uma “gate” foi criada na região positiva para monócitos ($CD14^+$). Em seguida, foi feito um gráfico de $CD14$ FITC x $CD80$ PE (**Figura 12B**), selecionando a população duplo positiva ($CD14^+CD80^+$), que são conhecidas como monócitos ativados.

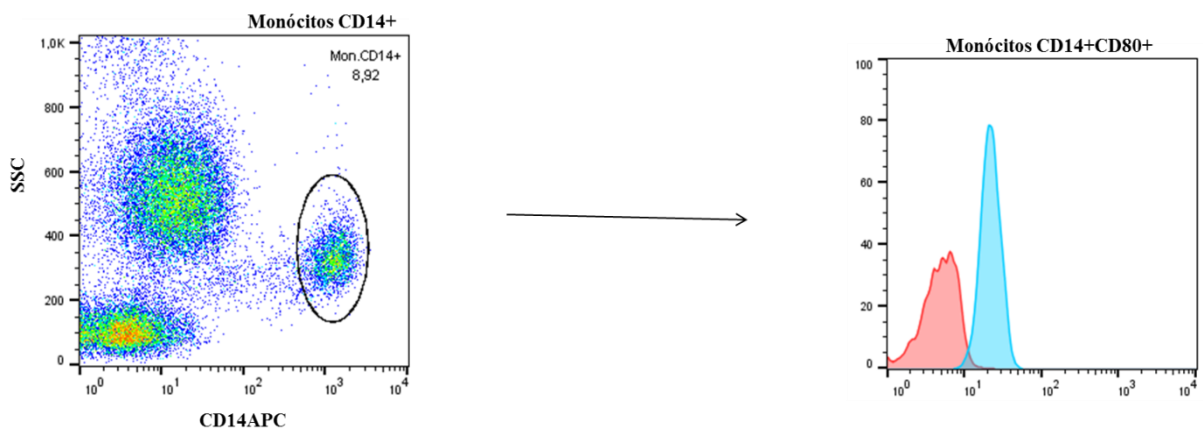


Figura 12: Identificação dos Monócitos ($CD14^+$) e Monócitos Ativados ($CD14^+CD80^+$) no programa *FlowJo* (v9.4).

4.5.5. Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14⁻CD11c⁺CD123⁻) e Plasmocitóides (CD14⁻CD11c⁻CD123⁺)

Para identificação de Células Dendríticas Mielóides (mDCs) e Plasmocitóides (pDCs) foram realizadas primeiramente com um gráfico de SSC x FSC (**Figura 13A**) e uma “gate” foi criada na região das células mononucleadas. Após, foi elaborado um gráfico de SSC x CD14 APC (**Figura 13B**) e selecionando a população CD14⁻. Em seguida foi elaborado um gráfico CD11c PE x CD123 FITC (**Figura 13C**). Ao final foram selecionadas as populações CD14⁻CD11c⁺CD123⁻ (mDCs) e CD14⁻CD11c⁻CD123⁺ (pDCs).

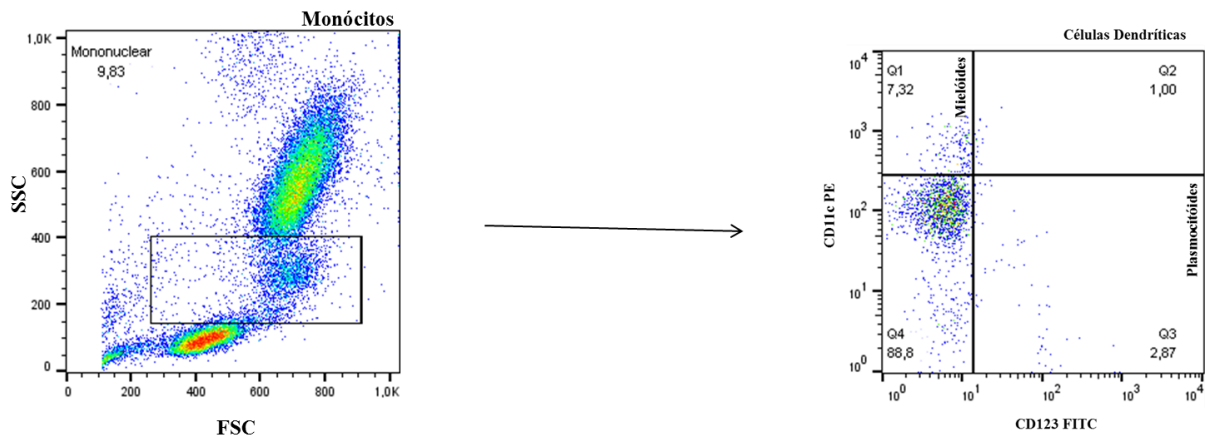


Figura 13: Identificação das Células Dendríticas Mielóides (CD14⁻CD11c⁺CD123⁻) e Plasmocitóides (CD14⁻CD11c⁻CD123⁺) no programa *FlowJo* (v9.4).

4.6 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas Plasmáticas por CBA (Cytometric Bead Array)

A quantificação de citocinas e quimiocinas das amostras de plasma dos pacientes e controle foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) no Laboratório Multidisciplinar do HEMOAM, com o Kit *BDTM Human TH1/TH2/TH17 Cytokine* (Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca *BD[®] Biosciences*, San Diego, CA, USA) e o Kit *BD Human Chemokine*, seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As citocinas quantificadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α , e as quimiocinas MCP-1 (CCL-2), IL-8 (CXCL-8), RANTES (CCL-5), IP-10 (CXCL-10) e MIG (CXCL-9).

O Kit *BDTM CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas e quimiocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada a um anticorpo específico para cada citocina e quimiocina. A detecção das

citocinas e quimiocinas presentes na amostra é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina e quimiocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção serão quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina e quimiocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo *FACSCanto II* (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina e quimiocina será utilizado o software *FCAP-Array™* (v3.0.1).

4.7 Aspectos Éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior intitulado “*Identificação e seleção de peptídeos miméticos reativos aos soros de pacientes HCV⁺ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM), sob o CAAE N° 49652815.8.0000.0009.

4.8 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados da imunofenotipagem das subpopulações de células e a quantificação das citocinas séricas e quimiocinas foram realizadas através do software *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA). As características clínicas e demográficas, a média de intensidade de fluorescência das citocinas e quimiocinas séricas entre o grupo controle e pacientes com hepatite C foram realizadas com o teste não paramétrico *Mann-Whitney*. Para as comparações entre os grupos de três ou mais variáveis foi utilizada a variância ANOVA, seguida pelo teste de *Kruskal-Wallis* e pós – teste de Comparação Múltipla de *Dunn's*, incluindo comparação da média de intensidade de fluorescência (MFI) das subpopulações de células, citocinas e quimiocinas entre os grupos controle e pacientes com hepatite C. A significância estatística foi definida em ambos os casos em $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

Esta pesquisa iniciou com 102 participantes elegíveis para o estudo de caso-controle. Contudo, 17 pacientes não realizaram a coleta após o tratamento e apenas 87 amostras foram coletadas de sangue periférico de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C atendidos na FMT-HVD. Destas, 52 amostras são provenientes de pacientes antes do tratamento (pré-tratamento) e 35 amostras de pacientes com 12 semanas após o término do tratamento (pós-tratamento). Além disso, foram coletadas 50 amostras de **indivíduos** não infectados enquadrados como grupo controle na Fundação HEMOAM para utilizá-los como valores de referência das subpopulações de células e concentrações séricas de citocinas e quimiocinas do sangue periférico (**Figura 14**).

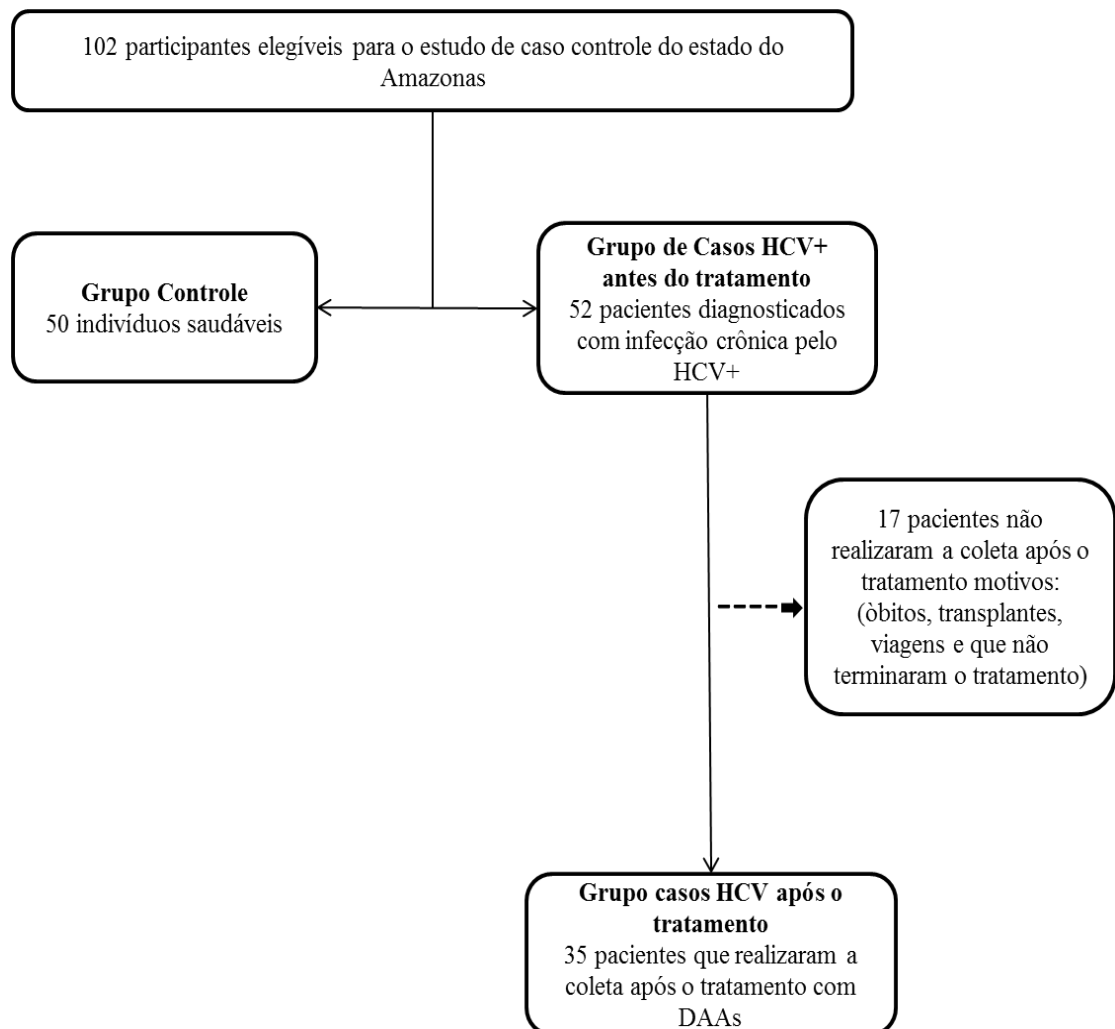


Figura 14: Fluxograma dos resultados.

5.1 Dados demográficos, características clínicas e epidemiológicas

Na **Tabela 03** estão descritos os dados demográficos, as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes Pré-Tratamento (Pré-Tto), Pós-Tratamento (Pós-Tto) e **indivíduos do** grupo controle (CN).

O grupo de pacientes com Hepatite C apresentou a média de faixa etária significativamente maior que os indivíduos do grupo controle ($58,90 \pm 13,48$; $60,43 \pm 11,69$; $32,42 \pm 11,75$), respectivamente, com valor de $p < 0,0001$. Em relação ao gênero, observamos que os pacientes com infecção pelo HCV teve predomínio do gênero feminino ($n=28$), enquanto que no grupo controle, a maioria dos indivíduos foi composta pelo gênero masculino ($n=36$).

Quanto aos genótipos do HCV, nota-se que a maioria dos pacientes apresentaram o genótipo 1 como o mais frequente, seguido do genótipo 3 e 2. Além disso, foi observado a presença do genótipo 4 em nossa região (**Anexo 01**), bem como a presença dos genótipos 1 e 2 em um único paciente. A maioria dos pacientes eram *naives* de tratamento. Todos os pacientes sujeitos ao tratamento prévio completaram as 12 ou 24 semanas de terapia. Nenhum desses pacientes interrompeu o tratamento. O número reduzido de pacientes no pós-tratamento é devido à mudança desses pacientes para a cidade de origem, óbitos, transplantes e também devido ao não término do tratamento até o momento das coletas após o tratamento, em atenção ao prazo da defesa deste trabalho.

Nota-se que a maioria dos pacientes HCV⁺ apresentou grau de fibrose hepática leve $\leq F2$ segundo a classificação do escore FIB-4, método não invasivo que indica o grau de lesão hepática. Estes pacientes não indicaram riscos significativos de doença hepática mais avançada conforme indicado pelo escore de Child – Pug, no qual a frequência maior foi enquadrada como classe A.

Entre as opções terapêuticas disponíveis, foi observado que a maioria dos pacientes trataram com Sofosbuvir + Daclatasvir (SOF+DCV), seguida de Sofosbuvir + Simeprevir (SOF+SMV) e Sofosbuvir + Ribavirina (SOF+RBV). Haja vista que, a maioria dos pacientes foram tratados com 12 semanas.

A taxa de RVS foi atingida por 94,3% dos pacientes. No entanto, a falha na resposta ao tratamento foi observada por dois pacientes infectados pelo genótipo 1, sendo que um dos pacientes atingiu RVS após o segundo tratamento com DAAs (**Anexo 2**). O outro paciente recidivou, ou seja, apresentou RNA detectável após o término da terapia. Três pacientes não conseguiram obter RVS12 devido à morte antes de dar início ao tratamento. A maioria das

mortes ocorreu em pacientes com doença hepática; as causas das mortes incluíram: 1º) Descompensação hepática e Pneumonia, 2º) Sepsis e 3º) Acidente Vascular Cerebral (AVC). Nenhuma morte relatada foi considerada associada ao tratamento.

Em relação às características hematológicas, observou-se diminuição significativa nos parâmetros de pacientes infectados pelo HCV⁺ antes e após o tratamento quando comparados ao grupo controle; tais como, o número de leucócitos totais (WBC) ($p < 0,0122a$; $p < 0,0012b$), hemácias (RBC) ($p < 0,0001a$; $p < 0,0001b$), hemoglobina (Hb) ($p < 0,0001a$; $p < 0,0001b$), hematócrito (Ht) ($p < 0,0001a$; $p < 0,0001b$) e plaquetas (PLT) ($p < 0,0001a$; $p < 0,0001b$), respectivamente (**Tabela 03**).

Parâmetros laboratoriais associados à função hepática foram avaliados no início e após o tratamento. Nota-se que melhorias foram observadas no grupo de pacientes em Pós-Tto, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina.

Tabela 3: Características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais do grupo controle, pacientes pré-tto e pós-tto.

Características	Grupo Controle (N=50)	Pacientes Pré-Tto (N=52)	Pacientes Pós-Tto (N=35)	P value
Epidemiológicas e Clínicas				
Idade (M ±DP)	32,42±11,75	58,90±13,48	60,43±11,69	<0,0001a <0,0001b
Gênero (masculino / feminino)	36/14	24/28	18/17	-
Genótipos do HCV (1/2/3/4/1+2)*	-	33/4/12/1/1*	25/2/6/1/1	-
Naive / Experimentado	-	38/11	27/8	-
≤F2 (FIB-4 <3,25)	-	27	18	-
≥F2 (FIB-4 >3,25)	-	25	17	-
Child-Pug A/B/C	-	47/3/2	31/2/2	-
Hipertensão Portal	-	13	8	-
SOF+SMV	-	13	5	-
SOF+DCV	-	34	23	-
SOF+RBV	-	3	2	-
12 / 24 semanas	-	30/19	22/13	-
RVS / Não RVS / Outros	-	-/-/17	34/1	-
Hematológicas (Média ±DP)				
WBC (unid. x 10 ⁶ /mm ³)	6,283±1,477	5,896±3,054	5,159±1,604	0,0122a 0,0012b
RBC (unid. x 10 ³ /mm ³)	5,098±0,6238	4,371±0,7961	4,482±0,5887	<0,0001a <0,0001b
Hb (g/dL)	15,07±1,825	13,37±2,197	13,26±1,570	<0,0001a <0,0001b
Ht (%)	44,52±5,630	39,36±6,411	39,59±4,302	<0,0001a <0,0001b
VCM (fL)	87,43±4,433	90,97±7,299	88,86±6,956	0,0089a 0,2839b
HCM (pg)	29,61±1,624	30,92±2,870	29,84±2,719	0,0053a 0,6616b
CHCM (g/dL)	34,00±1,746	33,97±1,190	33,57±1,066	0,5806a 0,1440b
RDW (%)	13,54±0,7290	13,81±1,090	13,95±1,077	0,5963a 0,1437b
Plaquetas (unid. x 10 ⁶ /mm ³)	247,6±55,74	173,3±92,18	186,1±83,58	<0,0001a <0,0001b
Bioquímicas				
	Valor de Referência**	(Média ±DP)	(Média ±DP)	
TGO/AST (mg/dL)	5-40 UI/L	57,78±41,69	36,95±26,18	0,0311
TGP/ALT (mg/dL)	10-55 UI/L	52,67±41,64	25,33±25,33	0,0193
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,1–1,2 mg/dL	1,675±4,566	0,9810±0,05771	0,9033

#Teste *Kruskal-Wallis*; DP: Desvio padrão; ***Genótipo**: Paciente negatizou a carga viral antes do Tratamento; paciente apresenta dois genótipos do HCV; **Naive**: Pacientes sem tratamento prévio e **Experimentado**: Paciente com mais de uma terapia; **FIB-4**: Score não invasivo para determinar fibrose hepática, FIB-4>3,25 caracteriza METAVIR ≥F2; **Hipertensão Portal**: Critérios de avaliação da hipertensão portal: Varizes esofágicas, Plaquetopenia e esplenomegalia; **SOF/SMV**: Sofosbuvir + Simeprevir; **SOF/DCV**: Sofosbuvir + Daclatasvir;

SOF/RBV: Sofosbuvir + Ribavirina; **RVS:** Resposta Viroológica Sustentada; **Não RVS:** Não houve Resposta Viroológica Sustentada; **Outros:** Inclui pacientes que foram fazer transplante, pacientes que não terminaram o tratamento a tempo de coleta e pacientes que viajaram para outros estados e **Óbitos:** 1° Descompensação hepática e Pneumonia (Não iniciou o TTo), 2° Sepse (Não iniciou o TTo) e 3° Teve AVC, porém se recuperou, não temos informações sobre a causa da morte (Iniciou o TTo); **WBC:** Glóbulos Brancos; **RBC:** Glóbulos Vermelhos; **Ht:** Hematócrito; **Hb:** Hemoglobina; **VCM:** Volume Corpuscular Médio; **HCM:** Hemoglobina Corpuscular Média; **CHCM:** Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média; **RDW:** Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (Red Cell Distribution Width); **AST:** Aspartato Aminotransferase; **ALT:** Alanina Aminotransferase. **a=** comparação do grupo controle com pacientes pré-tto; **b=** comparação do grupo controle com pacientes pós-tto. Aplicação do *Teste T não paramétrico* e *Mann Whitney*. **Valor de Referência**:** Retirado a partir de resultados de exames bioquímicos dos kits.

Na **Tabela 4** estão descritos os dados demográficos, as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com infecção crônica por hepatite C extratificados de acordo com o grau de fibrose ($\leq F2$ e $\geq F2$). Sendo assim, a média de faixa etária no grupo com fibrose moderada ($\geq F2$) foi maior que o grupo de fibrose leve ($\leq F2$). Em relação ao gênero, observamos um predomínio de pacientes com hepatite C do sexo feminino com fibrose leve, quando comparado à fibrose moderada.

Tabela 4: Características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais dos pacientes Pré e Pós-TTo extratificados conforme o grau de fibrose hepática.

Características	Pacientes Pré-Tto		Pacientes Pós-Tto		p value
	$\leq F2$ (N=26)	$\geq F2$ (N=26)	$\leq F2$ (N=18)	$\geq F2$ (N=17)	
Epidemiológicas e Clínicas					
Idade (M \pm DP)	54,12 \pm 15,47	63,69 \pm 9,138	57,89 \pm 13,43	63,12 \pm 9,164	0,0614
Gênero (masculino / feminino)	13/13	13/13	8/10	10/7	-
Genótipos do HCV (1/2/3/4/1+2)*	15/2/7/1*	18/2/5/1	12/1/4/1	13/1/2/1*	-
Naive e Experimentado	20/6	18/8	14/4	13/4	-
SOF+SMV	8	5	6	4	-
SOF+DCV	15	19	11	12	-
SOF+RBV	1	2	1	1	-
Child-Pug A/B/C	26	20/4/2	18	12/3/2	-

#Teste *Kruskal-Wallis*; DP: Desvio padrão; ***Genótipo:** Paciente negativou a carga viral antes do Tratamento; paciente apresenta dois genótipos do HCV; **Naive:** Pacientes sem tratamento prévio e **Experimentado:** Paciente com mais de uma terapia; **SOF/SMV:** Sofosbuvir + Simeprevir; **SOF/DCV:** Sofosbuvir + Daclatasvir; **SOF/RBV:** Sofosbuvir e Ribavirina; **RVS:** Resposta Viroológica Sustentada.

5.2 Perfil de Resposta Imune Celular nos pacientes com Hepatite C

A resposta imune celular foi analisada na população de pacientes com hepatite C Pré e Pós-Tto e no grupo controle. Foi avaliado o perfil celular de monócitos, células dendríticas mielóides e plasmocitóides, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, Treg, B, B1, células NK e NKT. Além dessas células, foram analisados marcadores de ativação celular.

Inicialmente foi analisado o percentual de monócitos ativados, sendo observada uma diminuição no número de células periféricas após o tratamento quando comparado ao grupo controle e o início do tratamento, respectivamente ($p < 0,0051$ e $p < 0,0120$) (**Figura 15**). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos quando comparados com o grupo controle.

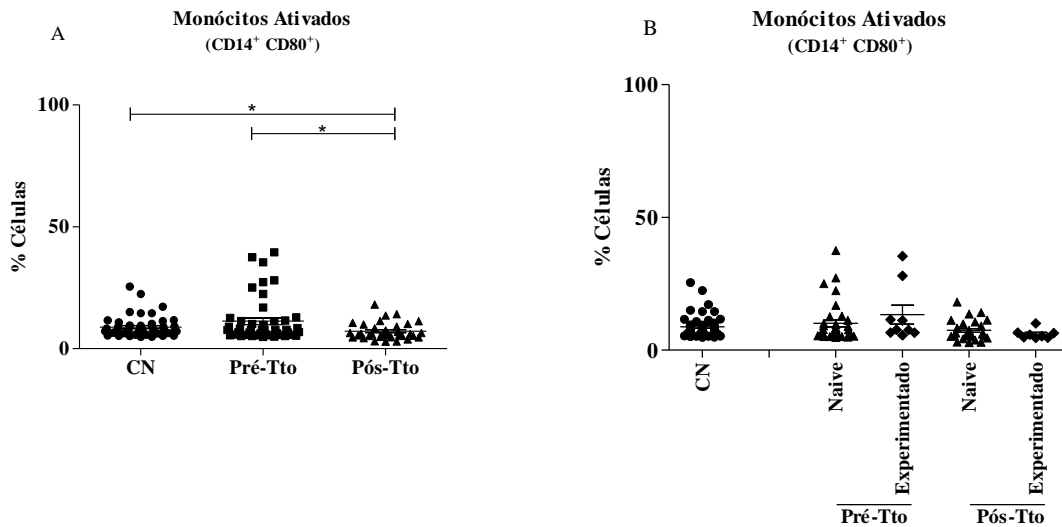


Figura 15: Ativação dos monócitos do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, *naives* e *experimentados* (B). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de monócitos (CD14⁺) e ativação celular (CD80⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos do grupo controle, obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

As células dendríticas (DC) foram avaliadas quanto à porcentagem de DC mielóides (mDC) e plasmocitóides (pDC). Um aumento significativo foi observado no grupo Pós-Tto em relação ao grupo controle e grupo de Pré-Tto ($p < 0,0019$, $p < 0,0109$). Na análise dos subgrupos Pré e Pós-Tto segregados em pacientes *naives* e *experimentados*, notou-se aumento significativo no subgrupo de pacientes *naives* do grupo após-Tto quando comparado com o grupo controle e o grupo de Pré-Tto ($p < 0,0002$) **Figura 16**.

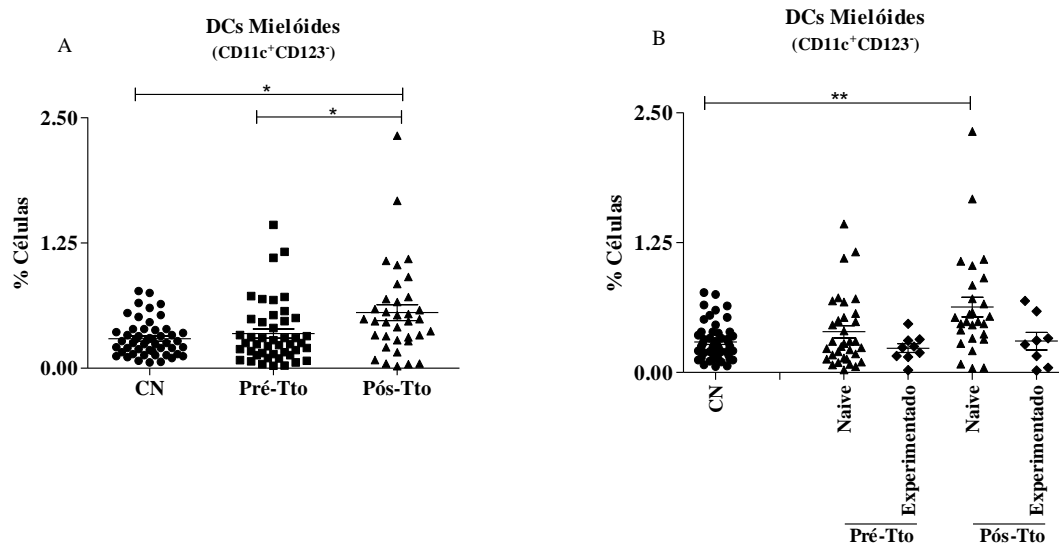


Figura 16: Frequência das células dendríticas mielóides (mDC) no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de mDC (CD14⁻CD11c⁺CD123⁻). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos do grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Quanto as células dendríticas plasmocitóides, foi observada uma diminuição significativa no grupo Pré-Tto em relação ao grupo controle e grupo de Pós-Tto ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$). Na análise dos subgrupos Pré e Pós-Tto segregados em pacientes *naives* e experimentados, notou-se aumento significativo no subgrupo *naive* do grupo de Pós-Tto quando comparado com o grupo controle e o grupo de Pré-Tto, respectivamente ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0011$). **Figura 17.**

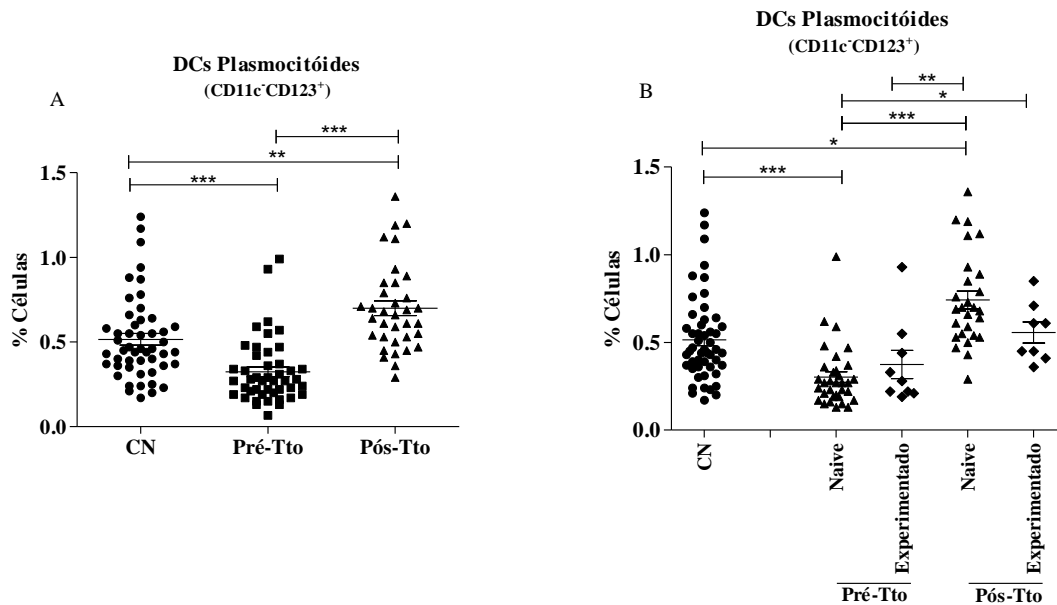


Figura 17: Frequência das células dendríticas plasmocitóides (pDC) no grupo controle, pacientes Pré e Pós-(A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de pDC (CD14⁺CD11c⁺CD123⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos do grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Os linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ são células importantes que podem responder a múltiplos mecanismos da resposta imune adaptativa, além de serem peças fundamentais na iniciação e manutenção da imunidade adquirida. Os resultados evidenciam que a subpopulação de Linfócitos T CD4⁺ apresenta diminuição no Pré-Tto nos pacientes com infecção crônica pelo HCV quando comparado ao grupo controle e pacientes tratados (Pós-Tto) ($p < 0,0018$; $p < 0,0070$), respectivamente; voltando à quantidades semelhantes ao controle após o tratamento (**Figura 18-A**). Também foi observado diminuição nos pacientes experimentados que iniciaram a terapia ($p < 0,0001$) e aumento na frequência dessas células após o tratamento ($p < 0,0004$) (**Figura 18-B**).

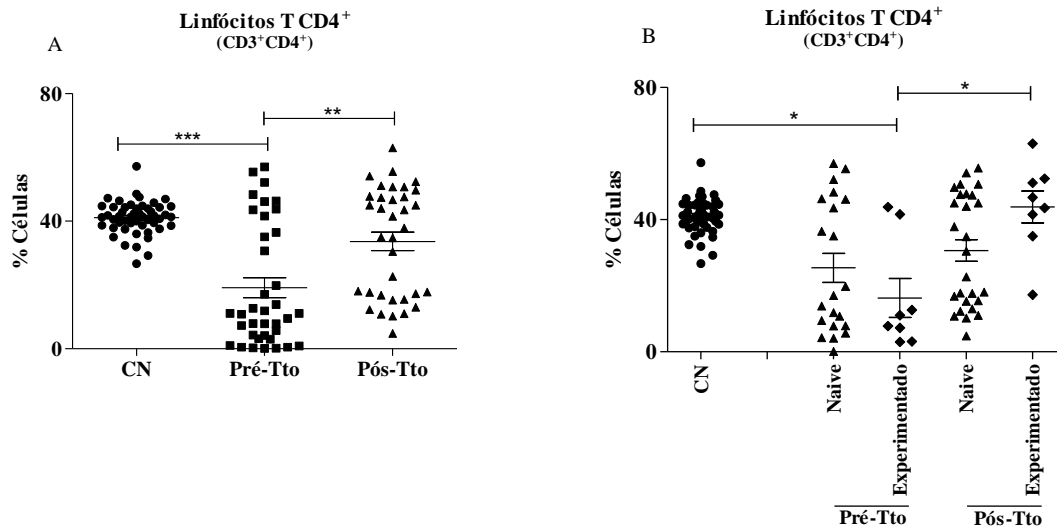


Figura 18: Frequência de linfócitos T CD4⁺ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*’s.

Ao avaliarmos as subpopulações de Linfócitos T ativados CD4⁺CD69⁺ no sangue periférico, observamos um aumento significativo dos pacientes antes do tratamento quando comparado com grupo controle ($p < 0,0001$) e paciente pós-tto ($p < 0,0001$). Portanto, o tratamento induziu redução da ativação desses linfócitos após o tratamento, como mostra na Figura (19-A). Este perfil também foi encontrado naqueles pacientes que eram *naives* no início do tratamento quando comparados aos pacientes experimentados após o tratamento e grupo controle ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente (Figura 19-B).

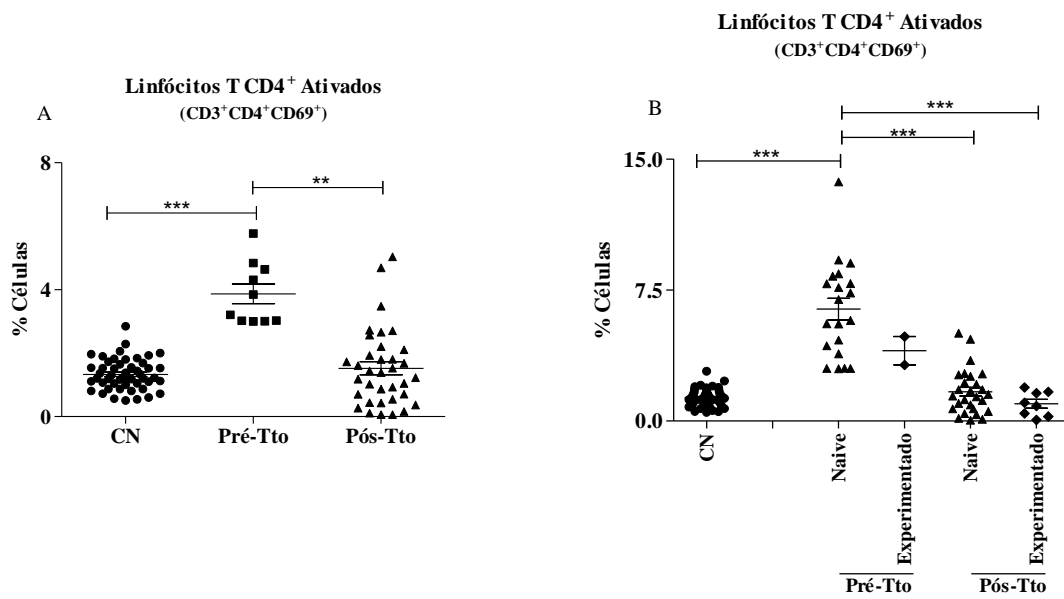


Figura 19: Frequência e ativação de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) e ativação celular (CD69⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Em relação aos linfócitos T CD8⁺, a análise dos resultados mostra que não foi observado aumento significativo dessas células antes do tratamento, porém estas células aparecem diminuídas após o tratamento quando comparados ao grupo controle e no pré-tratamento ($p < 0,0018$; $p < 0,0070$), respectivamente (**Figura 20-A**) e também os pacientes *naives* mostraram diminuídos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$) (**Figura 20-B**).

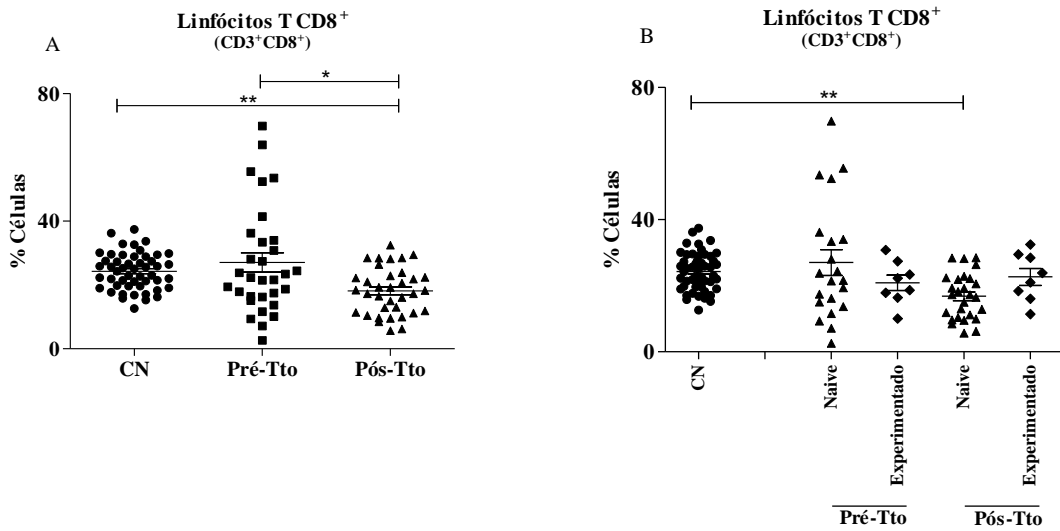


Figura 20: Frequência de linfócitos T CD8⁺ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de dupla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “**” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*’s.

Quanto aos linfócitos T citotóxicos ativados (CD8⁺CD69⁺) no sangue periférico, foi observado aumento significativo antes do tratamento quando comparado ao grupo controle e o grupo após o tto ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), seguindo-se de uma redução da ativação dessas células nos pacientes após o tto (**Figura 21-A**). Além disso, nota-se uma elevação da expressão de CD69⁺ nos linfócitos T CD8⁺ antes do tratamento dos pacientes *naives*, porém ao decorrer do tratamento, observa-se que há uma diminuição da ativação dessas células após a terapia quando comparado ao grupo controle e pacientes experimentados ($p < 0,0001$; $p < 0,0016$; $p < 0,0011$), respectivamente (**Figura 21-B**).

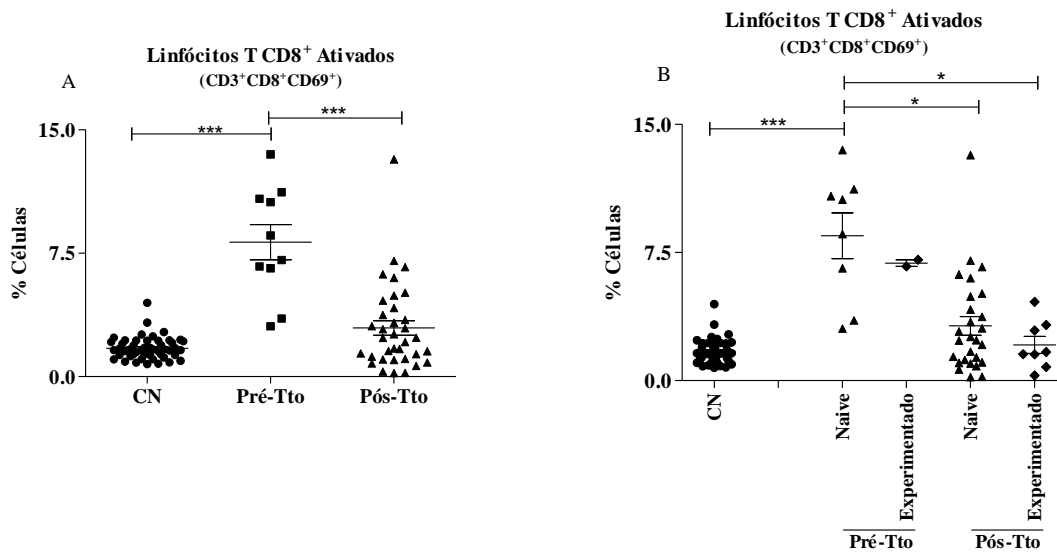


Figura 21: Frequência e ativação de linfócitos T CD8+CD69+ no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos T CD8+ (CD3+CD8+) e ativação celular (CD69+). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Como mostra a **Figura (22-A e B)**, não houve diferenças significativas entre os pacientes com hepatite C e grupo controle, e nem quando há estratificação dos subgrupos quando analisou-se os linfócitos T regulatórios (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺).

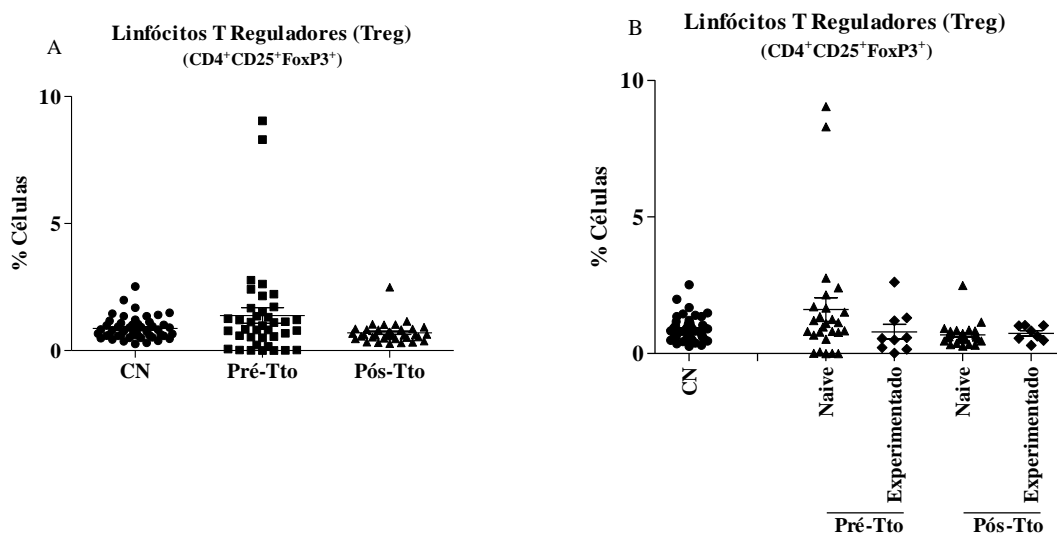


Figura 22: Frequência de linfócitos T reguladores (Treg) no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos Treg

(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Os linfócitos B e B1 são importantes células da imunidade humoral capazes de produzir anticorpos antivirais com importantes funções neutralizantes, de opsonização e fagocitose.

Os dados da análise não apresentaram valores com significância estatística entre o início e o final do tratamento ($p = 0,0458$) (**Figura 23-A**) e nem em relação à estratificação dos subgrupos ($p = 0,8805$) (**Figura 23-B**), mas, nota-se que as quantidades dessas células são semelhantes mesmo após a terapia e independentemente se o paciente foi submetido a uma terapia anterior ou não elas se mantêm no mesmo nível que o grupo controle.

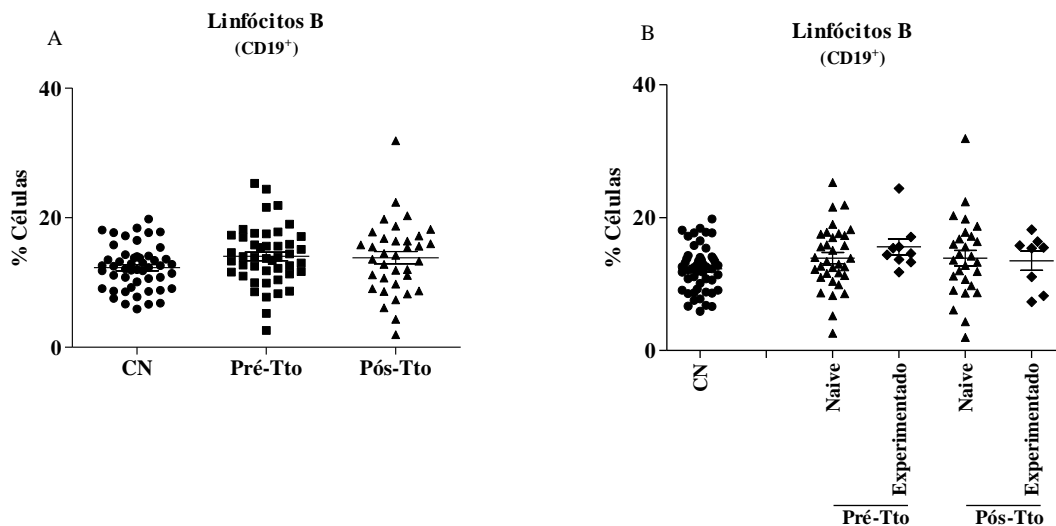


Figura 23: Frequência de linfócitos B no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos B (CD19⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Os linfócitos B1 apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa no grupo de pacientes tratados em comparação ao grupo controle ($p < 0,0091$) (**Figura 24-A**). Por outro lado, em relação aos subgrupos estratificados não houve diferenças estatisticamente significativas (**Figura 24-B**).

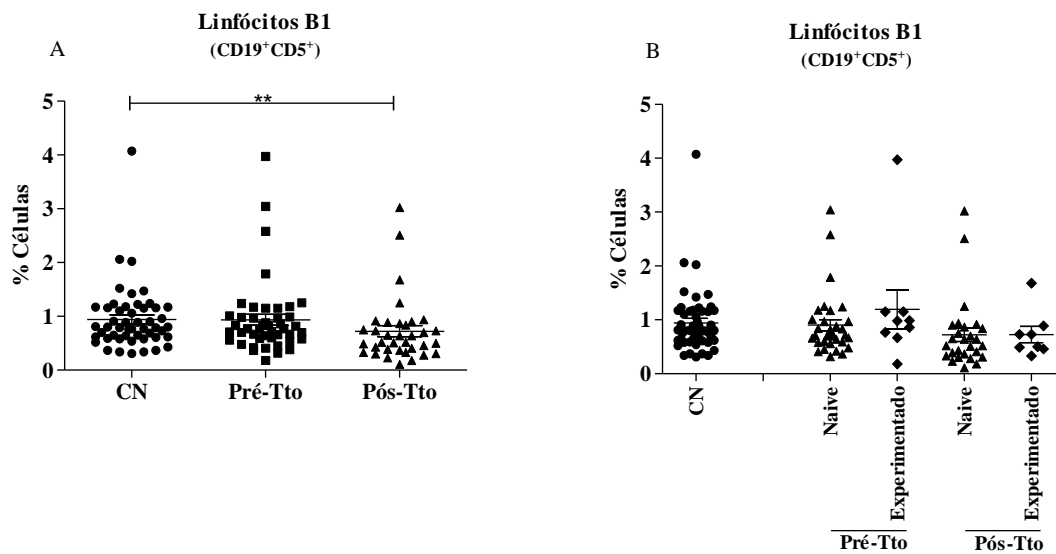


Figura 24: Frequência de linfócitos B1 no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de linfócitos B1 (CD5⁺CD19⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “**” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

As células NK e NKT reconhecem e destroem as células infectadas pelo HCV e secretam citocinas antivirais, constituindo um importante mecanismo da imunidade contra o vírus da hepatite C, que por sua vez, elimina o foco da infecção.

Ao analisarmos as células NK nos pacientes com hepatite C crônica quando comparados com indivíduos saudáveis não observou-se diferenças estatisticamente significativas ($p=0,2758$) (**Figura 25-A**) mesmo quando segregamos em pacientes *naives* e experimentados ($p=0,0634$) (**Figura 25-B**).

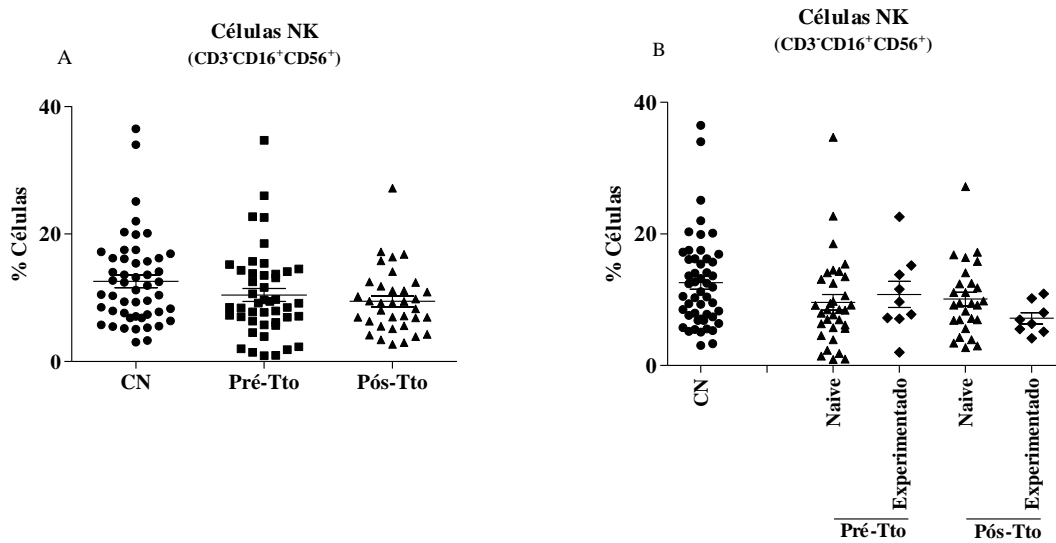


Figura 25: Frequência das células NK no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, *naives* e *experimentados* (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem das células NK (CD3-CD16+CD56+). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “*” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

Os resultados da análise das células NKT no sangue periférico demonstrou diminuição significativa antes do tratamento ($p < 0,0001$), no entanto ao observamos após a terapia com DAAs, nota-se que há uma elevação na frequência dessas células nos pacientes tratados quando comparados aos grupos controle e no pré-tto ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente (**Figura 26-A**). Este mesmo perfil também foi observado nos pacientes *naives* e *experimentados*. (**Figura 26-B**)

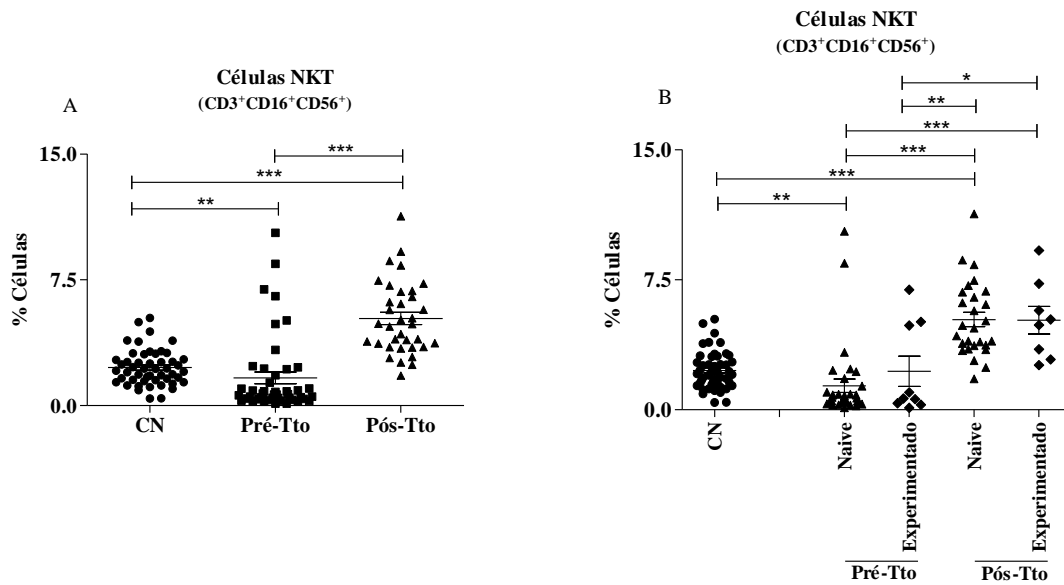


Figura 26: Frequência das células NKT no grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). Imunofenotipagem com painel de tripla marcação por citometria de fluxo, utilizados para quantificar a porcentagem de células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais destacando a porcentagem média das populações. “**” É usado para identificar o grupo de pacientes que apresentavam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo controle obtidos através do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn's*.

5.3. Concentração das Citocinas Séricas nos pacientes com Hepatite C crônica e grupo controle.

O perfil de citocinas dos pacientes infectados com o vírus da Hepatite C e grupo controle foi traçado de acordo com a análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ . As concentrações séricas das citocinas foram caracterizadas pelas médias de intensidade de fluorescência (MFI) de cada citocina.

5.3.1. Intensidade média de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th1 associado aos subgrupos *naives* e *experimentados* dos grupos Pré e Pós-Tto.

Quanto à citocinas pró-inflamatórias, as **Figuras (27-A e B)** mostram as concentrações da citocina IL-2 entre o grupo controle e os pacientes infectados pelo vírus da hepatite C antes e após o tratamento e ainda, entre os subgrupos *naives* e *experimentados*. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e subgrupos analisados ($p=0,6173$, $p=0,9515$).

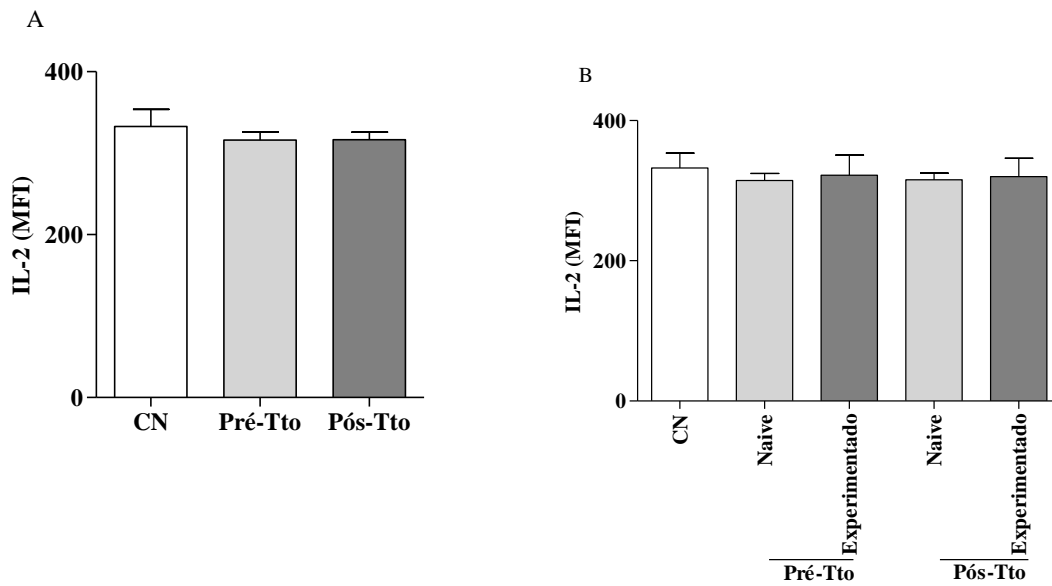


Figura 27: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array) foi usado para quantificar as concentrações de IL-2. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”.

Em relação à citocina IL-6, observamos um aumento significativo antes e após o tratamento com DAAs de pacientes com hepatite C crônica quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0118$; $p < 0,0033$), respectivamente (**Figura 28-A**). Ao analisarmos os subgrupos relacionados à experiência do tratamento, nota-se que há aumento estatisticamente significativo desta citocina pro-inflamatória nos pacientes experimentados tanto antes, quanto após o tratamento ($p < 0,0017$; $p < 0,0019$), respectivamente (**Figura 28-B**).

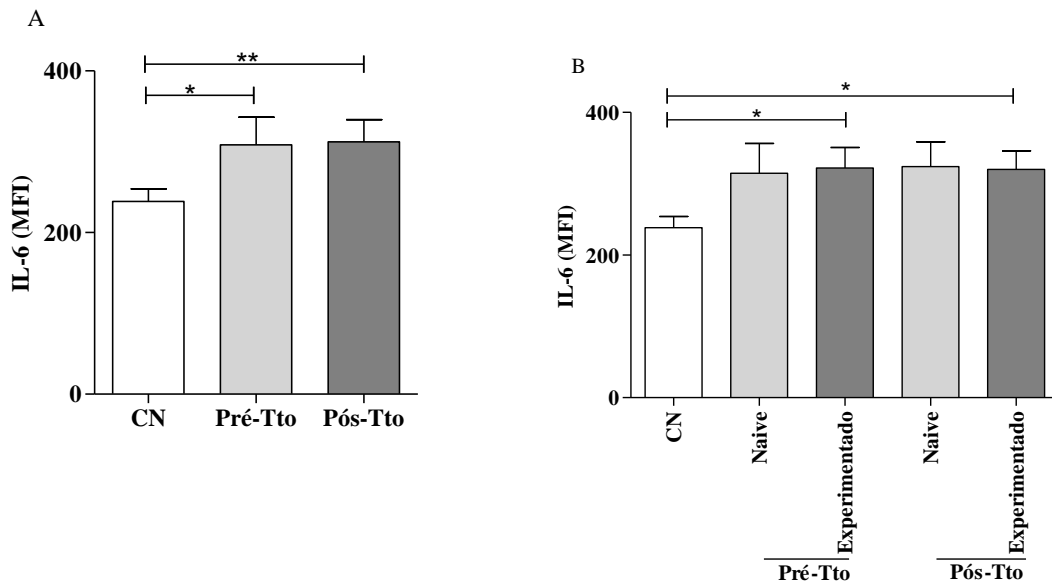


Figura 28: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, *naives* e *experimentados* (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-6. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “**”.

A **Figura (29-A)** mostra as concentrações séricas da citocina TNF- α entre o grupo controle e o grupo de pacientes antes e após o tratamento ($p=0,2825$). Contudo ao segregarmos por pacientes *naives* e *experimentados* notou-se aumento estatisticamente significativo desta citocina nos pacientes *experimentados* antes do tratamento e se manteve em mesmo nível após o tratamento ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente, enquanto que os pacientes *naives* apresentam níveis elevados desta citocina no início do tratamento e diminuição ao final do tratamento, exibindo um perfil menos inflamatório após o tratamento com um único regime terapêutico ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente **Figura (29-B)**.

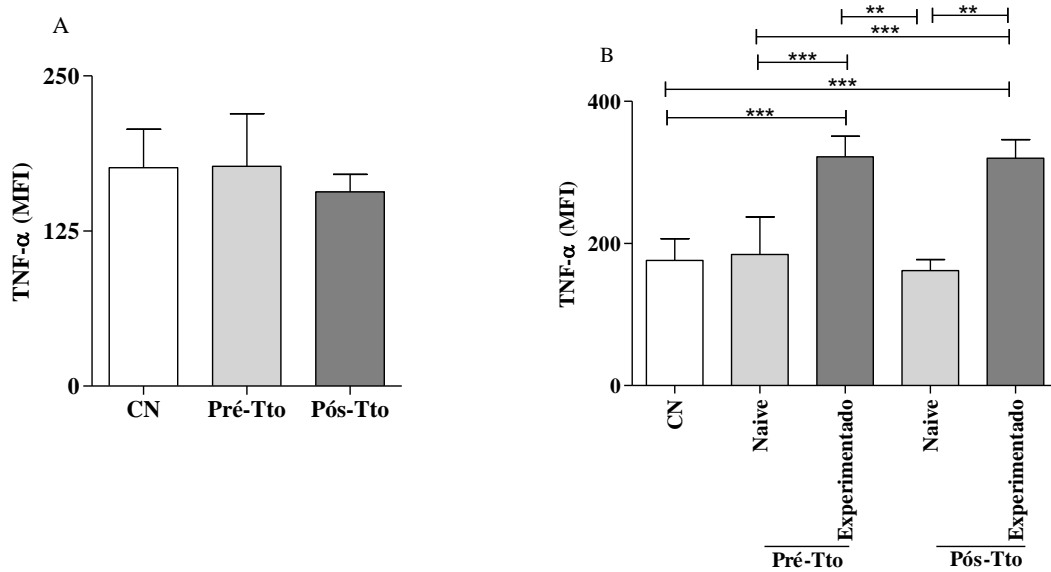


Figura 29: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de TNF- α . Os resultados foram expressos com média \pm desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “***”.

Ao analisarmos as concentrações séricas da citocina IFN- γ entre os grupos controle e pacientes pré e pós-tratamento, não foram observadas diferenças significativas ($p=0,3015$). No entanto, observa-se uma diminuição antes e após o tratamento. **Figura (30-A)**. Paradoxalmente, entre os pacientes experimentados nota-se aumento estatisticamente significativo da concentração sérica desta citocina antes e após o tratamento quando comparado ao grupo controle e pacientes *naives* ($p < 0,0002$; $p < 0,0002$), respectivamente. Já os pacientes *naives* de tratamento exibem redução gradativa da concentração sérica dessa citocina de antes e após a terapia com DAAs quando comparado ao grupo controle e pacientes experimentados ($p < 0,0003$; $p < 0,00001$), respectivamente (**Figura 30-B**).

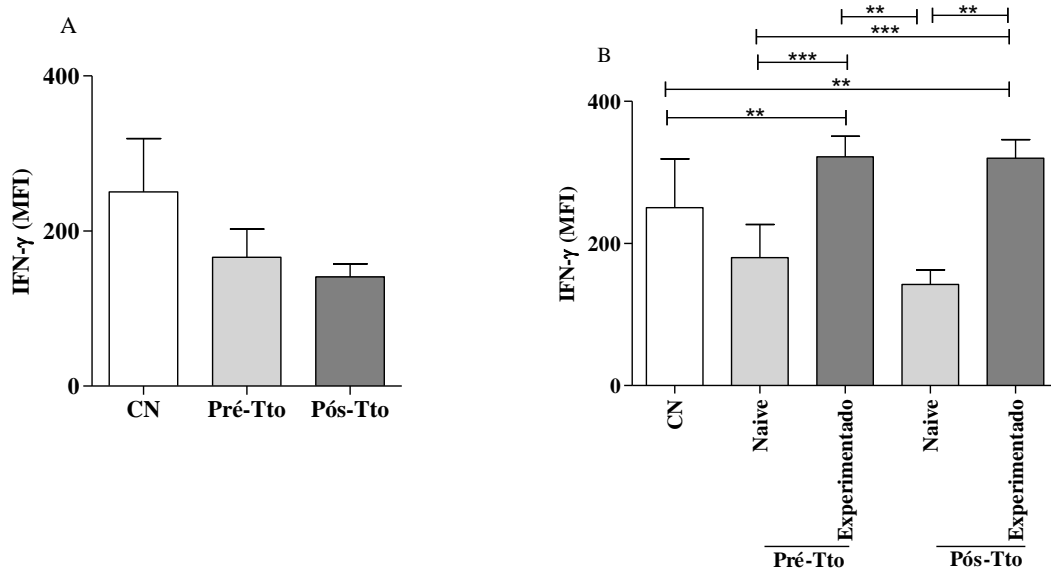


Figura 30: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IFN- γ . Os resultados foram expressos com média \pm desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”.

5.4 Citocinas Regulatórias (Treg) e Perfil Th2 e Th17

5.4.1. Intensidade média de fluorescência das citocinas séricas do perfil Treg, Th2 e Th17 associado aos subgrupos *naives* e experimentados dos grupos Pré e Pós-Tto.

Quando analisamos a concentração sérica da citocina regulatória IL-10, que atua regulando a resposta imune, não foi observado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e pacientes pré e pós-tratamento ($p=0,1013$) (**Figura 31-A**). Entretanto, quando se comparou os subgrupos *naives* e experimentados, destacam-se níveis elevados da concentração sérica desta citocina nos pacientes experimentados antes e após o tratamento ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente, enquanto que os pacientes *naives* apresentam aumento progressivo desta citocina somente no término do tratamento ($p < 0,0002$; $p < 0,0002$), respectivamente (**Figura 31-B**).

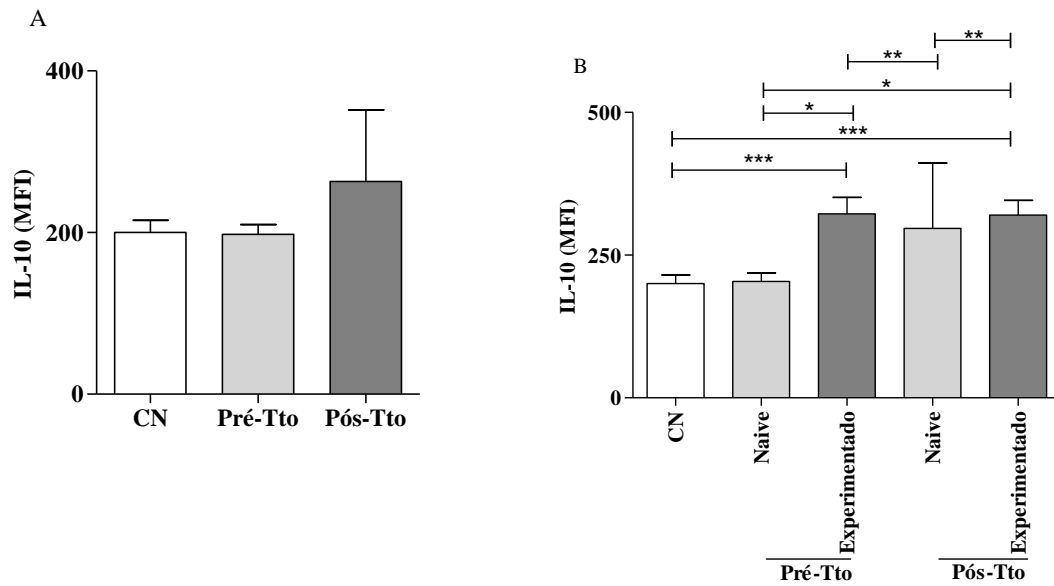


Figura 31: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-10. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”.

A **Figura (32-A)** demonstra que as concentrações da citocina IL-4 foram similares entre os grupos estudados, não havendo diferença estatística significativa. No entanto, nos subgrupos estratificados observa-se aumento nos pacientes experimentados antes e após o tratamento quando comparado ao grupo controle e pacientes *naives* ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente; enquanto que, entre os pacientes *naives* notou-se que esta citocina apresentasse diminuída antes e após o tratamento quando comparada aos pacientes experimentados ($p < 0,0002$; $p < 0,0003$) (**Figura 32-B**).

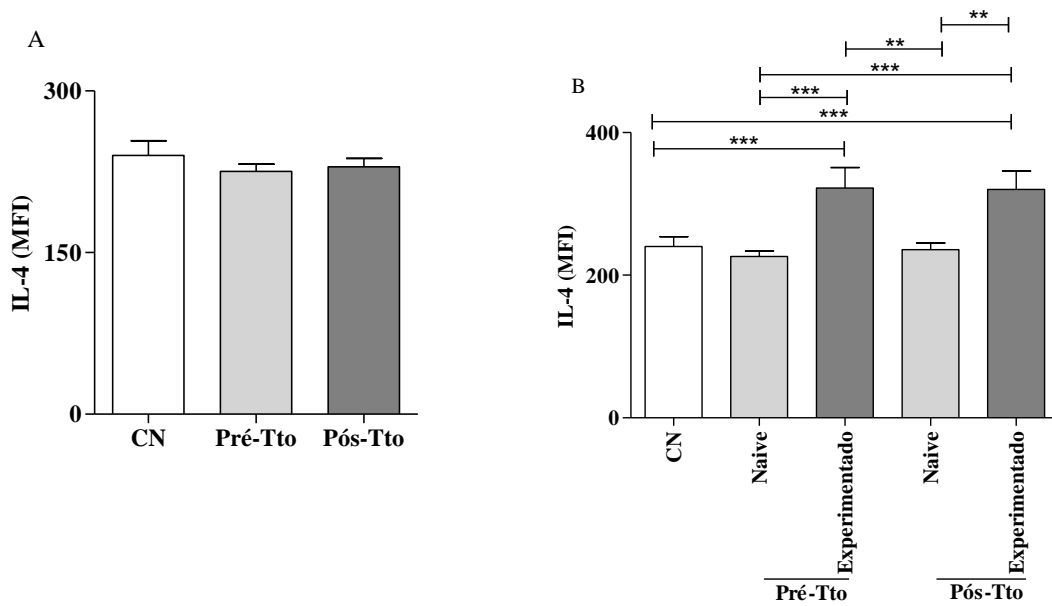


Figura 32: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-4. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”).

Na análise da citocina IL-17A, notou-se que houve diminuição significativa na concentração sérica desta citocina antes do tratamento em relação ao controle ($p < 0,0001$) **Figura (33-A)**. Nos pacientes experimentados observa-se um aumento expressivo dos níveis desta citocina antes e após o tratamento em comparação ao grupo controle e pacientes *naives* ($p < 0,0004$; $p < 0,0002$), respectivamente. Por outro lado, os pacientes *naives* antes do tratamento apresentam níveis reduzidos desta citocina quando comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$) (**Figura 33-B**).

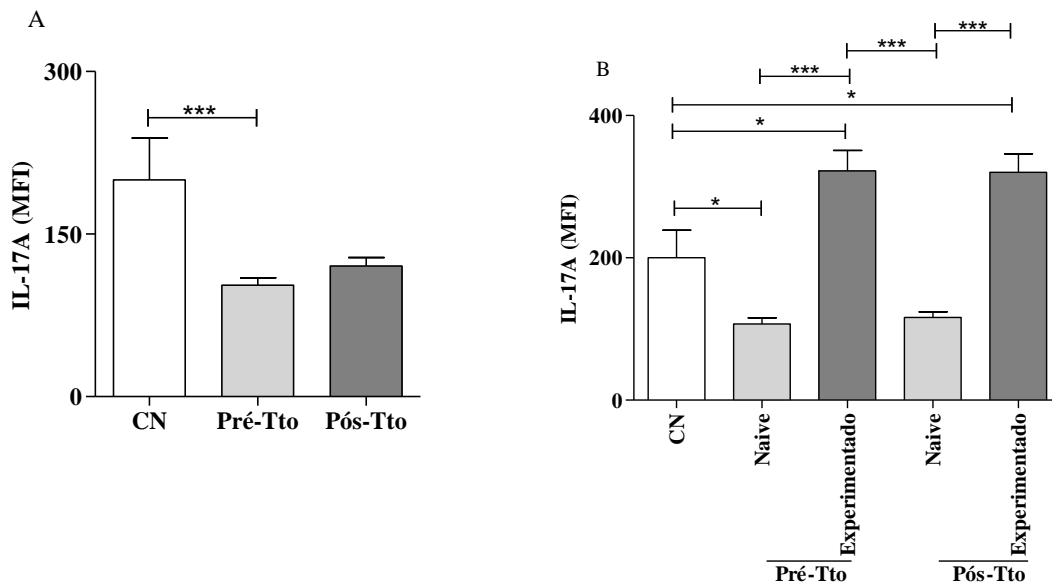


Figura 33: Concentrações séricas de citocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-17A. Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de citocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”.

5.4. Concentração das Quimiocinas Séricas nos pacientes com Hepatite C crônica e grupo controle.

O perfil de quimiocinas dos pacientes infectados com o vírus da Hepatite C e grupo controle foi traçado de acordo com a análise das quimiocinas CXCL-8/IL-8, CXCL-10/IP-10, CCL-2/MCP-1 e CXCL5/Rantes. As concentrações séricas das quimiocinas foram caracterizadas pelas médias de intensidade de fluorescência (MFI) de cada quimiocina.

5.4.1. Intensidade média de fluorescência das quimiocinas séricas associado aos subgrupos *naives* e *experimentados* dos grupos Pré e Pós-Tto.

A análise dos dados da quimiocina IL-8/CXCL-8 apresentaram níveis plasmáticos elevados nos pacientes Pré e Pós-Tto quando comparado ao grupo controle, conforme demonstrado na **figura (34-A)** ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente. Além disso, foi observado aumento desta quimiocina em ambos os pacientes *naives* e *experimentados*, e esse aumento permaneceu constante mesmo após término do tratamento quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente (**Figura 34-B**).

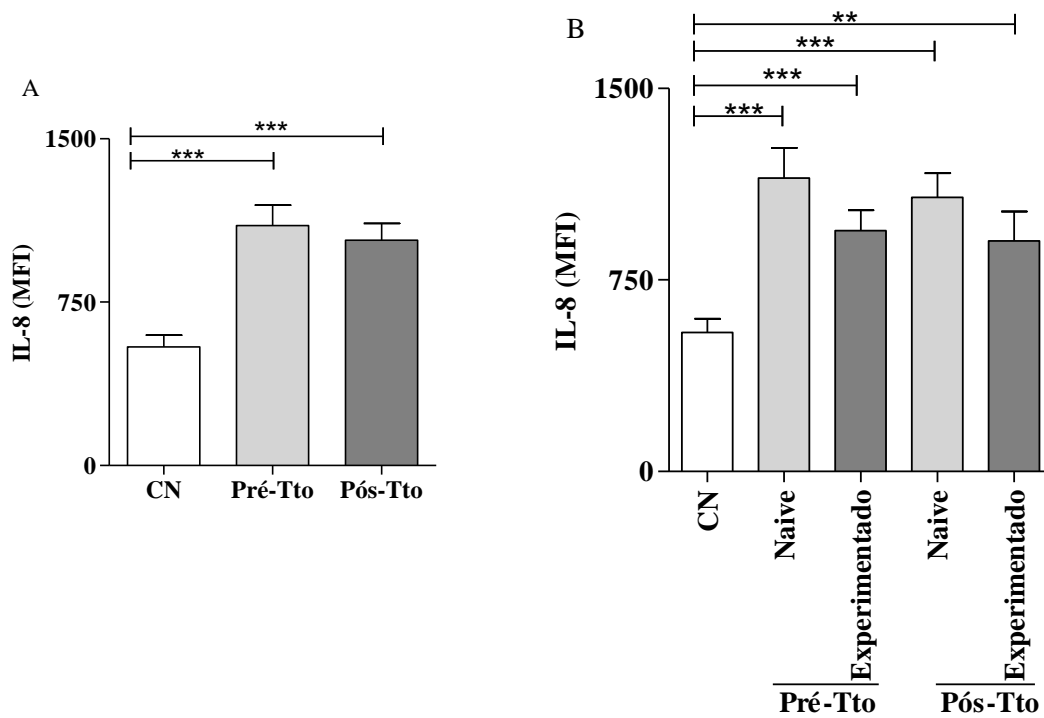


Figura 34: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IL-8(CXCL-8). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “***”.

A análise das quimiocinas plasmáticas MCP-1/CCL-2 e Rantes/CCL-5 mostraram que as concentrações destas quimiocinas foram similares entre os grupos e os subgrupos estudados, não havendo diferenças estatísticas significativas quando comparados ao grupo controle, respectivamente ($p=0,7021$; $p=0,5684$) (**Figura 35A - B e 36A -B**).

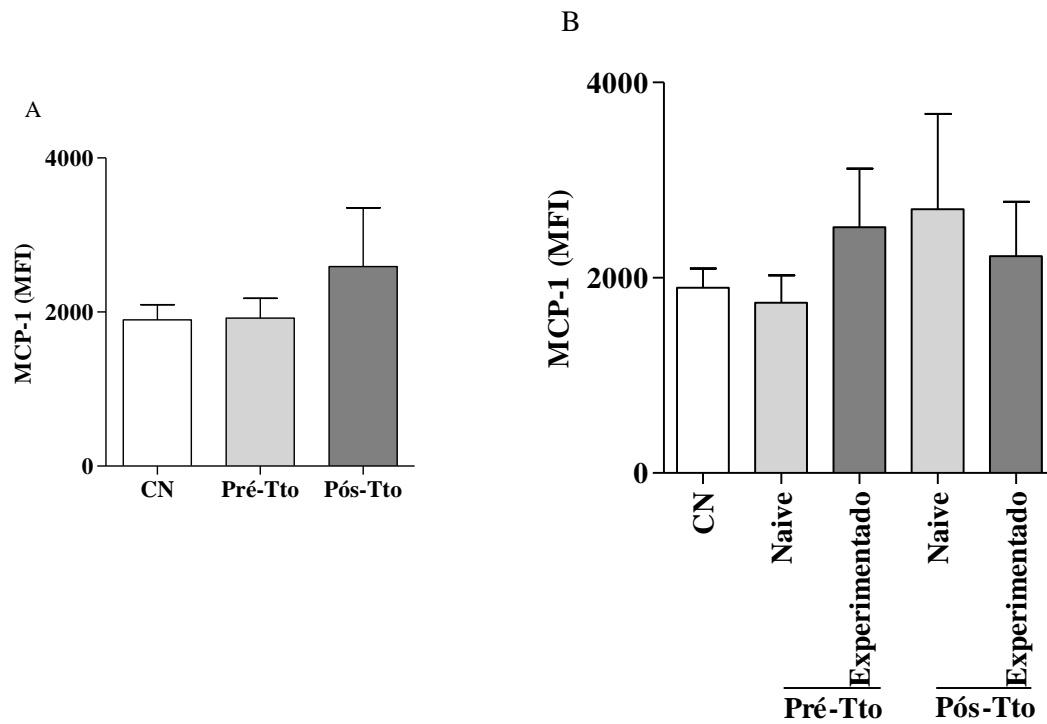


Figura 35: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de MCP-1 (CCL-2). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”).

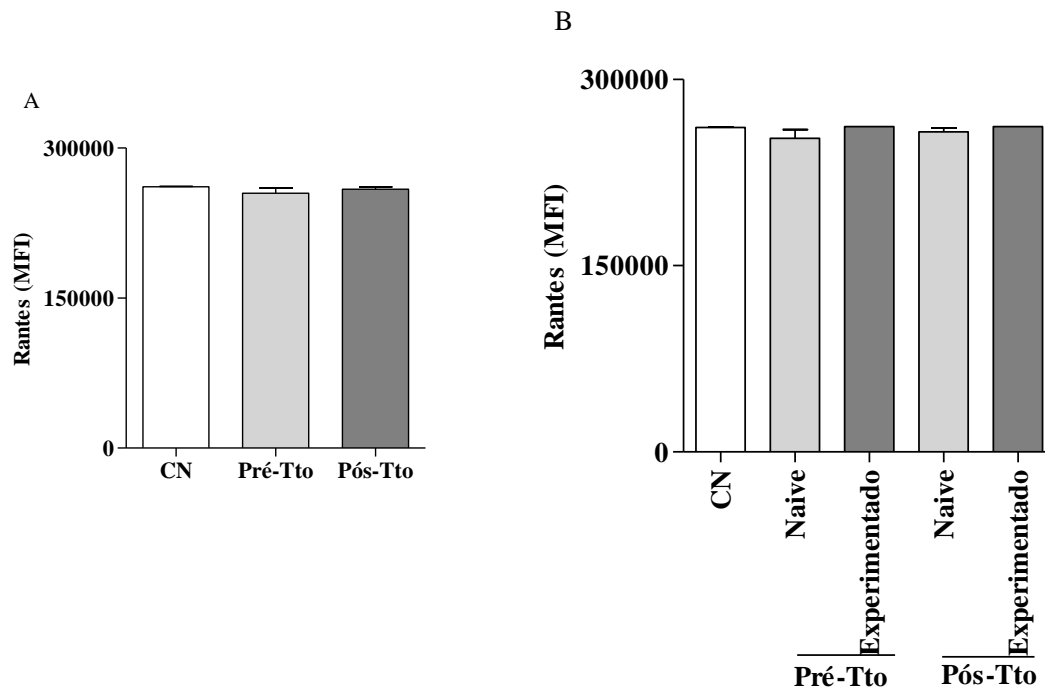


Figura 36: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de Rantes (CCL-5). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”).

Nesta análise foram observadas elevadas concentrações de MIG/CXCL9 antes e após o tratamento quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$), respectivamente (**Figura 37-A**). Ao analisarmos as concentrações séricas desta quimiocina nota-se que pacientes *naives* e experimentados apresentaram um aumento significativo antes e após o tratamento quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente (**Figura 37-B**).

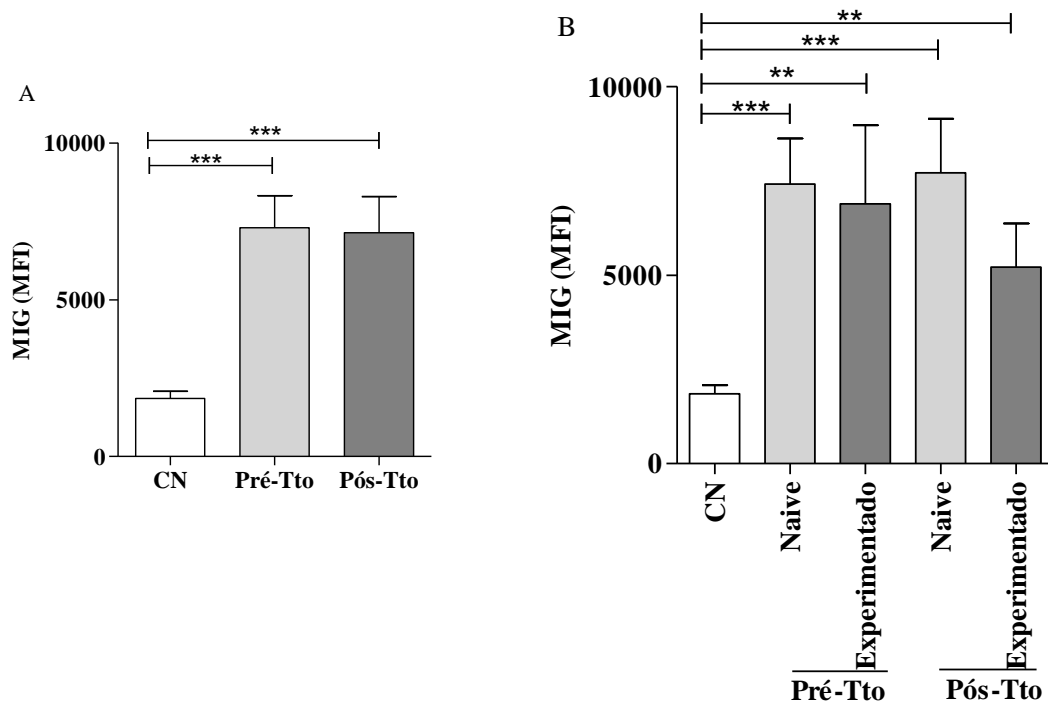


Figura 37: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de MIG (CXCL-9). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”.

Na **Figura (38-A)** observou-se elevada concentração da quimiocina IP-10 antes e após o tratamento quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente. Porém, nos subgrupos de pacientes *naives* e experimentados observa-se maiores concentrações desta quimiocina antes do tratamento quando comparado ao grupo controle representado na **Figura (38-B)** ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$), respectivamente.

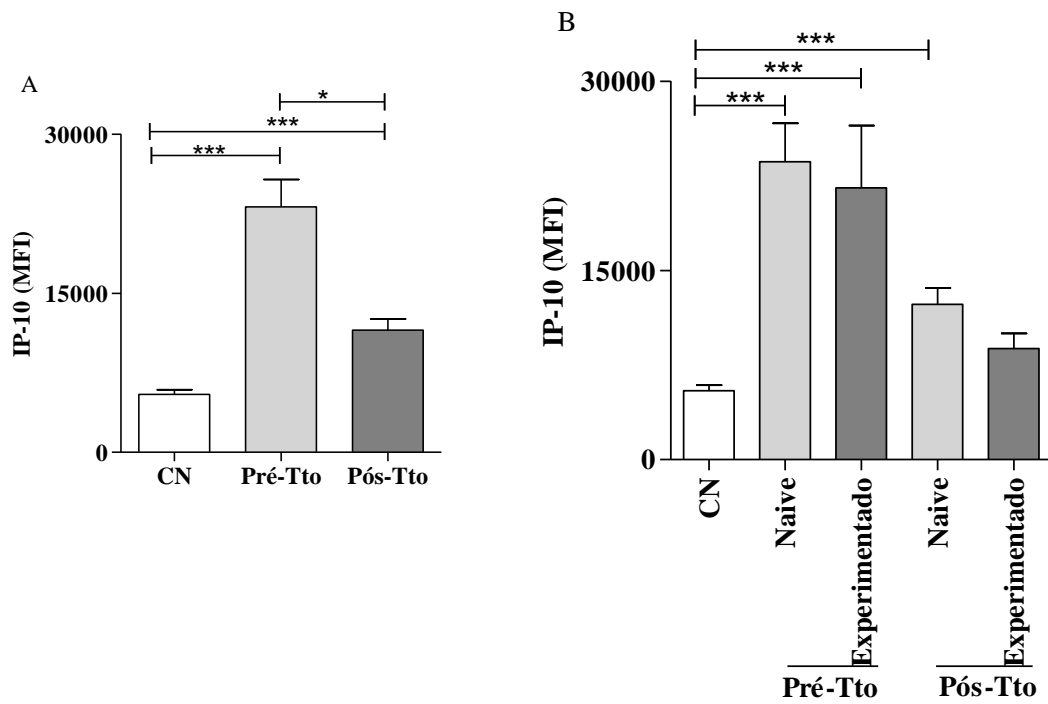


Figura 38: Concentrações séricas de quimiocinas do grupo controle, pacientes Pré e Pós-Tto (A) e categorizados de acordo com a experiência do tratamento, naives e experimentados (B). O teste citometria de fluxo utilizando o kit CBA (*Cytometric beads array*) foi usado para quantificar as concentrações de IP-10 (CXCL-10). Os resultados foram expressos com média±desvio padrão de quimiocinas séricas. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”).

Discussão

6 DISCUSSÃO

A hepatite C é uma doença que varia a gravidade entre os pacientes e a infecção viral persistente pode ser caracterizada ao desenvolvimento de complicações graves, como cirrose e carcinoma hepatocelular. Apesar de vários avanços no controle da replicação viral, a previsão da resposta ao tratamento antes do início da terapia é um fator crucial que poderia ajudar a projetar melhores estratégias terapêuticas a fim de alcançar a RVS. A este respeito, vários fatores do hospedeiro que envolve a resposta imune inata e adaptativa foram propostos como biomarcadores preditivos de pré-tratamento. Nesse trabalho expomos as alterações clínicas e imunológicas dos pacientes diagnosticados pelo vírus da hepatite C tratados de acordo com protocolo recomendado pelo Ministério da Saúde.

6.1 Análise das Características Clínicas e Epidemiológicas

No presente estudo foi observada maior prevalência da infecção pelo HCV em indivíduos do gênero feminino, porém sabe-se que a hepatite C é mais prevalente em indivíduos do gênero masculino, com idades acima de 40 anos (TORRES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). Este resultado pode estar relacionado com o período de realização do estudo, onde a prevalência maior foi de mulheres que procuraram o ambulatório da FMT-HVD.

No Amazonas, Araújo et al., (2011) identificaram a presença dos genótipos 1, 2 e 3, enquanto que Torres et al., (2009) descreveram a presença dos genótipos 1 e 3 em candidatos a doadores de sangue na cidade de Manaus. Todavia, em nosso estudo encontramos a presença dos genótipos 1, 2, 3 e 4. O genótipo 4 é pouco frequente no Brasil, sendo encontrado principalmente em países Africanos. A falta de notificação ou a entrada de imigrantes pela fronteira do Brasil, talvez seja uma porta de entrada para variantes incomuns deste genótipo (TARRAGÔ et al., 2017).

A presença de dois genótipos do HCV no mesmo paciente (1/2) também foi encontrado e descrito por Araújo et al., (2010), sugerindo que a presença dos dois genótipos não interferiu na resposta a terapia baseada em IFNpeg+RBV. Do mesmo modo, o tratamento com DAAs foi eficaz para o paciente infectado pelos genótipos 1 e 2 encontrado em nosso estudo, uma vez que ele manteve a RVS após o término do tratamento.

O estadiamento da fibrose hepática tem implicações importantes para o prognóstico de doenças e decisões importantes relacionadas à terapia. A fibrose hepática é caracterizada pelo

acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (MEC) e é atualmente considerada como uma resposta cicatrizante à lesão hepática crônica. Além disso, as informações sobre o estado da fibrose refletem e/ou indicam o desenvolvimento das principais complicações como a cirrose, insuficiência hepática e hipertensão portal e por muitas vezes, requer transplante hepático (BATALLER et al., 2005; SEBASTIANI et al., 2014).

A maioria dos pacientes nesse estudo não apresentaram grau de lesão hepática avançada, ou seja, grau de fibrose hepática \geq F2 corroborando com estudos recentes, na mesma região, que relataram as mesmas características de pacientes que indicam menor grau de lesão hepática e suas complicações (SOUZA-CRUZ et al., 2016).

A terapia combinada de DAAs raramente causa efeitos colaterais. O regime de tratamento é individualizado, de acordo com as recomendações das diretrizes do MS, com base no genótipo viral, por 12 ou 24 semanas, com acréscimo ou não da Ribavirina. Para os pacientes com genótipo 1 a combinação é de SOF+DCV ou SOF+SMV, o genótipo 2 SOF+RBV, enquanto que os pacientes portadores dos genótipos 3 e 4 é recomendado SOF+DCV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; 2017).

O presente estudo analisou os fatores associados à RVS num cenário clínico de pacientes com CHC tratados com DAAs. A análise dos dados revelou que 94,3% dos pacientes alcançaram RVS independentemente da extensão de duração do tratamento. Esta taxa de resposta é comparável com a relatada em diversos estudos de vida real com DAAs realizados também sob condições clínicas, independentemente da resposta anterior ao tratamento e com um considerável número de pacientes (ZEUZEM et al., 2014; SULKOWSKI et al., 2014; NELSON et al., 2015; WELZEL et al., 2016).

As taxas de resposta virológica sustentada entre os pacientes com infecção pelo HCV variaram de acordo com a história de tratamento e o status em relação à fibrose. Entre os pacientes que não receberam tratamento prévio as taxas de resposta virológica sustentada foram de 100% para aqueles com fibrose \leq F2, enquanto que paciente com fibrose \geq F2 foi de 95%. No entanto, entre os pacientes previamente tratados as taxas de RVS foram maiores em ambos os grupos: 100% entre aqueles com fibrose \leq F2 e \geq F2.

No que tange nossos resultados, tivemos uma boa porcentagem de resposta virológica sustentada mesmo naqueles com genótipo 1 (genótipo mais difícil de curar de acordo com relatos de estudos anteriores) (LANGE et al., 2014; LAWITZ et al., 2016). No entanto, apesar de incluir um número maior de pacientes com o genótipo 1, nosso estudo alcançou altas taxas de RVS entre os pacientes com diferentes genótipos.

Nossos dados apresentam dois pacientes que não conseguiram alcançar a RVS. Ambos tinham, no momento das coletas, 59-60 anos de idade, níveis mais elevados de ALT, AST, carga viral, fibrose \geq F2 e genótipo 1, o que provavelmente contribuiu para a falha na resposta virológica sustentada. Uma vez que, a maioria dos estudos disponíveis sobre os fatores associados à RVS mostrou que índices baixos de carga viral inicial, idade mais jovem, ausência de sobrepeso/obesidade e a falta de fibrose/cirrose são fatores preditivos para alcançar a RVS. Esses fatores também foram considerados como preditores de uma boa resposta ao tratamento baseado em interferon. O fato é que, fatores virais e do hospedeiro são responsáveis pelas diferenças na responsividade do tratamento (RODRIGUEZ-TORRES et al., 2010; GARCÍA-SAMANIEGO et al., 2013).

Não obstante, existem fatores importantes relacionados à falha na RVS que podem ser influenciados pela presença do genótipo 1 e a presença de mutação do vírus, que resulta em barreiras de alta resistência do uso de DAAs que, conseqüentemente, representa piores taxas de RVS (SULKOWSKI et al., 2014; LAWITZ et al., 2014).

Geralmente é comum encontrar em pacientes tratados com PEGIFN+RBV quadros anêmicos, plaquetopenia, trombocitopenia, fraqueza, náuseas, transtornos psiquiátricos e *etc.*, influenciando de forma negativa e direta na adesão e descontinuação desse regime de tratamento (FRIED et al., 2002; RODRIGUEZ-TORRES et al., 2010).

Os efeitos adversos causados pelos DAAs são bem tolerados, sendo os mais comumente relatados; cefaleia, fadiga e náuseas (SULKOWSKI et al., 2014; NELSON et al., 2015; LAWITZ et al., 2016; WELZEL et al., 2016), o que colabora com altas taxas de adesão ao tratamento e melhor qualidade de vida desses pacientes. Em geral, nos pacientes deste estudo que iniciaram o tratamento foram observadas reduções nos níveis de hemoglobina, hematócrito, VCM e plaquetas, o que não interferiu na RVS. Por outro lado, ao observamos a evolução do grupo de tratados a diferença é notável desses índices que tendem a estabilizar e, depois do tratamento, apresentar valores próximos da linha de base, corroborando ao nosso trabalho, o mesmo foi observado por Zeuzem et al., (2014).

Os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são indicadores frequentemente utilizados para a avaliação de doenças hepáticas. São utilizados como ferramenta de triagem de baixo custo e facilmente disponível para a detecção de doença hepatocelular, para a avaliação da eficácia terapêutica e efeitos hepáticos adversos do tratamento medicamentoso. Suas alterações devem ter especificidade pessoal e variações individuais. A ALT é predominantemente expressa pelos hepatócitos, enquanto que a AST é

expressa principalmente por células miocárdicas e hepatócitos (SINN et al., 2013; LIU et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Nossos dados sugerem dano hepático nesses pacientes através da elevação dos níveis das enzimas hepáticas AST e ALT, porém, essas variáveis não afetaram a RVS, pois ao final do tratamento observamos níveis mais baixos dessas transaminases. Corroborando aos nossos dados Nakamura et al., (2013) numa análise retrospectiva indica que os pacientes que obtiveram RVS tenderam a ter níveis de ALT mais baixos do que os pacientes com resposta nula, o que parece ser uma consequência natural.

Dados observados por Wu et al., (2016) descreveram que níveis normais dessas enzimas hepáticas em pacientes de Taywan tiveram uma boa resposta a terapia antiviral e baixa taxa de desenvolvimento de HCC após a terapia baseada em IFNpeg.

Os resultados de uma análise de regressão baseados no desenvolvimento da cirrose, entre pacientes infectados pelo vírus da hepatite C crônica analisaram os níveis de ALT, AST, plaquetas e idade e foi significativamente associada com o risco de progressão da doença, principalmente em homens (SINN et al., 2013).

O impacto em longo prazo da infecção pelo HCV é altamente variável; alguns pacientes com infecção persistente pelo HCV exibem níveis persistentemente normais de ALT, e estão associados a uma doença hepática mais leve, porém quando esses níveis se tornam anormais ou alterados, estes podem apresentar uma significativa progressão para o desenvolvimento da fibrose ou carcinoma hepatocellular (CALLEJA et al., 2012).

6.2 Análise do perfil de Resposta Celular nos pacientes com hepatite C e grupo controle

O tratamento com antivirais de ação direta, isento de Interferon na infecção crônica pelo HCV pode conduzir a erradicação completa do vírus. No entanto, pouco se sabe sobre as alterações imunológicas dos pacientes com hepatite C crônica durante e após o tratamento com DAAs. De modo geral, nosso estudo explorou o impacto do tratamento com DAAs nos perfis de frequência celulares periféricas distintas antes e 12 semanas após o término do tratamento comparados com indivíduos saudáveis.

Durante a infecção crônica pelo HCV, os monócitos do sangue periférico migram para o fígado e se diferenciam em macrófagos e células de Kupffer. Os monócitos / macrófagos desempenham um papel importante no desencadeamento da resposta imune adaptativa e na influência da polarização Th1 / Th2, produzindo citocinas inflamatórias e imunomoduladoras. Essas citocinas também podem prejudicar a capacidade das células apresentadoras de

antígenos de ativar células T virgens e, assim, ajudar na replicação do HCV e estabelecer infecção persistente (TACKE, 2017).

Ning et al., (2017) constataram que o tratamento com DAAs atenuou a frequência de monócitos circulantes em pacientes com CHC durante o tratamento. Em nosso estudo, observamos que os monócitos ativados CD14⁺CD80⁺ diminuíram após o tratamento, que pode ser decorrente da sua migração através de quimiocinas para o tecido hepático a fim de controlar a infecção (SHI et al., 2011).

Além dos monócitos, as células *Natural Killer* (NK) são componentes chaves da resposta imunológica antiviral e possuem funções efetoras entre a imunidade inata e adaptativa. O principal papel funcional das células NK é a defesa contra células tumorais, lise de células infectadas por vírus e apoptose mediado pelo ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Além disso, elas medeiam os efeitos antivirais produzindo citocinas antivirais (IFN- γ) e imunomoduladoras (IL-10). As células NK representam o subgrupo de linfócitos mais prevalentes no fígado, constituindo cerca de >30% da população dos linfócitos intra-hepáticos e de 5% -15% no sangue periférico (NORRIS et al., 1998; NATTERMANN et al., 2005).

As células *Natural Killer* do tipo T (NKT) são uma sub-linhagem de células T que compartilham características de células NK e de células T e também agem mediando a imunidade inata e adaptativa. As células NKT também regulam a ativação de diferentes tipos de células do sistema imune inato, como macrófagos, células NK e células dendríticas, bem como células T efetoras do sistema imune adaptativo. Após estimulação, as células NKT possuem funções imunorreguladoras com capacidade de secretar rapidamente grandes quantidades de quimiocinas MIP-1 β e citocinas Th1 e Th2, incluindo IFN- γ e IL-4, respectivamente (BENDELAC et al., 2007).

Dessouki et al., (2010) ao avaliarem o impacto da infecção pelo HCV nas células NK em relação à frequência, função e secreção de citocinas, bem como efeitos terapêuticos do IFN- α e ribavirina nas células NK, notaram que nos pacientes com HCV houve uma redução significativa da frequência total de células NK dado este semelhante ao que encontramos nos nossos pacientes. Assim, a infecção crônica pelo HCV pode contribuir para o comprometimento da resposta imune celular e a persistência do vírus.

Para avaliar se o tratamento a base de IFN- α da hepatite C crônica modula o fenótipo e a função das células NK. Edlich et al., (2012) estudaram os níveis de fosforilação das moléculas do transdutor de sinal e do ativador de transcrição (STAT 1/4) presentes nas células NK, e se o IFN- α afeta a resposta e refratariedade das células NK. Os dados mostraram que a

modulação induzida por IFN- α da fosforilação de STAT 1/4 induz à polarização de células NK no sentido de aumentar a citotoxicidade e diminuir a produção de IFN- γ na infecção pelo HCV, e que a capacidade de responder rapidamente e a refratariedade das células NK se correlacionam com a eficácia antiviral da terapia baseada em IFN- α .

Um achado importante sobre a adição da ribavirina no tratamento com PEGINF foi demonstrado por Werner et al., (2014) ao descobrirem que a ribavirina aumenta a resposta de IFN- γ das células NK ao ser estimulado com IFN- α , e ainda sugerem que o contexto de novos regimes antivirais livres de interferon sejam interessante. Portanto, na presença da ribavirina, as células NK são capazes de montar uma resposta melhorada de IFN- γ a uma resposta de IFN do tipo I endógeno, que é estimulada pelo aumento da replicação do HCV durante uma invasão viral.

Ao contrário da terapêutica baseada em IFN- α e Ribavirina, a depuração viral do HCV pela terapêutica combinada de inibidores de protease NS3-4A/ NS5A e NS5B leva à perda da ativação imunitária intra-hepática pelo IFN- α e à normalização das células NK intra-hepática funcionalmente polarizada. Portanto, a restauração da capacidade das células NK de produzir IFN- γ durante o tratamento com DAAs livre de IFN pode indicar e / ou prever uma resposta virológica rápida na administração desse novo regime (SERTI et al., 2015).

Estudos recentemente publicados sugerem que as células NK podem contribuir para a depuração do HCV durante a terapia com DAAs; no entanto, o que é esperado, é que os DAAs não tenham um efeito direto no fenótipo e na função dessas células e que o rápido controle viral pode resultar na diminuição do IFN- α endógeno e na diminuição da ativação das células NK (SERTI et al., 2015; SPAAN et al., 2016).

Interessante que após a eliminação do vírus, Serti et al., (2015) demonstraram níveis reduzidos de quimiocinas (CXCL10 e CXCL11) e de citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e o efeito tardio sobre as células imunitárias; sendo que as células podem não voltar aos níveis de indivíduos saudáveis provavelmente devido à presença de doença hepática instalada (SERTI et al., 2015; SPAAN et al., 2016).

Ahlenstiel et al., (2011) observaram diminuição da população das células NK, sugerindo que essa redução pode ter sido causada pela ativação de células NK residentes no fígado ou pelo recrutamento dessas células do sangue periférico para o local da infecção através da sinalização das quimiocinas.

Recentemente Spaan et al., (2016) ao explorarem o efeito da terapia com antivirais de ação direta observaram que o tratamento com DAAs diminui a frequência de células NK do

sangue periférico antes do tratamento. Porém, no decorrer do tratamento notou-se um aumento na frequência dessas células em pacientes com CHC.

O fato é que ainda não está claro se a restauração das células NK (pelo menos para os parâmetros testados) é necessária para a cura e se o desaparecimento do vírus se correlaciona com mudanças fenotípicas na população dessas células (GOLDEN-MASON et al., 2018).

As citocinas séricas IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- α são citocinas estritamente críticas para promover a ativação, potencialização da função citotóxica e finalmente a sobrevivência das células NK (ZHANG et al., 2013). Uma das limitações do nosso estudo é que não foi possível avaliarmos as concentrações séricas dessas citocinas, e que poderiam estar associadas à resposta virológica precoce ao tratamento com DAAs.

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos profissionais que desempenham um papel primário na ativação e coordenação das respostas imunes inatas, aos quais são subdivididas em células dendríticas mielóides (mDCs) e células dendríticas plasmocitóides (pDC). Através da estimulação, essas células sofrem maturação caracterizada pela expressão de altos níveis de citocinas inflamatórias, quimiocinas, de moléculas MHC de classe I e II e moléculas coestimulatórias, como CD40, CD80/CD86. Além disso, as DCs induzem ativação e diferenciação robusta de células T efetoras da imunidade adaptativa (JENSEN et al., 2010).

Por possuírem um papel importante durante a infecção pelo HCV, uma das estratégias mais vitais do vírus HCV é de inibir ou interferir a função dessas células apresentadoras de antígenos, resultando na redução da ativação de células T específicas para o vírus. Estes efeitos podem explicar ou contribuir para baixa capacidade eliminatória do sistema imune frente ao HCV observado em pacientes cronicamente infectados, pois é visto que esses fatores provavelmente podem levar a cronicidade da doença (SAITO et al., 2008).

No que tange nossos resultados, podemos observar um aumento na frequência das DC mielóides nos pacientes com hepatite C crônica após o tratamento. Dados da literatura sugerem que a função dessas células é defeituosa em pacientes com infecção crônica por HCV (MACDONALD et al., 2007). A respeito disso, a disfuncionalidade e redução das células dendríticas circulantes no sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados, pode comprometer a capacidade desses pacientes em induzir uma resposta imune antiviral efetiva (TSUBOUCHI et al., 2004).

Além disso, esta redução substancial também foi vista por Perrella et al., (2006) durante a infecção aguda pelo vírus da hepatite C, demonstrando que a baixa frequência das mDC no início da infecção pode ser um importante fator envolvido na cronicidade da doença,

uma vez que essas células são eficientes em migrar para os linfonodos, apresentar antígenos aos linfócitos T e induzir a ativação e proliferação dessas células. Por outro lado, foi visto por esses autores, que a alta prevalência dessas células na circulação sanguínea durante a infecção aguda pode ser um preditor do sucesso do *clearence* viral.

A compreensão do comprometimento das mDCs que ocorre em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C e o impacto da resposta imune após a terapia com DAAs ainda não são claros, o mecanismo do sucesso e insucesso terapêutico tem uma relevância clínica importante para o desenvolvimento de terapias melhoradas e para a previsão de não resposta. O fato é que o HCV evoluiu e adquiriu estratégias de evasão, evitando respostas imunitárias antivirais em células infectadas, como por exemplo, a clivagem da proteína adaptadora MAVS e TRIF por NS3/4A durante a infecção, impedindo a ativação dos fatores de transcrição IRF3 e NF- κ B contribuindo para mecanismos de persistência viral por induzir concentrações mais baixas de IFN I e III e de citocinas pro-inflamatórias (LI et al., 2005; LIN et al., 2006; BARIL et al., 2009).

Nossos dados demonstram que após o tratamento com DAAs, os pacientes apresentaram restauração imunológica das mDCs com altas proporções dessas células nos indivíduos tratados e naqueles pacientes *naives*, representado por um aumento rápido dessas células após a resposta virológica sustentada como mostrado na **Figura (16A-B)**. Estes dados corroboram aos encontrados por Rana et al., (2012; 2013) em resposta a terapia com PEGIFN e RBV.

As pDCs são um subconjunto especializado de DC que produzem rapidamente uma grande quantidade de IFN tipo I em resposta a infecções virais. Em nosso estudo, os pacientes com hepatite C crônica apresentaram proporções reduzidas de pDCs antes de iniciarem o tratamento. Entretanto, observamos que após a terapia antiviral bem sucedida, as pDCs apresentaram frequências elevadas após o tratamento, inclusive nos indivíduos *naives*. Crosignani et al., (2016) observou no soro de pacientes tratados com PEGIFN+RBV a frequência das pCD e identificou uma redução numérica dessas células antes do tratamento e uma restauração das mesmas após o tratamento, o que contribuiu para a eficácia da terapia. Dessa forma, o estudo relata ainda que uma baixa frequência de pDCs e concentrações elevadas de IL-10 é um preditor de falha virológica.

No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que a diminuição das DCs no sangue periférico pode ser devido à migração para os linfonodos, onde elas podem ativar a resposta imune. Vários estudos sugerem que a diminuição da função imunológica das células dendríticas mielóides e plasmocitóides no sangue periférico têm sido associadas com o grau

de inflamação no fígado, sugerindo que em parte, a um aumento do recrutamento e acúmulo destas células no tecido hepático (GALLE et al., 2001; WURTHEIMER et al., 2004; NATTERMAN et al., 2006; NASCIMBENI et al., 2012).

Em um estudo com indivíduos tratados com PEGIFN+RBV, Mengshol et al., (2009) reforçam a hipótese de que a diminuição sérica das células pDCs, em consequência do aumento da quimiotaxia via IP-10 (CXCL-10) antes do tratamento, podem estar relacionadas à persistência viral e/ou falha virológica; e que em pacientes com baixa concentração sérica de IP-10 antes do tratamento, foi observado maior taxa de resposta virológica sustentada.

Em relação à resposta antiviral com DAAs, relatamos em pacientes com infecção crônica pelo HCV concentrações séricas elevadas de IP-10 (CXCL-10) e baixa frequência de pDCs circulantes antes da terapia com DAAs, resultando em altas taxas de RVS. Como podemos observar, nossos dados diferem dos achados anteriores, uma vez que foi demonstrado que a terapia com sucesso no uso de IFN+RBV é capaz de se obter RVS em baixa concentração de IP-10 antes do tratamento. Após a terapia observamos que 94,3% dos nossos pacientes alcançaram RVS com redução na concentração sérica dessa quimiocina e aumento de pDCs no sangue periférico, acreditamos que em virtude da eliminação do estímulo viral ocorre essa mudança no perfil.

Os linfócitos T e B são peças essenciais para o controle da infecção pelo HCV. A esse respeito, existem dois principais mecanismos efetores da resposta imune adaptativa: as respostas celulares compreendendo linfócitos T CD4 auxiliares (Th) e linfócitos T CD8 citotóxicos (CTL) e as respostas imunes humorais consistindo de anticorpos neutralizantes e específicos para o HCV produzidos por linfócitos B. O *priming* das células da imunidade consiste no reconhecimento do epítipo e/ou proteína específica do vírus, sendo este o principal mecanismo efetor necessário para ambas às respostas imunes adaptativas (SPAAN et al., 2012; ABDELWAHAB, 2016).

A disfunção dos Linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ podem afetar potencialmente a imunidade adaptativa em pacientes com infecção crônica pelo HCV, contribuindo para o desenvolvimento da infecção persistente. Em contraste, as respostas amplas e potentes das células T específicas e uma rápida indução da resposta de anticorpos neutralizantes são preditores na depuração viral (LAUER et al., 2004; HALLIDAY et al., 2011).

Analisando os linfócitos TCD4⁺ do sangue periférico, nossos resultados demonstraram diminuição significativa nos pacientes cronicamente infectados pelo HCV antes do tratamento em comparação ao grupo controle. Entretanto, embora o número de linfócitos TCD4⁺ tenha

sido menor que o controle, o perfil de ativação celular CD69⁺ foi maior nesses pacientes cronicamente infectados pelo HCV antes do tratamento.

Na análise dos fenótipos das células TCD4⁺ do sangue periférico e do tecido hepático Souza-Cruz et al., (2016), observaram baixa frequência dessas células intra-hepáticas em pacientes com fibrose hepática avançada (F3-4). A baixa contagem de células TCD4⁺ pode contribuir para a persistência viral.

Além disso, podemos também observar em nossos dados que as células TCD4⁺ e células T ativadas CD69⁺ indicam certa recuperação/reversibilidade após o tratamento com DAAs. Especulamos que, a diminuição da carga viral induzida pelo tratamento poderia permitir um reestabelecimento eficaz da resposta das células imunológicas específica do HCV.

O tratamento do HCV foi transformador pela capacidade dos antivirais de ação direta de inibir a replicação do HCV de forma eficaz. Os poucos estudos disponíveis na literatura indicam que o tratamento com DAAs melhorou a proliferação de células T específicas para o HCV em pacientes nos quais o vírus foi erradicado com sucesso por meio da terapia com DAAs. Isto está em contraste com o que é visto na terapia baseada em PegIFN, que demonstram não restaurar a função das células T durante e após a infecção crônica pelo HCV (MARTIN et al., 2014; BURCHILL et al., 2015). Muitos estudos ainda precisam ser feitos a fim de elucidar essa hipótese, pois é tentador especular que a recuperação das células T foi alcançada com regimes livres de IFN e que pode ter contribuído para as altas taxas de cura sustentada (MAINNI et al., 2014).

Os linfócitos T citotóxicos atuam em conjunto com os linfócitos TCD4⁺ e são amplamente eficientes no controle antiviral (SHOUKRY et al., 2003). Estudos mostram que a resposta em indivíduos com infecção resolvida por HCV apresenta proliferação robusta de células T CD8⁺ persistente e forte (LAUER et al., 2004). Lechner et al., (2000) demonstraram que pessoas com hepatite aguda que apresentam respostas fortes de CTL e amplamente dirigidas controlam com sucesso a infecção pelo HCV. Entretanto, acredita-se que os CTL contribuam para a inflamação e danos hepáticos durante a doença.

Na infecção crônica pelo HCV, os CTLs específicos para o HCV apresentam um fenótipo exaurido e pró-apoptótico de acordo com o nível da viremia, caracterizado por proliferação prejudicada, baixa citotoxicidade e secreção de interferon- γ . A diminuição da carga viral induzida pelo tratamento com DAA pode restaurar uma resposta reativa de CTL específica do HCV durante a terapia, culminando em alta taxa de resposta sustentada (LARRUBIA et al., 2015).

Nossos resultados mostraram que houve um forte aumento de linfócitos T CD8⁺ ativados no sangue periférico dos pacientes no início do tratamento com subsequente diminuição dessas células após o tratamento. Especulamos que o aumento de CTL ativados no início da terapia, resultou na diminuição da viremia e indução da RVS. Dados da literatura demonstram que na infecção persistente pelo HCV ocorre redução substancial de células TCD8⁺ específicas após a eliminação do vírus e que em indivíduos cronicamente infectados não é comum encontrar forte resposta de células TCD4⁺ de forma sustentada, o que difere naqueles indivíduos que eliminam o vírus espontaneamente (LECHENER et al., 2000).

Nota-se que o tratamento baseado em DAAs, apresenta restauração de CTL específico para o HCV e tem um excelente valor preditivo positivo no desenvolvimento de uma resposta sustentada. Especula-se que após a resolução do HCV os CTL tem um papel essencial na manutenção da RVS e na erradicação completa do HCV, prevenindo o risco de recaída viral (LARRUBIA et al., 2015). Neste contexto, Martin et al., (2014) relataram que durante o tratamento com DAAs, os CTL exibem restauração da resposta específica para o HCV e correlaciona com a resposta viral sustentada após tratamento bem sucedido.

Geralmente durante a infecção crônica pelo HCV existe um equilíbrio entre o controle da infecção e a imunopatogênese da hepatite C, prevenindo contra graves complicações. Esse equilíbrio é mediado pelas células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺). As células T reguladoras são uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ que desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase imune e no equilíbrio entre o dano tecidual e a proteção imunológica. Essas células têm função imunossupressora e têm sido intensamente estudadas no contexto de autoimunidade, câncer, alergias, asma e doenças infecciosas (KEYNAN et al., 2008; HARTLING et al., 2012). Há estudos que confirmam a hipótese de que as células Tregs podem desempenhar um efeito protetor no controle da resposta inflamatória crônica e do dano hepático em portadores crônicos de HCV (BOLACHI et al., 2006).

Na infecção crônica pelo HCV, as células Tregs atuam na supressão da resposta inflamatória, através do contato direto com as células T efetoras específicas para o HCV e também na produção de citocinas anti-inflamatórias/inibitórias como IL-10 e TGF-β (NEUMANN et al., 2007). Há evidências que relatam uma alta porcentagem de células Tregs circulantes em pacientes com hepatite C crônica e que secretam IL-10 e TGF-β, quando comparadas ao grupo que eliminou o vírus espontaneamente e ao grupo controle; esse fato pode explicar a atividade supressora mediada pelas Treg, promovendo uma fraca resposta de células T específicas para o HCV e a persistência da infecção (CABRERA et al., 2004).

Rushrook et al., (2005) também reforçam essa hipótese com testes *in vitro*. Os resultados do estudo fornecem uma explicação plausível para as baixas frequências e estado de maturação retardado (baixa expressão de perforina e IFN- γ) de células T CD8⁺ específicas para HCV, observadas em pacientes persistentemente infectados e indicam que a modulação da função das células Treg pode ser utilizada como uma estratégia terapêutica para o tratamento do HCV crônico.

A infecção crônica pelo HCV leva à expansão das células T regulatórias, estas por sua vez são capazes de suprimir, pelo menos em parte, as respostas das células T CD8⁺ específicas para o vírus durante a infecção crônica pelo HCV. Logo, a presença das células Tregs pode contribuir para a permanência do vírus em pacientes infectados pelo HCV (BOETTLER et al., 2005).

As células Tregs são a principal fonte secretadora de IL-10, ao qual desempenha um papel vital na mediação da supressão de células T na infecção viral persistente. A IL-10 é conhecida como uma citocina anti-inflamatória e imunomoduladora da resposta imune, que também possui propriedades antifibróticas e desempenha um papel essencial na progressão de doenças hepáticas (STEINKE & BORISH, 2006).

Curiosamente, em nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas referentes à população de células T reg nem antes e nem após o tratamento, nos diferentes grupos estudados. Souza-Cruz et al., (2016) encontraram um aumento de linfócitos T regs no sangue periférico de pacientes com hepatite C sugerindo que há uma resposta regulatória nesses pacientes, o que poderia estar relacionado com o percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ encontrados no sangue durante esta avaliação.

Sturm et al., (2010); Amoroso et al., (2012) ao analisarem biópsias hepáticas de pacientes com hepatite C crônica por avaliação imuno-histoquímica de células Foxp3⁺ demonstraram que houve maiores proporções de células Treg e IFN- γ nos pacientes do que no grupo controle. Além disso, foram observadas maiores proporções de células Tregs intra-hepáticas, principalmente em áreas necroinflamatórias do que no sangue periférico. Esses dados corroboram com nossa hipótese de que estas células estejam migrando para o sítio de inflamação, devido à baixa frequência encontrada de nossas células Treg no sangue periférico.

Acredita-se que o perfil e a intensidade das respostas imunológicas celulares e humorais do hospedeiro durante a fase aguda da infecção pelo HCV sejam determinantes para alcançar o sucesso do *clearance*. No entanto, é fato que o HCV escapa de anticorpos neutralizantes em pacientes cronicamente infectados. Contudo, o papel desempenhado pelos

anticorpos neutralizantes (nAbs) na depuração do vírus é a capacidade de neutralizar, ou até mesmo destruir antígenos. Porém, tem sido visto que a maioria das pessoas cronicamente infectadas pelo HCV que culmina na produção de anticorpos contra várias proteínas do vírus da hepatite C, não são eficientes (HELLE et al., 2011).

Em geral, os linfócitos B são essenciais para produção de anticorpos anti-HCV e também como célula apresentadora de antígeno. Já os linfócitos B1 (LB1) constituem uma subpopulação distinta dos linfócitos B convencionais (B2) com forte capacidade autorrenovadora. Os LB1 parecem representar a primeira linha de defesa contra infecções sistêmicas por vírus e bactérias e são de fundamental importância para o equilíbrio homeostático do organismo. Além disso, eles são responsáveis pela produção da maior parte das imunoglobulinas de classe IgM e IgM naturais (MESQUITA et al., 2010).

Quando avaliamos o percentual de linfócitos B, observamos que não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados. No entanto, na população de linfócitos B1 nota-se diminuição na frequência dessas células após o tratamento quando comparadas ao grupo controle. Indicando que estas células parecem ter uma atividade importante no combate a infecção viral crônica.

6.3 Análise da Quantificação das Citocinas Séricas Th1, Th2 e Th17 e Treg e das Quimiocinas Séricas nos pacientes com hepatite C e grupo controle

Durante a infecção pelo HCV, inúmeras citocinas e quimiocinas são produzidas tanto no fígado quanto na circulação sanguínea, assumindo um papel preditor no controle da replicação viral e contribuindo para o dano tecidual através da amplificação da resposta imunológica contra o HCV (NELSON et al., 2001). As citocinas e quimiocinas são mediadores intercelulares da inflamação crônica e estão diretamente envolvidos na imunopatogênese, progressão e resultado do tratamento da infecção crônica pelo HCV (STEINKE & BORISH, 2006; FALLAHI et al., 2012).

O atual tratamento da hepatite C é constituído por uma nova terapia livre de IFN e pela primeira vez nos permite investigar as consequências imunológicas da depuração viral em pacientes com infecção crônica pelo HCV que, na maioria dos indivíduos persiste há anos. Os resultados encontrados neste amplo estudo mostraram que, o ambiente alterado de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias dos pacientes *naïves* e experimentados não normalizaram após a eliminação viral, embora os níveis da maioria dos parâmetros pró e anti-inflamatórios

tenham sido menores nos pacientes *naives* em comparação aos pacientes experimentados, estes permanecessem no mesmo nível após o tratamento.

É importante ressaltar que o perfil apresentado não afetou a RVS. Estes achados corroboram com os de Hengst et al., (2016), aos quais demonstraram que o HCV parece controlar o meio de mediadores inflamatórios solúveis, mesmo após a eliminação viral. Além disso, foi visto que mesmo após a depuração do vírus, não ocorre à completa restituição imunológica.

Em geral, foram encontradas diferenças significativas nas concentrações das citocinas IL-6 e IL-17A e das quimiocinas IL-8/CXCL-8, MIG/CXCL-9 e IP-10/ CXCL-10 no soro dos pacientes com hepatite C crônica quando comparadas ao grupo controle. Quanto às demais citocinas e quimiocinas, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas.

Posteriormente, ao analisarmos os subgrupos podemos observar que quanto mais experiência no tratamento, maiores são as concentrações encontradas das citocinas no soro dos pacientes com hepatite C crônica. Os pacientes experimentados apresentam um aumento das citocinas séricas Th1 (IL-6, TNF- α e IFN- γ), exceto a IL-2, Th2 (IL-4), Treg (IL-10) e Th17 (IL-17A), e das quimiocinas (IL-8/CXCL-8, MIG/CXCL-9 e IP-10/CXCL-10), exceto a MCP-1/CCL-2 e RANTES/CCL-5 em comparação ao grupo controle, enquanto que os pacientes *naives* apresentaram concentrações diminuídas de IL-17A e concentrações aumentadas das quimiocinas IL-8/CXCL-8, MIG/CXCL-9 e IP-10/CXCL-10 quando comparados ao grupo controle.

Em terapias contendo interferon, foi observado que o nível de ativação imunológica pré-tratamento, refletiu na concentração de citocinas solúveis no soro e correlaciona-se com resultado positivo do tratamento e reflete de perto a atividade inflamatória do fígado, principalmente naqueles pacientes que alcançaram resposta virológica sustentada (JABLOSNKA et al., 2015).

Estudos prévios ainda sugerem que a presença de um perfil pró-inflamatório modulado no início do tratamento favorece a RVS, enquanto a resposta inflamatória exacerbada predispõe à falha terapêutica ou não resposta. Além disso, os resultados demonstram que um padrão sérico predominantemente pró-inflamatório, representado pela elevação de RANTES/CCL5, IFN- α e IFN- γ , associados a níveis diminuídos da IL-10 em pacientes não

respondedores, e níveis elevados de IL-6 e TNF- α se correlaciona com a recidiva virológica tardia. Em suma, pacientes com RVS apresentaram perfil pró-inflamatório menos acentuado, com níveis diminuídos de CXCL8/IL-8, IL-12 e IL-17. Por fim, esses dados sugerem que o padrão basal de citocinas séricas pró-inflamatórias-regulatórias e o status de ativação imunológica de pacientes crônicos com HCV submetidos à terapia com PEG-IFN- α 2A / ribavirina estão intimamente relacionados com a resposta terapêutica (ARAÚJO et al., 2013).

Esses achados também foram vistos por Menezes et al., (2017) ao demonstrarem que a presença de um perfil pró-inflamatório no início do tratamento com predomínio de RANTES/CCL5, IFN- α , IFN- γ , IL-6 e TNF- α na monoterapia com IFN pode estar associado a falha terapêutica, pois os indivíduos que atingiram RVS apresentaram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias.

O aumento do recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção é proveniente das quimiocinas MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, GRO α /CXCL1 e IL-8/CXCL8 que promovem um microambiente profibrótico dentro do fígado inflamado pela interação direta com as células estreladas hepáticas (HSCs) (LIASKOU et al., 2013).

A expressão elevada de IL-8/CXCL-8 resulta no aumento acentuado de neutrófilos para o fígado. Os neutrófilos têm um papel essencial durante o controle da infecção, primeiro devido à sua capacidade de fagocitar microrganismos, e segundo por liberarem outros mediadores quimiotáticos, como CXCL1, CXCL8, CXCL9 e CXCL10, os quais recrutam outros leucócitos para os tecidos afetados. Níveis hepáticos aumentados de IL-8/CXCL8 induz a progressão de processo necro-inflamatório (FAHEY et al., 2014; PALOMINO & MARTI, 2015).

O aumento na expressão de CXCL-8 hepática e periférica correlaciona-se positivamente com o aumento do TNF- α e com o avanço da fibrose, visto que o aumento pronunciado da CXCL-8 é observado em pacientes com maior grau de infiltração de neutrófilos, cirrose e comprometimento da função hepática (NEUMAN et al., 2007).

No presente estudo nota-se aumento significativo nas concentrações de IL-8/CXCL-8 e IFN- γ nos pacientes infectados com HCV em relação ao grupo controle. Corroborando com os nossos resultados, dados similares foram descritos por Han et al., (2005) em pacientes tratados com PEGIFN e RBV. Tendo em vista que a elevação da IL-8/CXCL-8 está associada ao controle da infecção hepática, especialmente em não respondedores ao tratamento da

infecção pelo HCV. Esse aumento de IL-8/ CXCL-8 e diminuição de IFN- γ não foram associados à falha na terapia com DAAs. Todavia, sugere-se que essa citocina e quimiocina podem ser usadas como preditores para a probabilidade de falha ao tratamento baseado em PEGIFN α -2a e RBV.

A MCP-1/CCL-2 é uma importante quimiocina quimiotática envolvida no recrutamento de monócitos/macrófagos e células T para áreas de inflamação, com alta ação profibrogênica regulada no fígado, desempenhando papéis cruciais no recrutamento de monócitos e ativação de HSC na indução de fibrose hepática. Níveis elevados circulantes no soro e no tecido inflamado têm sido associado à rápida progressão para insuficiência hepática em pacientes com HCV (LIU et al., 2017).

A quimiocina IP-10 (CXCL-10) é uma quimiocina produzida em resposta ao IFN γ e um importante indicador do reconhecimento viral do sistema imune inato. Níveis mais elevados de IP-10/CXCL-10 no início do tratamento foram significativamente associados à resposta Viroológica rápida (RVR) na terapia com IFN e RBV (LEE et al., 2017).

Carlin et al., (2015) demonstraram que níveis médios de IP-10/CXCL-10, MCP-1/CCL-2, MIP-1 β /CCL-4 e IL-18 diminuem com a terapia com DAAs, mas apresentam uma dinâmica diferente no final do tratamento e após o término da terapia. No tratamento, os níveis de IP-10 e MIP-1 β /CCL-4 foram significativamente maiores nos indivíduos que alcançaram resposta virológica sustentada (RVS).

A incapacidade de controlar a infecção leva ao recrutamento de infiltrados inflamatórios no parênquima hepático por quimiocinas indutíveis por IFN- γ como a MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 e I-TAC/CXCL11, o que resulta em dano hepático sustentado e, eventualmente, em cirrose hepática (FALLAHI et al., 2012)

O HCV interfere com as citocinas em vários níveis e evita a resposta imune induzindo um perfil de citocinas Th2 ou fibrogênico. Souza-Cruz et al., (2016) ao estudarem populações de pacientes com hepatite C crônica com diferentes graus de fibrose, notou-se que a concentração de IL-10 e IL-6 apresentaram-se elevada somente nos indivíduos do grupo de fibrose moderada \leq F2 em relação ao grupo de fibrose avançada \geq F3, sugerindo uma atividade regulatória e anti-inflamatória protetora nesse grupo.

Por outro lado, têm sido visto que pacientes com hepatite C crônica tratados com PEGIFN+RBV e que apresentam aumento da citocina regulatória IL-10, pode de fato

comprometer a resposta imune do hospedeiro (HAN et al., 2015). Ainda a respeito disso, Yoneda et al., (2011) encontraram uma forte associação entre altas concentrações séricas da citocina IL-10 que prevê uma não resposta á terapia de PEGIFN e RBV. Menezes et al., (2017) divergem a esses achados, ao associarem níveis diminuídos de IL-10 á falha terapêutica na monoterapia com IFN. Em nossa coorte de pacientes não houve alteração estatisticamente significativa de IL-10 no regime contendo DAAs. Vale lembrar que nossos dados não apresentam concentrações significativas nos paciente com CHC quando comparados ao grupo controle.

O aumento das células Th17 e níveis elevados de IL-17 também está associado a danos hepáticos graves, uma vez que estas citocinas participam do reparo tecidual e do recrutamento de células inflamatórias durante as respostas Th1. Tem sido visto que, menores respostas imunológicas do perfil Th17 são acompanhadas por um ambiente menos fibrogênico, bem como imunidade aumentada do perfil Th1 que podem favorecer a resposta virológica rápida (RVR) durante a fase aguda da terapia baseada em IFN / RBV. No entanto, níveis plasmáticos mais elevados de IL-17A estão relacionados à pacientes com não RVR (LEE et al., 2017). Nota-se que nossos dados apresentam maiores concentrações de IL-17A antes do tratamento quando comparados ao grupo controle, além de um ambiente menos fibrótico.

Olhando para este resultado e o que existe relatado na literatura, sabemos que o tratamento para eliminação do HCV não descarta a possibilidade do desenvolvimento do câncer hepático (BRASIL, 2018). Pacientes experimentados apresentaram níveis elevados de IL17A antes e após o tratamento com DAAs. Portanto, acreditamos que é de fundamental importância avaliar não somente estes pacientes quanto a RVS, mas avaliar a restauração do perfil imunológico a fim de podermos detectar alterações sugestivas de comprometimento progressivo no tecido hepático através de biomarcadores séricos.

Como o controle da produção de citocinas é altamente complexo e os efeitos das citocinas estão difundidos em várias redes regulatórias, tem sido sugerido que o rastreamento de inúmeros biomarcadores putativos poderia esclarecer melhor a imunopatogênese da doença e prever respostas à nova terapia antiviral (MENEZES et al., 2017).

Até o momento, poucos estudos foram realizados a fim de explorar as mudanças do ambiente imunológico de pacientes com hepatite C crônica antes e após o tratamento com DAAs. É necessário um acompanhamento em longo prazo para responder a importante

questão de saber se os parâmetros inflamatórios se normalizam ou se restauram em pacientes tratados com sucesso pelos DAAs.

7 CONCLUSÃO

A infecção persistente pelo HCV está associada a profundas alterações nos perfis celulares e nos níveis de mediadores inflamatórios solúveis, que estão associados à progressão da doença hepática.

Ao final deste trabalho podemos concluir que o tratamento livre de interferon é bem tolerado e apresenta elevada taxa de resposta virológica sustentada em pacientes *naives* e experientes de tratamento, independente do genótipo do vírus.

Os genótipos do HCV circulantes no Amazonas são os genótipos 1, 3, 2 e 4. Porém os dois casos de falha ao tratamento apresentaram genótipo 1 do HCV com idade acima de 50 anos.

O perfil celular acompanhado do perfil de citocinas e quimiocinas parecem não haver reversibilidade completa com 12 semanas após o término do tratamento, podendo estar relacionado com a presença de doença hepática instalada.

O perfil de citocinas e quimiocinas podem prever biomarcadores putativos para o alcance da RVS e pode fornecer subsídios para avaliações posteriores de estadiamento de doença hepática relacionada à hepatite C tratada com DAAs.

Referências

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GHAFFAR, TY *et al.* Hepatitis C genotype 4: The past, present and future. **World Journal of Hepatology** v. 7, n. 28 p. 2792-2810 , 2015.

ABDELWAHAB, SF. Cellular immune response to hepatitis-C-virus in subjects without viremia or seroconversion: is it important? **Infectious Agents and Cancer** v. 11, n. 1, p. 23 , 2016.

ABDEL-HAKEEM, MS *et al.* Comparison of immune restoration in early vs. late alpha interferon therapy against hepatitis C virus. **J Virol.** 84: 10429–10435, 2010.

ADINOLFI, LE & GUERRERA, B. All-oral interferon-free treatments : The end of hepatitis C virus story , the dream and the reality. **World Journal of Hepatology** v. 7, n. 22, p. 2363–2368 , 2015.

AHMED, A & FELMLEE, DJ. Mechanisms of Hepatitis C Viral Resistance to Direct Acting Antivirals. **Viruses** n. December, p. 6716–6729 , 2015.

AHLENSTIEL, G *et al.* Early Changes in Natural Killer Cell Function Indicate Virologic Response to Interferon Therapy for Hepatitis C. **Gastroenterology** 141(4):1231-1239.e2, 2011.

ALAZAWI, W *et al.* Alimentary Pharmacology and Therapeutics Systematic review : outcome of compensated cirrhosis due to chronic hepatitis C infection. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics** n. May , 2010.

AMOROSO, A *et al.* Evaluation of circulating CD4+CD25+ and liver-infiltrating Foxp3+ cells in HCV-associated liver disease. **Int J Mol Med.** 29(6):983-8, 2012.

APPEL, N *et al.* Mutational Analysis of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A : Potential Role of Differential Phosphorylation in RNA Replication and Identification of a Genetically Flexible Domain. **Journal of virology** v. 79, n. 5, p. 3187–3194 , 2005.

ARAÚJO, AR *et al.* Resposta virológica sustentada em pacientes com co-infecção pelos genótipos 1 e 2 do vírus da hepatite C, com apenas nove semanas de terapêutica antiviral: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.43, n.5, pp.605-607, 2010.

ARAÚJO, AR *et al.* Characterization of hepatitis C virus in chronic hepatitis patients: genotypes in the State of Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 44, n. 5, p. 638–640, 2011.

ARAÚJO, AR *et al.* Dual role of IL-12 in the therapeutic efficacy or failure during combined PEG-Interferon- α 2A and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. **Immunol Lett** 154(2):61-9, 2013.

ASSELAH, T. International Hepatology Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection : An oral combination therapy with high antiviral efficacy International Hepatology. **Journal of Hepatology** v. 61, n. 2, p. 435–438 , 2014.

ASSELAH, T & MARCELLIN, P. Interferon free therapy with direct acting antivirals for HCV. **Liver International** p. 93–104 , 2013.

BACKUS, LI *et al.* Original articles — liver , pancreas , and biliary tract. A Sustained Virologic Response Reduces Risk of All-Cause Mortality in Patients With Hepatitis C. **CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY** v. 9, n. 6, p. 509–516.e1 , 2011.

BATALLER R & BRENNER DA. Liver fibrosis. **Jounal Clinical Investigation** ;115: 209-218, 2005.

BARIL, M *et al.* MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. **J Virol** 83:1299–311, 2009.

BERSUSA, AAS *et al.* Tratamento de adultos com hepatite viral C crônica de genótipo 1 com inibidores de protease (boceprevir e ou telaprevir). **Avaliação de Tecnologias de Saúde** v. 14, p. 221–228 , 2012.

BENDELAC, A *et al.* The biology of NKT cells. **Annu Rev Immunol.** 25:297–336, 2007.

BERTINO, G *et al.* Hepatitis C Virus : Global view Chronic hepatitis C : This and the new era of treatment. **World journal of gastroenterology** v. 8, n. 2, p. 92–106 , 2016.

BLANCHARD, E *et al.* Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. **J Virol** v. 80, n. 14, p. 6964–6972 , 2006.

BLIGHT, KJ *et al.* Efficient Replication of Hepatitis C Virus Genotype 1a RNAs in Cell Culture. **Journal of virology** v. 77, n. 5, p. 3181–3190 , 2003.

BOLACCHI, F *et al.* Increased hepatitis C virus (HCV) -specific CD 4 + CD 25 + regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD 4 + T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. **clinical and experimental immunology** p. 188–196 , 2006.

BOETTLER, T *et al.* T Cells with a CD4+CD25+ Regulatory Phenotype Suppress In Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8+ T Cells during Chronic Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Virology** 79(12):7860-7867, 2005.

BRANCHE, E *et al.* Hepatitis C Virus Increases Occludin Expression via the Upregulation of Adipose Differentiation-Related Protein. **PLoS ONE** p. 1–16 , 2016.

BRASIL. Boletim Epidemiológico - Hepatites virais. **Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV) SAF** v. 15, p. 1–72 , 2016.

BRASIL. Boletim Epidemiológico - Hepatites virais. **Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais** , 2011.

BRASIL. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites a, b e c nas capitais do brasil. **Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais - Recife PE** , 2010.

BRASIL. Hepatites Virais. **Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais** p. 1–25 , 2015a.

BRASIL. **Hepatites Virais : O Brasil está Atento.** [S.l: s.n.], 2008. .

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.** p. 0–85 , 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Ministério da Saúde**, Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Ministério da Saúde**, Brasília, 2018.

BURCHILL, MA *et al.* Memory re-differentiation and reduced lymphocyte activation in chronic HCV-infected patients receiving direct-acting antivirals. **Journal of Viral Hepatitis** 22(12): 983-99, 2015.

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

CARLIN, AF *et al.* Temporal dynamics of inflammatory cytokines/chemokines during Sofosbuvir and Ribavirin therapy for Genotype 2 and 3 Hepatitis C infection. **Hepatology** 62(4):1047-1058, 2015.

CDC. Center for Disease Control and Prevention - Morbidity and Mortality Weekly Report. v. 62, n. 18, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6218a5.htm>>.

CHOO, QI *et al.* Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A , Non-B Viral Hepatitis Genome. **Science** v. 244, 1989.

CHOO, QL *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Biochemistry** v. 88, n. March, p. 2451–2455, 1991.

CHOO, QL *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci** v. 91, n. February, p. 1294–1298, 1994.

CROSIGNANI, A *et al.* Analysis of peripheral blood dendritic cells as a non-invasive tool in the follow-up of patients with chronic hepatitis C. **World Journal of Gastroenterology** 22(4):1393-1404, 2016.

DAKLINZA. Daclatasvir é uma marca de Bristol-Myers Squibb Company. , 2016.

DEVRIES, ME *et al.* Defining the Origins and Evolution of the

Chemokine/Chemokine Receptor System. **The Journal of Immunology** n. 176, p. 401–415 , 2006.

DESSOUKI, O *et al.* Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. **Biochem Biophys Res Commun.** 5;393(2):331-7, 2010.

DIMITROVA, M *et al.* Protein-Protein Interactions between Hepatitis C Virus Nonstructural Proteins. **Journal of Virology** v. 77, n. 9, p. 5401–5414 , 2003.

DU, L & TANG, H. An insight into the molecular characteristics of hepatitis C. **Saudi Medical Journal** v. 37, n. 5, p. 483–491 , 2016.

DUBINETT, SM *et al.* Chemokines: Can Effector Cells be Re-directed to the Site of Tumor? **Journal Cancer** v. 16, n. 4, p. 325–335 , 2011.

EASL. Guidelines EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. **Journal of Hepatology** v. 63, p. 199–236 , 2015.

EDLICH, B *et al.* Early Changes in Interferon Signaling Define Natural Killer Cell Response and Refractoriness To Interferon-based Therapy of Hepatitis C. **Hepatology (Baltimore, Md).** 55(1):39-48, 2012.

EGGER, D *et al.* Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. **Journal of Virology** v. 76, n. 12, p. 5974–5984 , 2002.

FAHEY *et al.* The role of chemokines in acute and chronic hepatitis C Infection. **Cellular & Molecular Immunology.** 2014.

FALLAHI, P *et al.* Cytokines and HCV-Related Disorders. **Clinical and Developmental Immunology** 468107, 2012.

FELD, JJ *et al.* Ribavirin improves early responses to peginterferon through enhanced interferon signaling. **Gastroenterology** v. 139, n. 1, p. 154–162 , 2010.

FELD, JJ & HOOFNAGLE, JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature** v. 436, n. August , 2005.

FERNANDEZ-YUNQUEIRA, A *et al.* Update on the use of direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C virus infection. **Rev Esp Quimioterapia** v. 26, n. 3, p. 189–192 , 2013.

FERREIRA, ARP *et al.* Disease burden of chronic hepatitis C in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 9, n. 4, p. 363–368 , 2015.

FRIEDMAN, S L “Mechanisms of hepatic fibrogenesis,” **Gastroenterology**, 134 (6):1655–1669, 2008.

FRIED, WM *et al.* Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin for chronic Hepatitis C Virus Infection. **New England Journal of Medicine** v. 347, n. 13, p. 975–982 , 2002.

GALLE, MB *et al.* Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. **Histopathology** 39:373–381, 2001.

GALE, JM & FOY, EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature** v. 436, n. August, p. 939–946 , 2005.

GAO, M *et al.* Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. **Nature** v. 465, n. 7294, p. 96–100 , 2010.

GARCÍA-SAMANIEGO, J *et al.* Factors associated with early virological response to peginterferon- α -2a/ribavirin in chronic hepatitis C. **World Journal of Gastroenterology** 19(12):1943-1952, 2013.

GARDINER, CM. NK cell function and receptor diversity in the context of HCV infection. **Frontiers in microbiology** v. 6, n. September, p. 1–10 , 2015.

GENTILE, I *et al.* Expert Opinion on Investigational Drugs Investigational direct-acting antivirals in hepatitis C treatment : the latest drugs in clinical development. **Expert Opinion on Investigational Drugs** v. 3784, n. March , 2016.

GHANY, MG *et al.* AASLD Diagnosis , Management , and Treatment of Hepatitis C : An Update. **Hepatology** p. 1335–1374 , 2009.

GOHIL, K. Pharmaceutical Approval Update. **Pharmacy and Therapeutics** v. 40, n. 6, p. 362–363 , 2015.

GOLDEN-MASON, L & ROSEN, HR. Natural Killer cells: Multi-faceted players with key roles in Hepatitis C immunity. **Immunologic Research** v. 255, n. 1, p. 68–81 , 2013.

GOLDEN-MASON, L *et al.* Early and late changes in natural killer cells in response to ledipasvir/sofosbuvir treatment. **Hepatology Communications** 2(4):364-3, 2018..

GOWER, E *et al.* Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology** v. 61, n. 1, p. S45–S57 , 2014.

GUPTA, E *et al.* Hepatitis C virus : Screening , diagnosis , and interpretation of laboratory assays. **Asian Journal of Transfusion Science** v. 8, n. 1 , 2014.

HAJARIZADEH, B *et al.* Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** v. 10, n. 9, p. 553–562 , 2013.

HALLIDAY, J *et al.* Europe PMC Funders Group Vaccination for hepatitis C virus : closing in on an evasive target. **Expert review of vaccines** v. 10, n. 5, p. 659–672 , 2011.

HAN, Z-Q *et al.* Expression profile and kinetics of cytokines and chemokines in patients with chronic hepatitis C. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine** 8(10):17995-18003, 2015.

HARTLING, HJ *et al.* CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cells (Tregs) are elevated and display an active phenotype in patients with chronic HCV mono-infection and HIV/HCV co-infection. **Scand J Immunol.** 76(3):294-305, 2012.

HELLE, F *et al.*. The Hepatitis C Virus Glycan Shield and Evasion of the Humoral Immune Response. **Viruses** 3(10):1909-1932, 2011.

HENGST, J *et al.* Direct-Acting Antiviral–Induced Hepatitis C Virus Clearance Does Not Completely Restore the Altered Cytokine and Chemokine Milieu in Patients With Chronic Hepatitis C. **The Journal of Infectious Diseases** 214(12) 1965–1974, 2016.

HEPATITE. Simeprevir Olysio - Treatment - Hepatite C. p. 3–4 , 2016. Disponível em: <www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment/drugs/sofosbuvir-drug>.

HEPATITE. Sofosbuvir Sovaldi - - Treatment - Hepatitis C. n. 1, p. 3–4 , 2014. Disponível em: <<http://www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment/drugs/sofosbuvir-drug>>.

HIROISHI, K *et al.* Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. **Journal of biomedicine & biotechnology** v. 2010, p. 263810 , 2010.

HOOFNAGLE, JH *et al.* Treatment of Chronic Non-A, Non-B Hepatitis With Recombinant Human Alpha Interferon. **The New England Journal of Medicine** , 1986.

HORNER, SM *et al.* Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nature medicine** v. 19, n. 7, p. 879–88 , 2013.

INDOLFI, G; RESTI, M. Perinatal Transmission of Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Medical Virology** v. 843, n. December, p. 836–843 , 2009.

IRSHAD, M *et al.* An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology** v. 19, n. 44, p. 7896–7909 , 2013.

JABŁOŃSKA, J *et al.* The correlation between pretreatment cytokine expression patterns in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis c outcome. **BMC Infectious Diseases** 15:556, 2015.

JENSEN, SS & GAD, M. Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. **J Inflamm** (Lond) 7:37, 2010.

KAWAI, T; AKIRA, S. Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling Taro. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 20, p. 1–20 , 2008.

KEYNAN, Y *et al.* The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections. **Clin Infect Dis.** 46(7):1046-52, 2008.

KELL, A *et al.* Pathogen-Associated Molecular Pattern Recognition of Hepatitis C Virus Transmitted / Founder Variants by RIG-I Is Dependent on U-Core Length. **Journal of Virology** v. 89, n. 21, p. 11056–11068 , 2015.

KIM, CW; CHANG, KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. **Clinical and molecular hepatology** v. 19, n. 1, p. 17–25 , 2013.

KUMTHIP, K; MANEEKARN, N. The role of HCV proteins on treatment outcomes.

Virology journal v. 12, n. 1, p. 217 , 2015.

LAMPE, E *et al.* Genetic diversity of HCV in Brazil. **Antiviral Therapy** v. 444, p. 435–444 , 2013.

LAMPE, E *et al.* Infection , Genetics and Evolution Epidemic history of Hepatitis C virus in Brazil. “**Infection, Genetics and Evolution**” v. 10, n. 7, p. 886–895 , 2010.

LANGE, CM *et al.* Emerging therapies for the treatment of hepatitis C. **EMBO Molecular Medicine** v 6, n. 01, 2014.

LARRUBIA, J-R *et al.* Hepatitis C virus-specific cytotoxic T cell response restoration after treatment-induced hepatitis C virus control. **World Journal of Gastroenterology** 21(12):3480-3491, 2015.

LAUER, GM & WALKER, BD. Hepatitis C virus infection. **New England Journal of Medicine** v. 345, n. 1, p. 41–52 , 2001.

LAUER, GM *et al.* High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. **Gastroenterology** 127(3):924-36, 2004.

LAWITZ, E *et al.* Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients : the COSMOS randomised study. **MThe Lancet** v. 6736, n. 14, p. 1–10 , 2014.

LAWITZ, E *et al.* A phase 3, open-label, single-arm study to evaluate the efficacy and safety of 12 weeks of simeprevir (SMV) plus sofosbuvir (SOF) in treatment-naive or -experienced patients with chronic HCV genotype 1 infection and cirrhosis: OPTIMIST-2 [Abstract]. **J Hepatol** 62:S263, 2015.

LAWITZ, E *et al.* Simeprevir plus sofosbuvir in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection and cirrhosis: A phase 3 study (OPTIMIST-2). **Hepatology (Baltimore, Md)**. 64(2):360-369, 2016.

LEITEMPERGUER, MR; BECK, ST. Prevalência sorológica e intensidade da resposta humoral ao Vírus da Hepatite C entre os indivíduos atendidos em um hospital público . Seroprevalence and the intensity of the humoral response among HCV chronic

infected individuals attending in a public ho. **Ciências Biológicas e da Saúde** p. 3–10 , 2009.

LECHNER, F *et al.* Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. **The Journal of Experimental Medicine** 191(9):1499-1512, 2000.

LE, Y *et al.* Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. Review **Cell Mol Immunol.** 1(2):95-104, 2004.

LEE, JW *et al.* Immunological dynamics associated with rapid virological response during the early phase of type I interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. **PLOS ONE** 12(6): e0179094, 2017.

LI, XD *et al.* Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102:17717–22, 2005.

LIASKOU *et al.* Monocyte Subsets in Human Liver Disease Show Distinct Phenotypic and Functional Characteristics. **Hepatology**, 2013.

LIN, R *et al.* Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. **J Virol.** 80:6072–83, 2006.

LINDENBACH, BD & RICE, CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature** v. 436, n. August, p. 933–938 , 2005.

LINDENBACH, BD & RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 10, p. 688–700, 2013.

LLOYD, AR *et al.* Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunology and Cell Biology.** November 2006, p. 24–32, 2007.

LIU, HM; JUNIOR, M G. Hepatitis C Virus Evasion from RIG-I-Dependent Hepatic Innate Immunity. **Gastroenterology Research and Practice**, 2010.

LIU, Z *et al.* Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and New Concept: A Review. **International Journal of Medical Sciences** 11(9):925-935, 2014.

LIU *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1 released from macrophages induced by hepatitis C virus promotes monocytes migration. **Virus Research.** 2017.

LURIE, Y *et al.* 2015 Advances in Cirrhosis Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology** v. 21, n. 41, p. 11567–11583, 2015.

LYU, J *et al.* Roles of lipoprotein receptors in the entry of hepatitis C virus. **World Journal of Hepatology** v. 7, n. 24, p. 2535–2542, 2015.

MACDONALD, A & HARRIS, M. Hepatitis C virus NS5A : tales of a promiscuous protein. **Journal of General Virology** p. 2485–2502, 2004.

MACDONALD, AJ *et al.* Monocyte-derived dendritic cell function in chronic hepatitis C is impaired at physiological numbers of dendritic cells. **Clinical and Experimental Immunology** 148(3):494-500, 2007.

MADAN, V & BARTENSCHLAGER, R. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin. **Viruses** p. 4461–4481, 2015.

MANIGOLD, T *et al.* Foxp3 + CD4 + CD25 + T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. **Immunobiology** v. 107, n. 11, p. 4424–4433, 2016.

MANNS, MP *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **The Lancet** v. 358, n. 9286, p. 958–965, 2001.

MAINI, MK & SCHURICH, A. Direct-acting antivirals trump interferon-alpha in their capacity to rescue exhausted T cells upon HCV clearance. **J Hepatol.** 61(3), 459–461, 2016.

MARTIN, B *et al.* Restoration of HCV-specific CD8+ T-cell function by interferon-free therapy. **J Hepatol.** 61: 538–543, 2014.

MARTINEZ-ESPARZA, M *et al.* Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology** v. 21, n. 41, p. 11522–11541, 2015.

MCHURCHISON, JG *et al.* Interferon Alfa-2b Alone or in Combination With Ribavirin as Initial Treatment for Chronic Hepatitis C. **The New England Journal of Medicine** p. 1485–1492, 1998.

MELLO, CEB. Tratamento da hepatite crônica pelo vírus C Novas perspectivas.

Hepatology n. 48, p. 23–32 , 2013.

MENEZES, EG *et al.* Strategies for serum chemokine/cytokine assessment as biomarkers of therapeutic response in HCV patients as a prototype to monitor immunotherapy of infectious diseases. **Antiviral Research** 141; 19-28, 2017.

MENGSHOL, JA *et al.* Impaired plasmacytoid dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C virus: associations with antiviral treatment outcomes. **Gut** 58(7):964-973, 2009.

MESSINA, JP *et al.* Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology** v. 61, n. 1, p. 77–87 , 2015.

MESQUITA, DJ *et al.* Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol** 50(5):552-80, 2010.

MILAZZO, L *et al.* Rapid Virological Response: Is It Four or Eight Weeks? **Hepatology** p. 979–982 , 2012.

MORADPOUR, D *et al.* Replication of hepatitis C virus. **Nature reviews. Microbiology** v. 5, n. 6, p. 453–63 , 2007.

MURPHY, DG *et al.* Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C / E1 and 5' J Untranslated Region Sequences □. **Journal of Clinical Microbiology** v. 45, n. 4, p. 1102–1112 , 2007.

NAKANO, T *et al.* An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. **Liver International** p. 339–345 , 2011.

NAKAMURA, M *et al.* Alanine Aminotransferase Elevation during Peginterferon Alpha-2a or Alpha-2b plus Ribavirin Treatment. **International Journal of Medical Sciences**, 10(8), 1015–1021, 2013.

NASCIMBENI, M *et al.* Recruitment and interaction of human dendritic and T cells in autologous liver slices experimentally infected with HCV produced in cell culture. **J Immunol Methods**. 378:51–55, 2012.

NATTERMANN, J *et al.* The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells. **Am J Pathol.** 166:443–453, 2005.

NATTERMANN, J *et al.* Hepatitis C virus E2 and CD81 interaction may be associated with altered trafficking of dendritic cells in chronic hepatitis C. **Hepatology** 44:945–54, 2006.

NELSON, DR *et al.* All-Oral 12-Week Treatment With Daclatasvir Plus Sofosbuvir in Patients With Hepatitis C Virus Genotype 3 Infection: ALLY-3 Phase III Study. **Hepatology** p. 1127–1135 , 2015.

NELSON, DR *et al.* The immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin. Liver Dis.** 5(4)931-53, 2001.

NEUMANN-HAEFELIN, C *et al.* Host and viral factors contributing to CD8+ T cell failure in hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol.** 13: 4839–4847, 2007.

NORRIS, S *et al.* Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. **J Hepatol.** 28:84–90, 1998.

PALOMINO, DCT & MARTI, LC. Chemokines and immunity. **Revendo Ciências Básicas** 13(3):469-73, 2015.

PARK, SH *et al.* Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. **Immunity** v. 40, n. 1, p. 13–24 , 2014.

PASTORE, L *et al.* Detection of hepatitis C virus - RNA in saliva from chronically HCV - infected patients . **Rev Int Journal Immunopathology Pharmacology** v. 19, n. 1, p. 3–4 , 2006.

PEREIRA, L *et al.* Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil , 2005 through 2009 : a cross-sectional study. **BMC infectious diseases** , 2013.

PERRELLA, A *et al.* Flow cytometry assay of myeloid dendritic cells (mDCs) in peripheral blood during acute hepatitis C: Possible pathogenetic mechanisms. **World J Gastroenterol** 21; 12(7): 1105-1109, 2006.

PLOSS, A & EVANS, M. Hepatitis C virus host cell entry. **Curr Opin Virol** v. 2, n. 1, p. 14–19 , 2013.

POL, S *et al.* Safety and efficacy of daclatasvir-sofosbuvir in HCV genotype 1-mono-infected patients. **Journal of Hepatology** , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.021>>.

POPESCU, CI *et al.* NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. **Plos Pathogens** v. 7, n. 2 , 2011.

PRECIADO, MV *et al.* Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. **World journal of gastroenterology : WJG** v. 20, n. 43, p. 15992–6013 , 2014.

QIAN, XJ *et al.* Entry inhibitors : New advances in HCV treatment. **Nature** n. September 2015 , 2016.

RANA, D *et al.* Functional reconstitution of defective myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C infection on successful anti-viral treatment. **Liver Int.** 32:1128–37, 2012.

RANA, D *et al.* Success of antiviral therapy in chronic hepatitis C infection relates to functional status of myeloid dendritic cells. **The Indian Journal of Medical Research.** 138(5):766-778, 2013.

REHERMANN, B. Natural Killer Cells in Viral Hepatitis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology** v. 1, n. 6, p. 578–588 , 2015.

RODRIGUEZ-TORRES, M *et al.* Factors associated with rapid and early virologic response to peginterferon alfa-2a/ribavirin treatment in HCV genotype 1 patients representative of the general chronic hepatitis C population. **Journal of Viral Hepatitis.** 17(2):139-147, 2010.

ROSEN, HR. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. **The Journal of Clinical Investigation** v. 123, n. 10 , 2013.

RUSHBROOK, SM *et al.* Regulatory T Cells Suppress In Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8+ T Cells during Persistent Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Virology** 79(12):7852-7859, 2005.

SAEED, U *et al.* Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** v. 4, n. 2, p. 88–96 , 2014.

SAITO, T *et al.* Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of Hepatitis C virus RNA. **Nature** v. 454, n. 7203, p. 523–527 , 2008.

SAITO, K *et al.* Hepatitis C Virus Inhibits Cell Surface Expression of HLA-DR, Prevents Dendritic Cell Maturation, and Induces Interleukin-10 Production. **Journal of Virology** 82(7):3320-3328, 2008.

SAMUEL, CE. Antiviral Actions of Interferons. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS** v. 14, n. 4, p. 778–809 , 2001.

SCHEEL, TKH & RICE, CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. **Nature Medicine** v. 19, n. 7, p. 349–837 , 2013.

SCHOGGINS, JW & RICE, CM. Innate immune responses to hepatitis C virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v. 369, p. 219–242 , 2013.

SEBASTIANI, G *et al.* Chronic hepatitis C and liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology** 20 (32):11033-11053, 2014.

SEKI, E & BRENNER, DA. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis Ekihiro. **Journal Hepatology Pancreatys** v. 22, n. 7, p. 512–518 , 2016.

SERTI, E *et al.* Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function. **Gastroenterology** 149(1):190-200.e2, 2015.

SHI, C & PAMER, EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature reviews Immunology** 11(11):762-774, 2011.

SHOUKRY, NH *et al.* Memory CD8 T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. **J Exp Med.** 197: 1645–1655, 2003.

SKLAN, EH *et al.* Mechanisms of HCV survival in the host. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology** v. 6, n. 4, p. 217–227 , 2009.

SOLDEVILA, B *et al.* A prospective study of T- and B-lymphocyte subpopulations , CD81 expression levels on B cells and regulatory CD4 + CD25 + CD127 low /) FoxP3 + T cells in patients with chronic HCV infection during pegylated interferon-alpha2a plus ribavirin treatment. **Journal of Viral Hepatitis**, p. 384–392 , 2011.

SMITH, DB *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology** v. 59, n. 1, p. 318–327 , 2014.

SOLVALDI. Sovaldi - TM (Sofosbuvir) Gilead Sciences Farmacêutica do Brasil. **Gilead Sciences Farmacêutica do Brasil Ltda.** p. 1–12 , 2015.

SOUZA-CRUZ, S *et al.* Liver and Blood Cytokine Microenvironment in HCV Patients Is Associated to Liver Fibrosis Score: A Proinflammatory Cytokine Ensemble Orchestrated by TNF and Tuned by IL-10. **BMC Microbiology** 16:3, 2016.

SPAAN, M *et al.* Immunology of hepatitis C virus infections. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 26: 391–400, 2012.

SPAAN, M *et al.* Immunological analysis during interferon-free therapy for chronic Hepatitis C virus infection reveals modulation of the natural killer cell compartment. **Journal of Infectious Diseases** 213(2):216–223, 2016.

STEINMANN, E *et al.* Hepatitis C Virus p7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions. **Plos Pathogens** v. 3, n. 7 , 2007.

STEINMANN, E & PIETSCHMANN, T. Hepatitis C Virus P7—A Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy. **Viruses** p. 2078–2095 , 2010.

STEINKE, JW & BORISH, L. Cytokines and chemokines **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 117 (2 SUPPL.) S441-S445, 2006.

STURM, N *et al.* Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis. **J Hepatol**. 53(1):25-35, 2010.

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

SINN, DH *et al.* Disease progression in chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase levels. **World Journal of Gastroenterology** 19(14), 2256–2261, 2013.

SUN, J *et al.* Immune and non-immune responses to hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology** v. 21, n. 38, p. 10739–10748 , 2015.

SUN, J & BRUSIC, V. A systematic analysis of a broadly neutralizing antibody AR3C epitopes on Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein and their cross-reactivity. **BMC Medical Genomics** v. 8, n. Suppl 4, p. S6 , 2015.

SULKOWSKI, MS *et al.* Daclatasvir plus Sofosbuvir for Previously Treated or Untreated Chronic HCV Infection. **N Engl Med** 370:211-221, 2014.

SUZUKI, T *et al.* Molecular biology of hepatitis C virus .**Journal of Gastroenterology**. [S.l: s.n.] , 2007.

TACKE F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. **Journal of Hepatology** vol. 66 j 1300–1312, 2017.

TARRAGÔ, AM *et al.* Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy for current hepatitis C virus genotype 4 achieves SVR: a case report of HCV genotype 4 from the Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop.** 50:861-863, 2017.

TIMM, J & ROGGENDORF, M. Sequence diversity of hepatitis C virus : Implications for immune control and therapy. **World Journal of Gastroenterology** v. 13, n. 36, p. 4808–4817 , 2007.

THOMPSON, JR. Emerging therapeutic options for the management of hepatitis C infection. **World Journal of Gastroenterology** 20(23):7079-7088, 2014.

TORRES, KT *et al.* Hepatitis C Virus in Blood Donors, Brazil. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America** v. 27, n. 4, p. 1238–1240 , 2009.

TREYER, A & MUSCH, A. Hepatocyte Polarity. **Comprehensive Physiology** p. 243–287, 2013.

TSUBOUCHI, E *et al.* Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol** 39 (8):754-62, 2014.

VAIDYA, A & PERRY, CM. Simeprevir: First global approval. **Drugs**. [S.l: s.n.], 2013.

VANDELLI, C *et al.* Lack of Evidence of Sexual Transmission of Hepatitis C among Monogamous Couples : Results of a 10-Year Prospective Follow-Up Study. **American Journal of Gastroenterology**, 2004.

WELZEL, TM *et al.* Daclatasvir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, achieved high sustained virological response rates in patients with HCV infection and advanced liver disease in a real-world cohort. **Gut**. 65(11):1861-1870, 2016.

WERNER, JM *et al.* Ribavirin Improves the IFN- γ Response of Natural Killer Cells to IFN-based Therapy of Hepatitis C Virus Infection. **Hepatology** 60(4):1160-1169, 2014.

WURTHEIMER *et al.* Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. **Hepatology** 40(2): 335-45, 2004.

WHO. Guidelines For The Screening, Care And Treatment Of Persons With Hepatitis Infection. 2014.

WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis c infection. n. April , [S.d.] 2016.

WHO. World Health Organization - Hepatitis C, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>

WOZNIAK, AL *et al.* Intracellular Proton Conductance of the Hepatitis C Virus p7 Protein and Its Contribution to Infectious Virus Production. **Plos Pathogens** v. 6, n. 9 , 2010.

WU, CHENG-KUNG *et al.* Comparison of Therapeutic Response and Clinical Outcome between HCV Patients with Normal and Abnormal Alanine Transaminase Levels. Ed. Tatsuo Kanda. **PLoS ONE** 11.3, 2016.

YONEDA, S *et al.* Association of Serum Cytokine Levels With Treatment Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients.

The Journal of Infectious Diseases 203(8), 1087–1095, 2011.

ZHANG, S *et al.* IFN- γ production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. **Journal of hepatology** 59(3):442-449, 2013.

ZHANG, P *et al.* Determination of the upper cut-off values of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in Chinese. **World Journal of Gastroenterology** 21(8):2419-2424, 2015.

ZEISEL, MB *et al.* Hepatitis C virus entry. **Current Topics in Microbiology and Immunology** v. 369, p. 87–112 , 2013.

ZEUZEM, S *et al.* Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3. **N Engl J Med.** 370:1993–2001, 2014.

ZHOU, W *et al.* Pathogenesis of liver cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology** v. 20, n. 23, p. 7312–7324 , 2014.

ZORZETTO, R. O mapa das hepatites. **Ministério da Saúde - Pesquisa FAPESP** , 2011.

Apêndices

Apêndice 01: Termo de aprovação do comitê de ética em Pesquisa CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.406.965

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos

grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012,

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapeda CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemcam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.406.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	09/09/2015	-	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemocam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.406.965

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:26:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

Apêndice 02: Adeno de aprovação do comitê de ética em Pesquisa CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍTIdeos MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.982.466

Apresentação do Projeto:

Emenda apresentada ao Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍTIdeos MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO.

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda apoiado das Universidade da Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o perfil de resposta imune celular no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.982.466

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C.

Benefícios:

Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda apresentada ao projeto justificada pela necessidade de conhecer o perfil celular dos pacientes afim de entender seu papel no desenvolvimento da fibrose hepática.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_769229_E1.pdf	05/08/2016 10:46:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Andrea_guarda_chuva.pdf	05/08/2016 10:39:15	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_emenda_adendo.pdf	05/08/2016 10:24:31	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.982.466

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 24 de Março de 2017

Assinado por:
Elisa Brosina de Leon
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

Apêndice 03: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos pacientes com hepatite C.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

TÍTULO DO ESTUDO: Identificação e seleção de peptídeos miméticos reativos aos soros de pacientes HCV⁺ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática *In Vitro*.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações para o desenvolvimento de marcadores que sejam capazes de detectar peptídeos relacionados a fibrose e prever cronificação da doença, com percentuais aceitáveis de sensibilidade e especificidade.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 10 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus e a confirmação mais segura do diagnóstico da infecção. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus e outros na Universidade Federal de Uberlândia.

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

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o senhor (a), mas ajudará no diagnóstico do vírus da Hepatite C.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: O senhor (a) terá, sempre que necessário, orientação, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial pela equipe médica da FHEMOAM, no que diz respeito ao HCV, podendo entrar em contato com a doutora Adriana Malheiro (HEMOAM: Tel: 92-655-0100). Também serão feitos pela equipe médica do HEMOAM os encaminhamentos necessários de acordo com o local onde o doador residir.

VOLUNTARIEDADE: A sua participação neste estudo é voluntária, podendo ser retirada a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

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

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos posteriores. Garantimos que toda nova pesquisa a ser

realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

O Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras das características do vírus e de como o corpo convive com a infecção? () Sim ou

() Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

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

(Assinatura do participante)

(Assinatura do pesquisador)

Manaus, ____/ ____/ ____.



(Impressão dactiloscópica)

Questionário e Ficha de Cadastro Individual dos pacientes com hepatite C

PACIENTE			
REGISTRO	SEXO	IDADE	FONE
NATURAL (cidade, estado)	PROCEDENCIA (Cidade, estado)		
PESO	ALTURA		
HDA (MOTIVO DO ENCAMINHAMENTO OU DA PROCURA AO AMBULATÓRIO:			
<input type="checkbox"/> USG COM ESTEATOSE <input type="checkbox"/> HCV POS <input type="checkbox"/> CONSTIPAÇÃO <input type="checkbox"/> DIARREIA <input type="checkbox"/> ICTERICIA <input type="checkbox"/> DOR ABDOM <input type="checkbox"/> HIST FAMILIAR HEPATOPATIA <input type="checkbox"/> ALT DOS EXAMES <input type="checkbox"/> OUTROS:_____			

CARGA VIRAL (Log):			GENÓTIPO:		
NAÏ VE	EXPOSTO	FIB-4	METAVIR (F1,F2,F3,F4)	CHILD:	Avaliação da Fibrose Hepática NI [NIHCED]
COMORBIDADES: <input type="checkbox"/> DMII <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> TIREOIDE <input type="checkbox"/> IRC <input type="checkbox"/> TRANSPLANTADO <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> VHB <input type="checkbox"/> ALCOOL <input type="checkbox"/> SINDROME METABÓLICA <input type="checkbox"/> ASCITE <input type="checkbox"/> ENCEFALOPATIA <input type="checkbox"/> OUTROS_____					<input type="checkbox"/> IDADE >60 (13) <input type="checkbox"/> RNI>1,1 (10) <input type="checkbox"/> PLAQUETAS < 100.000 <input type="checkbox"/> HLC (USG) > 4cm(6) <input type="checkbox"/> ALHD (USG) < 9cm (15) <input type="checkbox"/> EM >13cm (USG) (7)
MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS DO HCV: <input type="checkbox"/> SALIVAR <input type="checkbox"/> VASCULAR <input type="checkbox"/> RENAL <input type="checkbox"/> DERMATO <input type="checkbox"/> OCULAR <input type="checkbox"/> ENDÓCRINA <input type="checkbox"/> HEMATOLÓGICA <input type="checkbox"/> NEUROMUSCULAR <input type="checkbox"/> AUTOIMUNE OUTRO_____					Σ Pontos : >22 ()
FATORES DE RISCO <input type="checkbox"/> HEMOTRANSFUSÃO ANTES 1992 <input type="checkbox"/> HOMOSSEXUALIDADE <input type="checkbox"/> UDI <input type="checkbox"/> TATOO <input type="checkbox"/> PASSADO DE CIRURGIA_____					

DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO:

EXAMES ANTES DO INÍCIO DO TRATAMENTO:

HEMOGLOBINA

LEUCÓCITOS	
PLAQUETAS	
RNI	
F. ALCALINA	
GGT	
AST	
ALT	
ALBUMINA	
BIL TOTAL	
GLICOSE	
COLESTEROL TOTAL	
TRIGLICERIDEOS	
TSH	
ACIDO URICO	
VITAMINA D	
ALFA FETOPROTEINA	
SODIO	
UREIA	
CREATININA	
FERRITINA	

ENDOSCOPIA: () COM VARIZES () SEM VARIZES

IMAGEM HEPÁTICA:

**REGIME DE TRATAMENTO
UTILIZADO**

() PR (IFN+RIBA) () PR + TELAPREVIR

() PR + BOCEPREVIR () OUTRO:

	SIM	NÃO
NAÏVE		
EXPOSTO		
NULL		
RECIDIVANTE		
DESCONTINUOU O TRATAMENTO		

TEMPO DE TRATAMENTO: **DATA DO INICIO DO**
SEMANAS: **TRATAMENTO:**

	Hg	Leucócitos	Plaquetas	Glucose	LOG
S0					
S4 – RVR					
S8					
S12 – NULL/EVR					
S24 – PR					
S36					
S48					
S72 (RVS)					

EVENTO ADVERSO AO TRATAMENTO	SIM	NÃO
Fadiga		
Cefaléia		
Náuseas		
Anemia		
Dermatite/exantema		
Queda de cabelo		
Hemorroidas		
Icterícia		
Evento adverso sério		
Evento adverso grau 3 ou 4		
Tuberculose		

- **Evento adverso sério:** gastroenterite, colite, AVC, insuficiência renal aguda, hipocalemia, exacerbação da psoríase, descompensação hepática
- **Evento adverso grau 3 ou 4:** Níveis baixos de fósforo, níveis elevados de glicose

Apêndice 04: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos candidatos à doação de sangue

Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE.

Título do estudo: Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus.

O objetivo do estudo é conhecer como o organismo vai se defender ao vírus da hepatite B e verificar que tipo de vírus está no organismo.

Neste estudo será coletada amostra de 20ml de sangue. Para serem feitos testes para verificar a presença do vírus e analisar as células que destroem os vírus. Todos os testes serão realizados no HEMOAM em Manaus. Não existem riscos associados à sua participação neste estudo. O único desconforto é a picada da agulha para a coleta de amostra de sangue. A sua participação neste estudo não implica em nenhum benefício direto e imediato para o senhor (a). O estudo, contudo, proporcionará maiores esclarecimentos sobre a prevenção e infecção pelo vírus da hepatite B. Sendo o senhor (a) participante deste estudo terá, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à doença em estudo, podendo entrar em contato com Dr^a Adriana Malheiro e Laura Maia (HEMOAM Tel: 3655-0111). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do HEMOAM. A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor (a) pode retirar sua participação a qualquer momento, o senhor (a) não terá qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da Instituição. Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade. O sangue coletado (20ml) será utilizado para o que se propõe neste estudo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO: Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo. O Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras para o estudo dos tipos de vírus? () sim ou () não.

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

 (Assinatura do participante)

 (Assinatura do pesquisador)

Manaus, ____/____/____. (Impressão dactiloscópica)

Questionário e Ficha de Cadastro Individual dos candidatos a doação de sangue

Título do projeto: Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus.

PARTE I: ENTREVISTA COM O PACIENTE

Dados pessoais/ demográficos:

Nº Ident.: _____ Nº Iden da Bolsa: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: F • M •

Estado civil: Casado • Solteiro • outros _____

Escolaridade: _____

Profissão: _____

Fone: _____

 Endereço: _____ n. _____

Bairro _____

Complemento: _____ Zona _____

Dados complementares do caso antes da doação de sangue:

Tem vacinação contra Hepatite B: Sim • Não •

Paciente tem história anterior: alcoolismo • icterícia •

O paciente foi submetido ou exposto a:

- transfusão de sangue/derivados

Quando: _____

- drogas injetáveis • transplante

133

- 3 ou mais parceiros sexuais • medicamentos injetáveis

- tratamento cirúrgico • parto normal

- acupuntura • tatuagem

- piercing • tratamento dentário

Contato com paciente de Hepatite B ou C, ou com portador dos VHB ou VHC:

- sexual • domiciliar (não sexual) • ocupacional



Case Report

Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy for current hepatitis C virus genotype 4 achieves SVR: a case report of HCV genotype 4 from the Amazon

Andréa Monteiro Tarragô^{[1],[2]}, Grenda Leite Pereira^{[1],[2]}, Flamir da Silva Victória^{[3],[4]},
Adriana Malheiro Alle Marie^{[1],[2]} and Marilú Barbieri Victória^{[3],[4]}

[1]. Laboratório de Genômica, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. [3]. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brasil. [4]. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

Abstract

Hepatitis C is a worldwide endemic disease. However, hepatitis C virus genotype 4 (HCV GT-4) has rarely been reported in Brazil. HCV GT-4 demonstrates high sustained virological response (SVR). Here, we report the case of a 62-year-old HCV GT-4 positive woman complaining of a headache, nausea, and arthralgia. The patient was treated according to the protocol for genotype 4 (12 weeks administration of 400mg sofosbuvir and 60mg daclatasvir daily) and achieved SVR. Although this is not an Amazonas autochthonous case, the presence of genotype 4 is rarely reported in the region.

Keywords: Hepatitis C. Genotype 4. Sustained viral response.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), hepatitis C virus (HCV) affects millions of people worldwide; it is estimated that approximately 71 million people are chronically infected with HCV, causing a serious global public health problem¹.

There are seven HCV genotypes including 67 subtypes, which are geographically distributed throughout the world². In Brazil, the genotype distribution pattern consists of genotype 1, followed by genotypes 3, 2, 4, and 5³⁻⁴.

The treatment recommended by the Brazilian Ministry of Health for chronic HCV infection involves oral combinations of direct-acting antivirals (DAAs); sofosbuvir in association with simeprevir or daclatasvir. These drug combinations are well tolerated and have been reported to increase sustained virological response (SVR) rates to approximately 90%^{5,7}.

CASE REPORT

A 62-year-old woman was admitted to the *Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD) in November 2015. Upon admission, the patient complained of a headache, nausea, and an extrahepatic manifestation of

neurological motor impairment. The patient had received blood transfusion eight years prior in Alenquer, during an upper digestive endoscopy procedure. Follow-up tests prior to treatment are detailed in Table 1. The patient was treated according to the protocol for genotype 4 (12 weeks administration of 400mg sofosbuvir and 60mg daclatasvir daily); SVR was achieved and hepatic markers values returned to normal six months after the end of treatment (Table 1).

DISCUSSION

Hepatitis C virus genotype 4 (HCV GT-4) represents approximately 1518 million cases of the total global HCV infections. It is prevalent in lower income countries in Northern and Equatorial Africa, the Middle East, and Caribbean and Indian regions^{8,9}.

The frequency of the geographical distribution of the genotypes in the Amazon region is similar to the pattern in Brazil and other world regions; a higher prevalence of genotypes 1 (64.9%) and 3 (30.2%) and a lower prevalence of genotypes 2 (4.6%), 4 (0.2%), and 5 (0.1%)³. However, genotype 4 is rarely reported in the State of Amazonas¹⁰.

The current global distribution of HCV genotypes has undoubtedly been influenced by historical events and modified by contemporary human migration trends. Although genotype 1 has been established as the most prevalent genotype worldwide, including in the Amazon region, we must be aware of the introduction of other genotypes into the region.

Corresponding author: Dra. Marilú Barbieri Victória
e-mail: v.marilu@terra.com.br
Received 4 April 2017
Accepted 9 August 2017

TABLE 1: Patient laboratory test results.

Laboratory tests	Admission	Post-treatment*	Reference values
Hemoglobin	12.9g/dL	13.73g/dL	12g/dL–18g/dL
Hematocrit	39.8%	41.1%	37%–52%
Platelets	196,000/mm ³	239,000/mm ³	130,000/mm ³ –400,000/mm ³
Leukocytes	6,190/mm ³	6,340/mm ³	5.2/mm ³ –12.4/mm ³
Albumin	5.1g/dL	5.0g/dL	3.5–5.0g/dL
INR	1.13	1.12	1.0
TGO/AST	81IU/L	20IU/L	2IU/L–38IU/L
TGP/ALT	116IU/L	20IU/L	2IU/L–44IU/L
HCV-RNA	541,978 (Log= 5.73)	Undetectable	12IU/mL (Log=1.08) – 100,10 ⁸ IU/mL (Log=8)
FIB-4**	2.38	1.20	FIB 4 > 3.25 (≥ F2)
Child pugh score	A5	A5	A-C

INR: international normalized ratio; TGO/AST: transaminase glutamic-oxaloacetic/aspartate aminotransferase; TGP/ALT: transaminase glutamic-pyruvic/alanine aminotransferase; HCV-RNA: hepatitis C virus- ribonucleic acid; IU/mL: international units/milliliter; FIB-4: index for liver fibrosis; APRI: AST40-platelet ratio index; METAVIR: score that quantify the degree of inflammation and fibrosis using the results of a liver biopsy. *Post-Treatment tests were performed six months after the end of treatment. **The treatment is indicated for HCV mono infected patients with APRI > 1.5 or FIB-4 > 3.25, characterizing METAVIR ≥ F2. HCV.

In this case, the patient is a native of Tracuateua, a small City in Pará, in the Amazon region; however, she lives in Alenquer, another city in Pará closer to Manaus. Thus, this is not an autochthonous case as the patient temporarily moved to Manaus for HCV treatment. Migratory flow may contribute to the dissemination of genotype 4 originating from other states in the region into Amazonas via virus carriers prior to SVR.

The origin of the region of Tracuateua is linked to the construction of the Belém-Bragança railroad (completed in 1908), during which many African descent, Portuguese, and Spanish immigrants began to colonize the vicinity. Although this migratory phenomenon is not recent, it has been increasing; thus, new and unusual genotypes may be more prevalent than thought¹¹.

Because of the low prevalence of HCV GT-4 in Brazil, this genotype has not been studied extensively in prospective trials evaluating treatment outcomes. The lack of genotype 4 in our samples indicates that it is absent or rarely present in our population. Because many people in Bahia are of African descent and Brazil is a country with continental proportions, it is possible that uncommon Brazilian HCV strains in other regions of Brazil may be the result of multiple introductions of genotype 4¹².

Therefore, we believe that HCV patient numbers are inexact in some municipalities of the state of Amazonas, a poor region of the country affected by this endemic disease, where the only public access to advanced technology for diagnosis and treatment is at the FMT-HVD and Araújo Lima Ambulatory, the Federal University of Amazonas. In addition, the natural history of hepatitis C and the limited education of the population in some of these municipalities hinder patient notification and treatment.

This case report may contribute to demonstrate that there is HCV GT-4 in the North of Brazil and these individuals carrying this genotype have developed response to the DAAs.

Acknowledgments

We are greatly thankful to the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* and *Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas* for providing technical support for the development and implementation of this study.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial support

Fundação de Amparo à Pesquisa, Programa de Apoio a Núcleos emergentes de Pesquisa (PRONEN 009/2011).

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Hepatitis C. April 2017 - Updated October 2017. Available from: who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/ Access in Jun 7th, 2017.
2. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
3. Campioto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):41-9.

4. Lampe E, Espírito-Santo MP, Martins RM, Bello, G. Epidemic history of Hepatitis C virus in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):886-95.
5. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, do HIV/Aids e da Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Brasília: MS; 2017. 143p.
6. Jiménez-Pérez M, González-Grande R, España Contreras P, Pinazo Martínez I, de la Cruz Lombardo J, Olmedo Martín R. Treatment of chronic hepatitis C with direct-acting antivirals: The role of resistance. *World J Gastroenterol.* 2016;22(29):6573-81.
7. Welzel TM, Petersen J, Herzer K, Ferenci P, Gschwantler M, Wedemeyer H, et al. Daclatasvir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, achieved high sustained virological response rates in patients with HCV infection and advanced liver disease in a real-world cohort. *Gut.* 2016;65(11):1861-70.
8. Abdel-ghaffar TY, Sira MM, El Naghi S. Hepatitis C genotype 4: the past, present, and future. *World J Hepatol.* 2015;7(28): 2792-2810.
9. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015;61(1):77-87.
10. Fonseca JCF, Brasil LM. Infecção pelo vírus da hepatite C na região Amazônica brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37 (Suppl 2):1-8.
11. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Prefeitura Municipal de Tracuateua. Tracuateua, PA: EMBRAPA; 2017. Access in Jun 7th, 2017 Disponível em: <http://www.tracuateua.pa.gov.br/tracuateua/historia>
12. Lampe E, Lewis-Kimenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):435-44.

Anexo 02: Artigo retratamento

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

**The immunological background in successful retreatment of
hepatitis C genotype 1 infection with direct-
acting antivirals**

Journal:	<i>Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Case Reports
Keyword:	direct-acting antivirals, Hepatitis C, sustained virological response, retreatment

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

<https://m.c04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Case report: The immunological background in successful retreatment of hepatitis C genotype 1 infection with direct-acting antivirals

ABSTRACT

The available therapeutic strategies for inhibition of virus replication process are based essentially on the combination of direct-acting antivirals (DAAs) that act directly on virus proteins. This therapy has a reduced treatment time and fewer adverse effects with a high rate of sustained virological response (SVR). We report the case of a 59-year-old patient with HCV genotype 1. The patient had a fibrosis grade >F2 and treated for 12 weeks with the combination of Sofosbuvir + Simeprevir and subsequently for 24 weeks with Sofosbuvir + Daclatasvir resulting in SVR. The evaluation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and cytokine profile of the patient showed a proinflammatory immune response during retreatment compared to the profile on admission. This proinflammatory immune response seems to be a predictor of SVR. This case report highlights the importance of evaluating the immune profile of the patient that may help clinicians in taking decision on treatment strategy for the retreatment scheme with DAAs.

Keyword: Hepatitis C, direct-acting antivirals, sustained virological response, retreatment.

INTRODUCTION

Hepatitis C is an inflammatory liver disease caused by hepatitis C virus. Clinical manifestation may be acute or chronic, varying in severity. Approximately 71 million people are chronically infected with HCV worldwide and is a serious public health problem¹.

Currently, seven genotypes and more than 67 subtypes of HCV have been described worldwide². In Brazil, genotype 1 is prevalent followed by genotypes 3, 2, 4 and 5³. In the Amazon Region, genotype 1 is mainly observed, followed by genotype 3, 2 and 4⁴⁻⁵.

Treatment for chronic hepatitis C (CHC) was previously based on the combination of Pegylated Interferon and Ribavirin to achieve low rates of SVR. Currently, the approved treatment for CHC is the use of potent direct-acting antivirals (DAAs) that targets viral proteins such as NS3-4A, NS5A and NS5B to inhibit virus replication⁶.

In Brazil, the Ministry of Health recommends for chronic HCV treatment from 2015 to use the combination of second generation DAAs; Sofosbuvir (SOF) with Simeprevir (SMV) or Daclatasvir (DCV), for 12 or 24 weeks according to the genotype. This year, 2018, new antivirals therapeutic options (Ebasvir, Grazoprevir, Ledipasvir and the (3D) Ombitasvir,

1
2
3 Dasabuvir, Veruprevir and Ritonavir) have been approved for CHC and are easily
4 accessible⁷.
5
6

7 We report the case of a chronic hepatitis C carrier, genotype 1, treated for 12- weeks
8 with Sofosbuvir in combination with Simeprevir. SVR was not achieved. She underwent
9 another treatment with Sofosbuvir and Daclatasvir for 24-weeks and achieved SVR.
10
11

12 13 CASE REPORT 14

15 A single 59-year-old female patient from Porto Velho-RO, sought treatment for
16 hepatitis C in 2015 at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-
17 HVD) in Manaus, the capital of the Amazonas State. She complained of dizziness and
18 headache. She had blood transfusion prior to 1993, before the standardization of blood
19 screening⁸. She reported she is diabetic and on treatment with Metformin 850mg /
20 glibenclamide 5mg. She had been treated for syphilis before and never for hepatitis C. She
21 is an ex-smoker and ex-alcoholic. On examination by ultrasonography, chronic liver
22 disease, cholelithiasis and splenomegaly were observed.
23
24
25
26
27
28
29

30 Treatment with DAAs was initiated according to the Brazilian Ministry of Health
31 guidelines for genotype 1. Her HCV RNA viral load was 1929003 UI/mL (log 6,28).
32 Sofosbuvir in combination with Simeprevir was prescribed for 12 weeks. The viral load
33 diminished to 86330 UI/mL (log 4,94) but did not reach the SVR. Treatment regime was
34 changed to SOF + DCV for 24 weeks as she had advanced fibrosis. Her viral load was
35 indetectable after 12 weeks of the treatment.
36
37
38
39
40

41 In the present case, two peripheral blood samples (before and after the second
42 treatment) were collected for immunological studies. The immunological parameters of the
43 cells and cytokines were compared with the mean peripheral blood reference values (VR) of
44 blood donors to the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
45 (HEMOAM). Pre-and post-treatment follow-up tests are shown in **Table 1**.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Results of the patient's laboratory test

Laboratory Tests	Admission	* Post treatment	Reference values (VR)
Hemoglobin	11.0 g/dL	10.4 g/dL	12 g/dL-18 g/dL
Hematócrit	33.9%	31.5%	37% -52%
Platelets	85.000/mm ³	100.000/mm ³	130-400.000/mm ³
WBC	2.620/mm ³	2.910/mm ³	5,2/mm ³ - 12,4/mm ³
INR	1,09	1,09	1,0
TGP/ALT	100 UI/L	33 UI/L	2UI/L-44UI/L
TGO/AST	88 UI/L	39 UI/L	2UI/L-38UI/L
HCV-RNA	1929003 UI/mL (log 6,28)	Indetectable	12 UI/mL(Log = 1,08) - 100 x 10 ⁶ UI/mL(log = 8)
CD4*	37,500% ↓	46,700% ↑	41,07 %*
CD8*	33,600 % ↑	23,900% ↓	24,70%*
Ratio CD4*/ CD8*	1.11% ↓	1.95% ↑	1.66%**
IL-2	293,2 MFI ↓	291,7 MFI ↓	332,6 MFI**
IL-4	237,4 MFI ↓	198,8 MFI ↓	240,0 MFI**
IL-6	662,1 MFI ↑	426,1 MFI ↑	238,5 MFI**
IL-10	278,9 MFI ↑	227,4 MFI ↑	200,0 MFI**
IL-17A	94,38 MFI ↓	225,9 MFI ↑	200,1 MFI**
TNF- α	88,66 MFI ↓	145,9 MFI ↓	176,2 MFI**
IFN- γ	125,8 MFI ↓	318,9 MFI ↑	250,5 MFI**
FIB-4**	3,85 ↑	4,0 ↑	FIB4> 3,25 (≥ F2)
CHILD-PUGH	A	A	AC

WBC: white blood cells; **INR:** International normalized ratio; **TGO / AST:** glutamic-oxalacetic transaminase / aspartate aminotransferase; **TGP / ALT:** glutamic-pyruvic transaminase / alanine aminotransferase; **HCV-RNA:** Hepatitis C virus ribonucleic virus; **UI / mL:** Index for liver fibrosis; **APRI:** ratio of AST to platelets; **METAVIR:** a score that quantifies the degree of inflammation and fibrosis using the results of a liver biopsy. * Post-treatment tests were performed 12-weeks after the end of treatment. ** Treatment is indicated for HCV mono-infected patients with FIB-4> 3.25, characterizing METAVIR ≥ F2. *, ** The reference values for CD4*/CD8* cells and serum cytokine concentrations of peripheral blood are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) of 50 candidates for blood donation from the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). The arrows ↑ and ↓ represent increase or decrease compared to the reference values, respectively.

DISCUSSION

In general, treatment with Sofosbuvir combined with Simeprevir or Daclatasvir has been shown to be very effective, achieving relevant rates of sustained virological response of 90-95% of individuals infected with HCV⁹. DAAs therapy allows elimination of the virus, resulting improvements in liver histology, prevention of mortality related to liver disease, and improvement in patients' quality of life.

This case demonstrates that in cases of failure of virological response, successful retreatment can be obtained with other DAAs regimens, even when the retreatment regimen contains the same class of medication. In this case report, the retreatment with another protease inhibitor (DCV in replacement to SMV) without

1
2
3 knowing if the patient had resistance-associated variants (RAVs) demonstrated that
4 there is no need to verify that if during the first unsuccessful treatment arises
5 resistant variants to substitute new DAAs.
6
7

8
9 The case report described by Safari et al., 2016 demonstrated that HCV
10 genotype 1b-infected patient with virologic failure following treatment with Daclatasvir
11 and Asunaprevir achieved SRV with prolonged duration of retreatment for 24 weeks
12 with Sofosbuvir plus Simeprevir¹⁰.
13
14
15

16
17 Our patient presented liver enzymes normalized even though
18 thrombocytopenia, leucopenia, and anemia persisted after the second treatment with
19 SOF + DCV. In addition, an improvement in her general condition was observed. Her
20 viral load was undetectable after 12 weeks of the end of treatment.
21
22
23

24
25 In general, distinct peripheral cell frequency profiles are observed between
26 HCV* patients when compared with healthy individuals¹¹. Data analysis of the mean
27 percentage of CD4⁺T lymphocytes showed a decrease in admission and an increase
28 in post-treatment when compared to the reference values. On the other hand, the
29 mean percentage of CD8⁺ T lymphocytes showed an increase on admission and a
30 decrease in post-treatment when compared to the respective reference values. CD4⁺
31 and CD8⁺ T cells play an important role in producing IFN- γ , promoting the further
32 development of CD4⁺T cells and eliminating infected cells, respectively, in addition to
33 assisting in the healing of the disease. These results indicate a higher frequency of
34 CD8⁺ T cells on admission, whereas in the post-treatment the occurrence of CD4⁺ T
35 cells is higher, which may have favored SVR in the post-treatment.
36
37
38
39
40
41
42
43

44
45 The production of inflammatory cytokines coordinates the recruitment of
46 leukocytes to the liver to eliminate the virus¹². On admission, the patient showed a
47 decrease of IL-2, IL-4, IL-17A, TNF- α and IFN- γ cytokines levels and an increase of
48 IL-6 and IL-10 when compared to reference values consider for serum cytokine. In
49 contrast, the post-treatment cytokine profile revealed an increase of the cytokines IL-
50 17A and IFN- γ serum levels.
51
52
53
54

55
56 Altogether, the results demonstrated a ratio CD4⁺/CD8⁺ T cell slightly
57 decreased along with lower levels of IL- 2, IL-4, IL-17A, TNF- α and IFN- γ and with
58 high levels of IL-6 and IL-10 after retreatment. This suggests that the ability to
59
60

1
2
3 develop a proinflammatory immune response profile throughout treatment appears to
4 be a predictor of SVR.
5
6

7
8 Although, there are few cases of non-response to DAAs, we suggest that the
9 immunological study of each individual would be relevant, especially in a country like
10 Brazil where few drugs are available for the retreatment regimen. The personalized
11 evaluation of the immunological conditions implies in the reduction of costs for the
12 Brazilian government if the clinicians know that the nonresponse can be associated
13 to immunological failure.
14
15
16

17
18 In summary, this case study demonstrates that patients infected with HCV
19 genotype 1 who have virologic failure with Sofosbuvir plus Simeprevir have potential
20 retreatment options, including regimens containing a component with a shared action
21 mechanism as the initial treatment in countries where the resistance-associated
22 variants (RAVs) testing are not available, and the evaluation of the immunological
23 response before and after treatment may be used as an ally in the clinical evaluation
24 and patient adherence to the retreatment favoring the elimination of the virus.
25
26
27
28
29
30

31 **ACKNOWLEDGMENTS**

32
33 We are greatly thankful to the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira
34 Dourado and Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas for
35 providing technical support for the development and implementation of this study.
36
37
38
39

40 **CONFLICT OF INTEREST**

41
42 The authors declare that there is no conflict of interest.
43
44

45 **FINANCIAL SUPPORT**

46
47 Fundação de Amparo à Pesquisa, Programa de Apoio a Núcleos emergentes
48 de Pesquisa (PRONEN 009/2011).
49
50

51 **References**

- 52
53
54 1. World Health Organization (WHO). Hepatitis C - fact sheet. Updated April 2018.
55 Accessed April 16, 2018: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014; 59:318-27.
3. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005; 38: 41-49.
4. Araújo AR, Almeida CM, Fraport L, et al. Caracterização do vírus da Hepatite C em pacientes com Hepatite Crônica: genótipos no Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011; 44: 638-640.
5. Tarragô AM, Pereira GL, Victória FS, et al. Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy for current hepatitis C virus genotype 4 achieves SVR: a case report of HCV genotype 4 from the Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50:861-863.
6. Wohlfarth, C, Efferth T. Natural products as promising drug candidates for the treatment of hepatitis B and C. *Acta pharmacologica Sinica*. 2009; 30:25-30.
7. Conitec. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância e Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, HIV / Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Brasília: MS; 2018.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Publicada no Diário Oficial da União em 02/12/1993. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br>
9. Lawitz E, Sulkowski MS, Ghalib R, et al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study. *The Lancet*. 2014; 9956:1756-1765.
10. Safari R, Noviello S, Boparai N, et al. Case report: successful retreatment of hepatitis C genotype 1b infection with sofosbuvir + simeprevir in a patient with cirrhosis who had prior virologic relapse after treatment with daclatasvir and asunaprevir. *Clinical Case Reports*. 2016; 4:653-656.
11. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:4831-4838.
12. Friedman SL. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004; 1:98-105.

Table 1: Results of the patient's laboratory test

Laboratory Tests	Admission	* Post treatment	Reference values (VR)
Hemoglobin	11.0 g/dL	10.4 g/dL	12 g/dL-18 g/dL
Hematócrit	33.9%	31.5%	37% -52%
Platelets	85.000/mm ³	100.000/mm ³	130-400.000/mm ³
WBC	2.620/mm ³	2.910/mm ³	5,2/mm ³ - 12,4/mm ³
INR	1,09	1,09	1,0
TGP/ALT	100 UI/L	33 UI/L	2UI/L-44UI/L
TGO/AST	88 UI/L	39 UI/L	2UI/L-38UI/L
	1929003 UI/mL		12 UI/mL (Log = 1,08) -
HCV-RNA	(log 6,28)	Indetectable	100 x 10 ⁶ UI/mL (log = 8)
CD4*	37,500%↓	46,700%↑	41,07 % [#]
CD8*	33,600 %↑	23,900%↓	24,70% [#]
Ratio CD4*/ CD8*	1.11%↓	1.95%↑	1.66% ^{**}
IL-2	293,2 MFI↓	291,7 MFI ↓	332,6 MFI ^{**}
IL-4	237,4 MFI ↓	198,8 MFI ↓	240,0 MFI ^{**}
IL-6	662,1 MFI ↑	426,1 MFI ↑	238,5 MFI ^{**}
IL-10	278,9 MFI ↑	227,4 MFI ↑	200,0 MFI ^{**}
IL-17A	94,38 MFI ↓	225,9 MFI ↑	200,1 MFI ^{**}
TNF-α	88,66 MFI ↓	145,9 MFI ↓	176,2 MFI ^{**}
IFN-γ	125,8 MFI ↓	318,9 MFI ↑	250,5 MFI ^{**}
FIB-4**	3,85↑	4,0↑	FIB4> 3,25 (≥ F2)
CHILD-PUGH	A	A	AC

WBC: white blood cells; **INR:** International normalized ratio; **TGO / AST:** glutamic-oxalacetic transaminase / aspartate aminotransferase; **TGP / ALT:** glutamic-pyruvic transaminase / alanine aminotransferase; **HCV-RNA:** Hepatitis C virus ribonucleic virus; **UI / mL;** **FIB-4:** Index for liver fibrosis; **APRI:** ratio of AST to platelets; **METAVIR:** a score that quantifies the degree of inflammation and fibrosis using the results of a liver biopsy. * Post-treatment tests were performed 12-weeks after the end of treatment. ** Treatment is indicated for HCV mono-infected patients with FIB-4> 3.25, characterizing METAVIR ≥ F2. [#] ^{**} The reference values for CD4*/CD8* cells and serum cytokine concentrations of peripheral blood are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) of 50 candidates for blood donation from the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). The arrows ↑ and ↓ represent increase or decrease compared to the reference values, respectively.