

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIENCIAS DA SAUDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**PRODUÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS EM PACIENTES
PORTADORES DE HEPATITE VIRAL C CRÔNICA**

**PATRICIA ESTEVAM MARGARIDA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SALVADOR – BA
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



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

**PRODUÇÃO DE AUTO-ANTICORPOS EM PACIENTES
PORTADORES DE HEPATITE VIRAL C CRÔNICA**

PATRICIA ESTEVAM MARGARIDA

**Orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza B. S. Atta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

SALVADOR – BA

2005

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do ICS / UFBA – Salvador – Bahia

M327 Margarida, Patrícia Estevam
Produção de auto-anticorpos em pacientes portadores de
Hepatite viral C crônicas / Patrícia Estevam Margarida. –
Salvador, 2005.
xiv, 43 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Imunologia, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza de Souza Atta.

1. Hepatite C crônica - Brasil. 2. Crioglobulinas. 3. Auto-
Imunidade. I. Atta, Ajax Mercês. II. Atta, Maria Luiza de Souza
III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 57.083.3:616.36

Auxilio Financeiro:

CNPq

FAPESB/ MS

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ (Protocolo nº 162)

**“Não se trata de descobrir e percorrer sozinho uma
única vez uma pista. Mas de traçar e de concluir,
para uso de muitos uma larga pista”.**

Lebret

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, infinitamente, por tornar possível a concretização deste ideal, dando-me além da vida, amor e força para chegar até aqui, guiando-me por caminhos diversos, mas nunca sem o Teu amor.

À minha mãe Elbi pelo seu incentivo e amor incondicional. Com teu exemplo aprendi a enfrentar os desafios sem jamais perder a esperança. Dedico a ti eternamente esta vitória.

À minha família, em especial aos meus irmãos João Bosco, Regina, Junior e Miguelito, pela paciência, carinho, compreensão e incentivo em todos os momentos. Obrigada por existirem.

Ao meu querido Daniel por saber compreender os momentos em que estive ausente e pelo constante apoio nas horas difíceis; o seu amor e carinho foram as armas desta vitória.

Ao Paulo e Raquel pela amizade e carinho.

Ao amigo Gessilson pelas palavras amigas e de incentivo durante os momentos de dificuldade.

Ao Dr. Valdir Lisboa pela amizade, apoio e compreensão.

Aos professores, colegas e amigos do curso de Pós-Graduação em Imunologia que de uma forma ou de outra me auxiliaram a trilhar este caminho.

Aos colegas do LAPIM – Laboratório de Pesquisa em Imunologia da Faculdade de Farmácia, pelo convívio amistoso e a cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

A Dilcea Reis de Oliveira, secretária do PPGIm pelo apoio, disponibilidade e atenção em todos os momentos.

Ao Dr. Raymundo Paraná pela colaboração ao realizar a análise clínica dos pacientes envolvidos no estudo.

As equipes do Ambulatório de Hepatites do HUPES e da Fundação Bahiana de Desenvolvimento das Ciências pela companhia e pela disponibilidade na obtenção de dados essenciais ao trabalho.

Em especial aos pacientes os quais, voluntariamente, doaram seu sangue possibilitando a realização deste estudo, e proporcionaram a oportunidade de abrir caminhos e esperança para os que necessitam de novos dias.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESB /MS e CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para esta conquista.

Sinceramente Obrigada!

Deus os abençoe sempre!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Dr. Ajax Mercês Atta e a Prof^a. Dr^a. Maria Luiza B. S. Atta pela orientação segura, apoio e confiança depositada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hepatite C - História	1
1.2. Aspectos Clínicos e Epidemiologia	2
1.3. Resposta Imune ao vírus	4
1.3.1. Resposta Imune Inata	5
1.3.2. Resposta Imune Adaptativa	6
1.4. Autoimunidade e Manifestações Extra-hepáticas	7
2. RELEVÂNCIA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivos Gerais	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. Pacientes	14
4.2. Obtenção do Soro	14
4.3. Análises Bioquímicas	15
4.3.1. Dosagem de Proteínas Totais e Albumina	15
4.3.2. Dosagem de Creatinina e Alanina-aminotransferase (ALT)	15
4.4. Pesquisa e Identificação de Crioglobulinas	16
4.4.1. Método do criócrito	16
4.4.2. Método da Imunodifusão em Gel de Agarose 1%	16
4.5. Pesquisa de Auto-anticorpos	17
4.5.1. ELISA	17
4.5.2. Imunofluorescência Indireta	17
4.5.3. Aglutinação Indireta	18
4.5.4. Imunoturbidimetria	18
4.6. Análise estatística	19
5. RESULTADOS	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA	Anticorpos anticardiolipina
ALT	Alanino Aminotransferase
ANA	Anticorpos antinúcleo
ANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
a-Tg	Anticorpos anti-tireoglobulina
CCP	Peptídeo Citrulinado cíclico
CD81 (TAPA 1)	Receptor envolvido nas atividades de adesão, motilidade, ativação celular e tradução de sinais
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
E1,E2	Glicoproteínas do envelope viral
ENA	Antígenos nucleares extraíveis
FR	Fator reumatóide
HAI	Hepatite auto-imune
HTLV	Vírus linfotrópico humano
HVC	Hepatite viral C crônica
IFI	Imunofluorescência Direta
Ig	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INF-γ	Interferon gama
INF-I	Interferon tipo I

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LKM-1	Anti-citocromo oxidase P450 IID6
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido Ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteínas
SLE	Lúpus Eritematoso Sistêmico
Sm	Antígeno Smith
SMA	Anti-músculo liso
SR-BI	Receptores de lipoproteínas
SS	Síndrome de Sjögren
TCR	Receptor de célula T
TGF-β	Fator β de transformação e crescimento
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TPO	Tireoperoxidase
VHC	Vírus da hepatite C

RESUMO

Introdução: Hepatite viral C (HVC) é um importante problema de Saúde Pública em diferentes países, incluindo o Brasil. A história natural da HVC apresenta uma alta cronicidade, e importante freqüência de cirrose e carcinoma hepatocelular. Outro importante aspecto desta infecção viral corresponde à resposta auto-imune, demonstrada pela produção de auto-anticorpos e alta freqüência de crioglobulinemia mista, a qual, contudo não tem sido estudada em pacientes brasileiros.

Objetivo: A proposta do presente trabalho foi investigar a freqüência de auto-anticorpos em indivíduos brasileiros portadores de HVC crônica.

Desenho experimental: Foram incluídos 60 pacientes, com diagnóstico clínico e laboratorial (sorologia de 3ª. Geração e diagnóstico molecular) de HVC crônica, 36 homens e 24 mulheres, com idade mediana de 47 anos. Como controles foram incluídos 40 doadores sadios de banco de sangue, de ambos os sexos. Além da avaliação bioquímica de rotina (ALT, creatinina, proteínas totais e frações), foi realizada a pesquisa de crioglobulinas por crioprecipitação em tubo e gel-difusão, e de auto-anticorpos. Desta forma, através de conjuntos INOVA Quanta Lite™ IgG ELISA (INOVA Diagnostic, Inc., USA) foram investigados ANA, anti-ENA (SSA, SSB, Sm e RNP), anti-DNA fita dupla (a-dsDNA), ACA IgA, IgG e IgM, anti-LKM-1 e a-CCP. Com conjuntos diagnósticos de imunofluorescência indireta NOVA Lite™, desta mesma fonte, foram pesquisados SMA, ANCA-c e ANCA-p. A triagem sorológica para FR foi realizada através de conjuntos diagnósticos de aglutinação indireta de suspensão de partículas de látex sensibilizadas com IgG humana (Doles, Brasil), confirmada de forma

quantitativa através de imunoturbidimetria (BioSystems S.A, Espanha). Anticorpos a-TPO e a-Tg foram investigados também por aglutinação indireta com micro-partículas de gelatina, com conjuntos diagnósticos SERODIA (Fujirebio, Inc., Japão).

Resultados: Trinta e nove pacientes (65%) tinham crioglobulinemia. ANA foi detectado em 30% dos pacientes (15 homens e 6 mulheres) e em 15% dos controles. Somente ENA SSA foi reconhecido pelos pacientes soropositivos para ANA (10%), os quais foram soronegativos para a-dsDNA. Todos os controles sadios foram negativos para estes antígenos nucleares. ACA-IgG e IgM (> 20UPL/mL) foram encontrados em 3 e 35% dos pacientes com HVC respectivamente, sem contudo ser observado ACA-IgA. FR-IgM (cutoff = 20 UI/mL) foi observado em 45% dos pacientes e 13.3% dos controles, enquanto a-CCP foi encontrado em apenas 2 soros de HVC. SMA (título \geq 40) foi observado em 30% dos pacientes, apenas um apresentou a-LKM. A soropositividade para a-TPO e a-Tg correspondeu a 7% no grupo de HVC.

Conclusões: Os resultados mostram que crioglobulinemia e produção de auto-anticorpos são importante aspectos imunológicos da resposta imune de pacientes brasileiros portadores de HVC. Contudo, tais achados não estão associados com sinais clínicos de doenças auto-imunes.

Palavras-chaves: hepatite C crônica, crioglobulina, auto-imunidade, Brasil

Abstract

Introduction: Viral hepatitis C (HVC) is a serious public health problem in Brazil. An important aspect of the VHC immunology is the production of autoantibodies and cryoglobulins. However such immune aspect of VHC has not been studied in Brazilian patients.

Purpose: To investigate the frequency of the autoantibodies of Brazilian hepatitis C virus carriers.

Experimental design: The target group was represented by 60 VHC patients (median age = 47 years; 36 male and 24 female), while 40 healthy blood donors (HI) were included as controls. The following autoantibodies (Ab) were investigated by ELISA (INNOVA Diagnostics, Inc., USA): antinuclear IgG (ANA), anti-extractable nuclear antigens SSA, SSB, Sm and RNP, anti-dsDNA, anticardiolipin antibodies (ACA) of the IgA, IgG and IgM isotypes, anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP2) and anti-LKM1. Anti-smooth muscle antibody (SMA) was evaluated by an indirect fluorescent antibody test from this same source. Antibodies to thyroid peroxidase (TPO-Ab) and anti-thyroglobulin (Tg-Ab) were investigated by indirect agglutination (Fujirebio, Inc., Japan), while IgM rheumatoid factor (RF-IgM) was tested by turbidimetry (BioSystems S.A, Spain). Cryoglobulins were investigated by tube and gel cryoprecipitation.

Results: Thirty-nine out of 60 (65%) patients had cryoglobulinemia. ANA was detected in 30% VHC patients (15 male and 6 female) and 15% HI controls. Only ENA-SSA was recognized by these ANA positive VHC patients (10%) that were seronegative for anti-dsDNA Ab. All HI controls were seronegative for these nuclear antigens. IgG and IgM

ACA (> 20 PL U/ml) was found in 3% and 35% VHC patients respectively, but VHC group was negative for IgA-ACA. IgM-RF (cutoff = 31 IU/ml) was observed in 45% VHC patients and 13.3% HI controls, while only one of these VHC patients had CCP-Ab. SMA (titer \geq 40) was observed in 30% VHC patients, only one (1.7%) had anti-LKM1 autoantibodies, and 7% of them had anti-TPO and/or anti-thyroglobulin (titer > 100). Clinical signs of autoimmunity were rarely found in VHC patients.

Conclusions: The findings show that cryoglobulinemia and autoantibody production are important immunological aspects of the immune response of VHC in Brazilian patients. However, such findings are not associated with clinical signs of autoimmune diseases.

Key words: hepatitis C, cryoglobulins, autoimmunity, Brazil

1. Introdução

A hepatite C é uma doença causada pelo vírus C (VHC) pertencente ao gênero *Hepacivirus*, um membro da família *Flaviviridae*. O VHC é um vírus pequeno, de 55 – 65 nm, envelopado, contendo um genoma de RNA de fita simples, de polaridade positiva, constituído de aproximadamente 10000 nucleotídeos, e com capacidade de codificar uma proteína de ~ 3000 aminoácidos ^{38,26}. A proteína precursora do VHC, junto com as proteases virais, é processada pela célula do hospedeiro em dez proteínas, estruturais e não estruturais (NS).

Os componentes estruturais do vírus são a proteína do core e as glicoproteínas do envelope, E1 e E2, que são clivadas pelas peptidases das células do hospedeiro. As proteínas NS, designadas NS2, NS3, NS4 e NS5, estão separadas das estruturais por um peptídeo curto denominado P7. NS4 e NS5 são processadas em duas subunidades A e B. As proteínas NS2 a NS5B estão envolvidas no processamento do precursor polipeptídico e na replicação viral. A RNA polimerase do VHC (NS5B) por não possuir uma capacidade de revisão produz consideráveis diversidades genéticas ³⁸. O VHC possui 6 genótipos, numerados de 1 a 6, os quais diferem entre si em 30% a 34% na seqüência dos nucleotídeos, 30% na seqüência de seus aminoácidos e no crescente número de subtipos ou subgrupos. Os subgrupos são identificados por letras minúsculas, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, dentre outros. O VHC possui uma capacidade de gerar diversidade, dando origem às quasi-espécies, que são fundamentais na interação entre o vírus e o hospedeiro ^{38,32}.

1.1. Hepatite C – História

A descoberta do antígeno Austrália fez com que os pesquisadores acreditassem que estariam resolvidos todos os problemas das hepatites pós-transfusionais. No entanto, eles verificaram que mesmo com a realização de exames para detectar a presença do antígeno, o risco deste tipo de hepatite foi reduzido em apenas 25% dos casos. Surgiu então, a designação de hepatite não-A não-B (NANBH) que foi introduzida em 1975 e manteve-se por 14 anos até a descoberta do vírus C (VHC) ¹⁰.

O VHC foi identificado por Choo *et al.* (1989) após 7 anos de investigação, utilizando técnicas de biologia molecular para clonagem do vírus. Estudos realizados posteriormente possibilitaram o desenvolvimento de testes sorológicos baseados na pesquisa de anticorpos contra os antígenos do VHC ^{10,9}. O desenvolvimento destes testes levou ao reconhecimento de que o VHC seria um agente de alta prevalência nas infecções pós-transfusionais (maioria das NANBH), em usuários de derivados do sangue e, que existia uma associação com o uso abusivo de drogas endovenosas, cirrose e carcinoma hepatocelular ⁸.

1.2. Aspectos Clínicos e Epidemiologia

A hepatite viral C é considerada a maior causa de doença do fígado em todo o mundo ⁷. É uma doença endêmica em várias regiões geográficas, tendo o homem como o principal hospedeiro do VHC. A infecção pelo vírus C geralmente evolui para a forma crônica, em torno de 50%, o que torna estes portadores mais propensos ao surgimento de doença grave do fígado, cirrose e o carcinoma hepatocelular ^{7,26}. Os dados mais recentes fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam uma prevalência de 2% em todo o mundo, representando 120 milhões de pessoas. Registros de alta prevalência estão localizados nos países da África e Ásia; e baixa prevalência nos países industrializados como América do Norte, oeste da Europa e Austrália ⁷. No Brasil, a OMS estima que 2,5 a 4,9% da população possuem anticorpos anti-VHC positivo; o que corresponde a aproximadamente 3,9 a 7,6 milhões de portadores crônicos com risco de desenvolver cirrose e/ou câncer de fígado ². Segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia, informações relacionadas à epidemiologia da hepatite viral C ainda são incipientes, pois os estudos estão sendo realizados em populações específicas como os doadores de sangue, pacientes hemodialisados e alguns grupos de risco, como os usuários de drogas, não podendo assim expandir esta prevalência para a população em geral. Um estudo populacional, randomizado e estratificado, realizado na cidade de São Paulo por Focaccia *et al.* (1998), registrou uma prevalência de 1,42% de portadores de HVC ¹⁵. Outros estudos demonstram que entre os portadores de doença crônica do fígado, 20 a 58% possuem anticorpos anti-VHC, e no Sul do Brasil, 27% dos pacientes com carcinoma hepatocelular são soropositivos ².

A doença hepática causada pelo vírus é de difícil estudo devido às diversas manifestações clínicas, desde formas assintomáticas a cirrose, e por causa do longo período necessário para definir a cura clínica. A prevalência da infecção pelo VHC varia de acordo com a região, devido as diferentes formas de infecção. O VHC é transmitido principalmente por via parenteral, procedimentos cirúrgicos, odontológicos, transfusões de sangue e hemoderivados, uso de drogas endovenosas, hemodiálise, realização de tatuagem e “piercing”. Após a diminuição do risco de transmissão através da transfusão de sangue, 60 a 70 % dos casos novos estão relacionados ao uso de drogas endovenosas²⁵.

Estudos realizados na população mundial para verificar a prevalência da hepatite viral C demonstraram diferentes padrões nas características das populações e nas formas de transmissão. Na Inglaterra e nos Estados Unidos, caracterizados como o primeiro padrão, a população infectada é de adultos jovens, na faixa de 30-49 anos, cuja principal forma de infecção é o uso de drogas endovenosas. No Japão, considerado o segundo padrão, os infectados possuem idade mais avançada, sugerindo que o risco de infecção tenha ocorrido em um passado mais distante. No Egito, terceiro padrão, a infecção foi observada em diferentes faixas etárias. Sendo assim, diferente do primeiro, os dois últimos grupos estariam ligados a outras formas de infecção tais como o uso de equipamentos médicos contaminados (aplicação de vacinas, medicamentos), ausência de cuidados ao realizar procedimentos médicos, acupuntura, transfusão de sangue, dentre outros³⁸.

Ackerman *et al.* (2000) realizaram uma busca sistemática no banco de dados da MEDLINE, revisando todos os artigos que envolviam a forma de transmissão da hepatite viral C, publicados até junho de 1997, para verificar o risco de transmissão sexual e intrafamiliar. A partir desta revisão constataram que existia uma incidência aumentada em algumas situações, aquelas em que os filhos e empregados domésticos tinham contato com portador crônico; nos filhos de mães portadoras de hepatite viral C de áreas endêmicas, e também em cônjuges de portadores desta infecção em áreas não endêmicas de HVC. Desta forma verificaram que, os homens parceiros de mulheres portadoras são mais susceptíveis à infecção do que as mulheres de portadores⁴³.

O VHC pode provocar uma hepatite aguda que, em 20 a 50% dos casos, evolui para a cura, mas não confere imunidade permanente. Por outro lado, em 50 a

80% dos casos a infecção torna-se crônica podendo evoluir para cirrose (10 a 20% dos casos após 20 anos) e carcinoma hepatocelular (1 a 4% dos casos de cirrose / ano)²⁶. Estudos retrospectivos revelam que alguns fatores como o sexo masculino, tempo de infecção, aquisição da infecção com idade superior a 40 anos, uso de bebidas alcoólicas e co-infecção com o vírus da hepatite B contribuem para a evolução da fibrose hepática. Vários autores também sugerem que a presença de esteatose no fígado estaria relacionada com o grau de fibrose e a progressão de doença, baseados na hipótese de que a esteatose forneceria substrato adicional para a peroxidação lipídica amplificando assim a inflamação hepática na infecção crônica pelo VHC. Além disso, por ser encontrada com maior frequência entre os portadores do genótipo 3, a esteatose pode representar um efeito citopático direto do vírus ^{38,15}.

As manifestações hepáticas são as principais características da infecção crônica pelo vírus C, no entanto, algumas desordens imunológicas estão sendo associadas ao VHC. Dentre essas estão incluídas as hepatites auto-imunes (HAI), Síndrome Sjögren (SS), tireoidites autoimunes, glomerulonefrites, crioglobulinemia e poliartrite nodosa ⁴.

1.3. Resposta Imune ao vírus:

A infecção pelo vírus hepatotrópico C inicia-se com a sua entrada na célula hospedeira. O mecanismo utilizado pelo vírus para penetrar na célula ainda não foi elucidado totalmente. No entanto, a estrutura mais provavelmente envolvida nesta interação com receptores da superfície celular é o complexo formado pelas glicoproteínas E1-E2 do envelope e expresso na superfície do VHC. Alguns autores sugerem que o vírus pode utilizar vários receptores para a infecção da célula hospedeira, dentre eles o receptor CD-81(TAPA-1), envolvido nas atividades de adesão, motilidade, ativação celular e tradução de sinais, o qual é expresso em muitos tecidos, com exceção das células vermelhas e plaquetas, mas que sozinho não é suficiente para conferir susceptibilidade à infecção. Os receptores SR-BI, que são proteínas que se ligam a lipoproteínas modificadas quimicamente, tais como as de baixa densidade (LDL) acetiladas e oxidadas, são altamente expressos em hepatócitos e estão localizados no compartimento da membrana. Acredita-se que a

ligação da proteína E2 ao SR-BI aconteceria independentemente da molécula CD81
32

O receptor endocítico, que transporta LDL para dentro das células através da endocitose, seria uma outra porta de entrada para o vírus. Contudo, a ligação das moléculas

Estudos realizados *in vitro* com as células NK de pacientes infectados com VHC, demonstraram que as mesmas perdem a função de ativação das células dendríticas devido à expressão exagerada do CD94-NKG2A e pela produção do fator β de transformação e crescimento (TGF- β) e da Interleucina 10 (IL-10), o que não acontece com indivíduos sadios ¹⁶.

Outro estudo realizado *in vitro* por Tseng & Klimpel (2002), com células NK de indivíduos sadios, demonstra que a glicoproteína recombinante E2 do envelope, em altas concentrações, se liga ao receptor CD81 inibindo a proliferação, a produção de citocinas e a liberação de grânulos citotóxicos por estas células e particularmente sua habilidade em produzir INF- γ após ativação ⁴⁰. Estes experimentos sugerem que o VHC altera a defesa do hospedeiro e a imunidade inata no início da infecção através de uma variedade de mecanismos facilitando assim a infecção crônica ³⁷.

1.3.2. Resposta Imune Adaptativa:

O VHC alcança altos títulos na primeira semana de infecção; a resposta imune celular demora cerca de 1 mês e a humoral cerca de dois meses, o que reforça a hipótese de que o vírus escapa da resposta imune adaptativa. Os portadores de hepatite viral C que curam espontaneamente a infecção desenvolvem uma resposta de célula T CD4+, tipo Th1, a qual é específica e vigorosa contra vários epitopos. Ao contrário, aqueles pacientes que evoluem para a hepatite crônica, desenvolvem uma resposta de células T CD4+ tardia, transitória e limitada ³².

Um estudo realizado para verificar a expressão gênica de chimpanzés infectados demonstrou que a eliminação viral, sustentada ou transitória, está associada com a ativação de genes indutores de INF- γ e genes envolvidos com o processamento e apresentação de antígenos. Sendo assim, uma resposta imune inadequada, quantitativa e qualitativa, parece representar um importante papel no estabelecimento da infecção persistente ⁴⁰.

A resposta de células T CD8+, vigorosa e multiespecífica, também está associada com a eliminação espontânea do vírus. Por outro lado, quando o fenótipo e a função das células T CD8+ são prejudicados, os pacientes desenvolvem a infecção crônica. Uma resposta de célula T CD4+ insuficiente também é responsável

pela resposta deficiente de células T CD8+. Uma hipótese para esclarecer esta ineficiência das células T CD4+ seria a infecção de células dendríticas pelo VHC, que promoveria uma inibição da produção de IL-12, comprometendo a sua função alo-estimulatória. Isto resultaria em polarização tendenciosa da resposta de células T CD4+, favorecendo a resposta Th2 ^{32,40}.

Outros possíveis mecanismos para esclarecer esta resposta ineficiente contra o vírus incluem o bloqueio na diferenciação e maturação de células pelo VHC, na proliferação de células T, na produção de INF- γ , e a formação de quasi-especies que promovem o escape da resposta de células T CD8+ ³².

O aumento nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) no soro dos portadores da infecção ocorre entre a 8^a. - 14^a. semana de infecção, quando a expressão intra-hepática dos genes que codificam os componentes da resposta imune adaptativa está aumentada. Esta fase é clinicamente assintomática para muitos pacientes, no entanto, aqueles que apresentam sintomas clínicos e icterícia possuem uma chance de cura aumentada em relação aos assintomáticos ^{4,26,32,38}.

Estudos realizados com chimpanzés demonstram que o surgimento de resposta de célula T e indução na expressão de INF-I no fígado coincide precisamente com a diminuição dos títulos de VHC RNA ³⁸.

O início do surgimento dos anticorpos anti-VHC é muito variável e seus títulos não se mantêm por toda a vida, podendo desaparecer 10 a 20 anos após a cura da infecção e não oferecem proteção contra re-infecção. As células T específicas contra o VHC são menos diferenciadas que as células T atuantes em outras infecções e podem com isso estar prejudicadas em suas funções efetoras ^{32,38}.

1.4. Autoimunidade e Manifestações Extra-hepáticas:

A resposta imune do hospedeiro na hepatite C exerce um papel singular no combate à infecção, uma vez que contribui não apenas para o controle viral, cura clínica e o desenvolvimento da imunidade protetora, mas também pela hepatite crônica e a cirrose. A indução de mutações pelo VHC em proto-oncogenes tem sido relacionada às manifestações auto-imunes na hepatite C, juntamente com a expansão de células B mono e policlonais ³².

Os títulos de VHC RNA tendem a permanecer estáveis durante décadas em portadores crônicos de hepatite C e a eliminação viral espontânea não acontece. A

capacidade de estabelecer infecção persistente é um aspecto muito importante na infecção pelo vírus C. O linfotropismo característico do VHC, que permite que a sobrevivência do vírus nas células do sistema imune, é um dos fatores que podem contribuir para a infecção viral persistente ⁴.

O VHC pode ser encontrado nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes cronicamente infectados. A detecção de RNA VHC em células T CD8+, não fagocitárias, sugere que estas foram infectadas. Sendo assim, esta infecção poderia influenciar a função imune destas células e assim contribuir para a infecção persistente do vírus. Um estudo realizado por Cribier *et al* (1995) utilizando a hibridização *in situ* e a PCR para demonstrar a infecção *in vitro* de PBMC em cultura pelo VHC, reforçou a idéia de que o RNA VHC encontrado após 6 semanas não era devido a aderência persistente do vírus a estas células e sim da replicação viral ^{4,11,26}.

Os mecanismos responsáveis pelo início ou progressão das lesões hepáticas durante a infecção crônica pelo VHC ainda não foram completamente estudados. Acredita-se que o VHC por si próprio não possua atividade citopática. A única lesão que pode ser atribuída a um efeito patogênico direto pelo VHC é a esteatose, sendo o genótipo 3 o seu único responsável, enquanto que em pacientes infectados por outros genótipos do VHC a presença desta lesão está relacionada a fatores exógenos metabólicos ^{26,11}.

O dano hepático na hepatite crônica é representado principalmente por infiltrado linfóide portal, necrose focal ou difusa e lesões lobulares degenerativas. Estas lesões aparecem devido à resposta imune local e podem ser amplificadas devido ao acúmulo de células T específicas que são recrutadas através da expressão de citocinas e moléculas de adesão. Este infiltrado linfóide é composto principalmente por células T CD4+ do espaço periportal, muitas das quais possuem o fenótipo Th1 (produção de INF) e por células T CD8+ pertencentes à região lobular e periportal ²⁶.

Alguns estudos sugerem que a gravidade das lesões hepáticas esteja relacionada à expressão de citocinas Th1 no local, associada com a resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) às células infectadas ou não, através do *Fas*, TNF- α e mecanismos mediados pelas perforinas. Além destas, podem ainda estar envolvidas as células TCD4+, as células NK e o receptor de célula T (TCR) ^{26,11}.

A principal complicação da hepatite crônica é a fibrose, sendo considerada a maior responsável pela morbidade e mortalidade da doença. A progressão da fibrose aparece como o resultado direto da inflamação crônica do fígado, a qual está associada com a destruição dos hepatócitos e produção local de citocinas e fatores de crescimento. O papel do vírus na progressão da fibrose ainda não está claro, mas fatores externos como consumo de álcool, co-infecção com outras viroses como HIV, diabetes e obesidade são fatores importantes na sua progressão e evolução para a cirrose. O carcinoma hepatocelular (CHC) é a última complicação da infecção crônica pelo VHC. A cirrose aparece como o principal fator de risco para o seu surgimento, mas os fatores exógenos para evolução da fibrose e cirrose também são importantes no desenvolvimento do CHC ²⁶.

A resposta imune do hospedeiro causa sérios danos hepáticos para tentar controlar a infecção e realizar a eliminação viral; e associada a esta resposta a infecção pelo VHC provoca várias manifestações imunopatológicas, tais como: crioglobulinemia, tireoidite auto-imune, hepatite auto-imune, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, glomerulonefrite, *líquen planus*, poliarterite nodosa e diabetes ^{21,30,19}.

As infecções são os principais fatores para o início de auto-imunidade em indivíduos predispostos, uma vez que o patógeno induz uma resposta inflamatória intensa e assim pode atrair um grande número de linfócitos auto-reativos para o sítio da infecção. O vírus ao infectar a célula alvo, ou os órgãos diretamente, pode desencadear este processo através de alguns mecanismos como: destruição das células e promoção da liberação de auto-antígenos potenciais, acentuando assim a apresentação destes antígenos; ou então ativar diretamente células auto-reativas pela apresentação de antígenos que são reconhecidos como próprios, num mecanismo denominado de mimetismo molecular ^{6,28}.

Devido a estas características das infecções virais, evidências clínicas de fenômenos auto-imunes estão sendo levantadas em portadores de VHC crônicos. A hepatite C em si pode ser diagnosticada de acordo com suas evidências clínicas clássicas, mas algumas desordens não-hepáticas que são provavelmente iniciadas, se não em todo, ao menos em parte pelo vírus, podem apoiar a busca de um possível diagnóstico de hepatite viral C crônica ³⁹.

A associação entre crioglobulinemia mista e infecção pelo vírus C com história clínica de vasculite e glomerulonefrite membranoproliferativa já foram descritos por vários autores ^{4, 36,39}.

A crioglobulinemia mista é uma vasculite sistêmica que afeta principalmente pequenos vasos e, menos freqüentemente, veias e artérias de médio calibre. Acredita-se que a lesão causada nos vasos teria como causa principal a deposição de complexos imunes nas suas paredes, seguida da ativação do Complemento

mpiferur



provoca vasculites sistêmicas, como as nefropatias e neuropatias crioglobulinêmicas ^{14,19,34}.

Auto-anticorpos que definem um grupo de doenças auto-imunes, como as hepatites auto-imunes (HAI), também estão sendo associados à infecção pelo vírus C. Os anticorpos anti-núcleo (ANA), anti-LKM1 e anti-músculo liso (SMA) estão sendo freqüentemente relacionados com a infecção pelo VHC, mas os mecanismos responsáveis por esta resposta auto-imune ainda não foi elucidado ^{39,19,4}.

Além da associação da infecção pelo VHC com a formação de auto-anticorpos, lesões cutâneas e glomerulonefrite, alguns casos de Lúpus eritematoso sistêmico (SLE), tireoidites e artrite reumatóide têm sido também associados. O surgimento de uma síndrome antifosfolípide atípica e o desenvolvimento de sarcoidose, juntamente com uma alta prevalência de desordens hematológicas, tais como citopenias e desordens linfoproliferativas, também tem sido associadas à infecção pelo vírus C. Contudo, não se sabe ao certo se o VHC precede estas manifestações ou ocorre simultaneamente, de qualquer modo ele é considerado uma das maiores causas de muitas doenças auto-imunes ^{39,19,30}.

Um estudo multicêntrico envolvendo 137 pacientes com infecção pelo VHC associada à Síndrome de Sjögren (SS), VHC-SS, constatou que em muitos casos não é possível fazer uma distinção com a SS primária tendo como base os critérios mais recentes de classificação. Portanto, a infecção pelo VHC deveria ser um critério de exclusão para SS primária, já que o vírus pode estar envolvido no desenvolvimento de SS em alguns pacientes ³⁰.

Um estudo realizado para avaliar o impacto da terapia antiviral combinada em pacientes infectados com VHC, apresentando auto-anticorpos, concluiu que esta seria segura e efetiva, desde que descartada a presença de uma provável ou definitiva hepatite auto-imune ²¹.

Existem vários relatos de aparecimento de distúrbios imunológicos em consequência ao tratamento da infecção pelo VHC com INF- α . A conduta terapêutica em pacientes que apresentam características auto-imunes relacionados ao VHC tem se tornado um desafio clínico, uma vez que estes achados contribuem para um mau prognóstico na evolução da doença ³⁰.

2. Relevância

A hepatite viral C, desde a sua descoberta, transformou-se em um problema de Saúde Pública no Brasil e no mundo. Na última década, muito se tem discutido sobre as manifestações extra-hepáticas e auto-imunes em portadores crônicos da infecção pelo VHC.

O contexto exposto anteriormente ressalta a importância da investigação de auto-anticorpos em portadores de hepatite viral C, já que a infecção crônica persistente desencadeia um espectro de perturbações associadas ao sistema imune.

A infecção pelo VHC constitui uma importante causa de crioglobulinemia mista tipo II, a qual pode evoluir para glomerulonefrite, vasculite e neuropatia. A imunopatogenia e a imunopatologia da infecção pelo VHC ainda precisam ser melhor conhecidas, pois existem registros de casos da infecção associados a poliartrite, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidites auto-imunes e síndrome de Sjögren, não sendo contudo documentada a participação do vírus hepatotrópico C na etiologia destas doenças ^{14,19,20}.

Diante disto, a análise das associações entre as manifestações clínicas e laboratoriais é de fundamental importância para avaliar os aspectos clínicos e epidemiológicos dos portadores de HVC crônica no Brasil, os quais são submetidos ao tratamento com Interferon-alfa sem que se conheça o padrão de resposta imune pré-existente.

A seguinte hipótese orientou o presente estudo:

Portadores de hepatite viral C crônica produzem auto-anticorpos na mesma frequência, e com a mesma especificidade antigênica, que os pacientes portadores de doenças auto-imunes.

3. Objetivos:

3.1. Geral:

Investigar a frequência de auto-anticorpos em indivíduos portadores de Hepatite viral C crônica assistidos clinicamente em Salvador, Bahia.

3.2. Específicos:

- Investigar a produção de crioglobulinas em portadores de hepatite viral C crônica.
- Avaliar a frequência nesses pacientes de auto-anticorpos séricos associados com artrite reumatóide (fator reumatóide e anticorpos antipeptídeo cíclico citrulinado), lúpus eritematoso sistêmico (anticorpos antinúcleo, anti-Sm, anti-DNA fita dupla), síndrome de Sjogren (anticorpos anti-SSA e SSB), síndrome de anticorpos antifosfolípidos (anticorpos anticardiolipina) tireoidites auto-imunes de Graves e Hashimoto (anticorpos anti-TPO e antitireoglobulina) e hepatites auto-imunes (antimúsculo liso e anti-LKM1).
- Determinar os níveis séricos de IgA e IgG nos pacientes incluídos neste estudo, portadores desta enfermidade.

4 Pacientes, Materiais e Métodos:

4.1 Pacientes

O grupo de pacientes em estudo correspondeu a 60 indivíduos cadastrados no Ambulatório de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) e no Serviço de Hepatologia da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FBDC), coordenado pelo Prof. Dr. Raymundo Paraná. O grupo foi constituído por pacientes de ambos os sexos e idade entre 20-66 anos, confirmados clinicamente e sorologicamente para a hepatite C crônica. Todos residiam em Salvador ou em municípios baianos. Os critérios de inclusão adotados foram: a condição de portador do VHC com diagnóstico clínico e sorológico através de testes de ELISA de 3ª geração que detectam anticorpos contra os antígenos do core viral e contra as proteínas não-estruturais NS3, NS4 e NS5, além da confirmação da infecção por demonstração de RNA viral destes indivíduos; ausência de sorologia positiva para HIV, Hepatite B, HTLV I/II e de outras enfermidades crônicas.

O grupo controle foi representado por 40 doadores sadios de banco de sangue, sorologicamente negativos para hepatite viral C e B, doença de Chagas, sífilis, HIV I/II e HTLV I/II, após a realização de testes imunoenzimáticos seguindo os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde. Esses indivíduos foram pareados por idade e sexo, em relação ao grupo alvo, e foram selecionados no Serviço de Transfusão de Sangue – STS (Salvador – BA).

Todos os pacientes foram previamente informados sobre o projeto e tiveram as suas participações confirmadas através das assinaturas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, atendendo todas as exigências da resolução CNC 196/96, conforme aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz / BA.

4.2 Obtenção do Soro:

A coleta de sangue total foi realizada utilizando sistema de coleta à vácuo e tubo de 10 mL sem anticoagulante. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37° C por 30 minutos e a separação do soro realizada antes do resfriamento da

amostra por centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O soro obtido foi dividido em duas alíquotas de aproximadamente 2 mL, sendo uma utilizada para a pesquisa e identificação de crioglobulinas e outra armazenada a temperatura inferior a -20° C para a pesquisa de auto-anticorpos.

4.3 Análises Bioquímicas:

Foram realizadas dosagens bioquímicas de proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT) e creatinina, com a finalidade de avaliar as funções hepáticas e renais dos pacientes.

4.3.1. Dosagem de Proteínas Totais e Albumina:

A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método colorimétrico do Biureto, e a de albumina com o método colorimétrico do verde de bromocresol modificado utilizando reagentes comerciais (SYNERMED™). Para a realização dos testes foram seguidas as determinações do fabricante. Acompanhando a dosagem das amostras, um soro calibrador (TruCal U – Diasys, Germany) e um soro controle (TruLab – Diasys, Germany) foram utilizados para validação dos testes. As leituras foram realizadas em um fotômetro com microprocessador (Stardust MC 15, Diasys) a 546 e 630 nm contra o Branco do reagente.

4.3.2. Dosagem de Creatinina e Alanina Amino Transferase (ALT):

A dosagem de creatinina foi realizada utilizando teste cinético sem desproteinização baseado no método de Jaffé, através de reagentes comerciais (Creatinine FS*, Dyasis, Germany); e a da alanina aminotransferase (ALT) através do método IFCC, 37°C, sem piridoxal fosfato, utilizando reagentes comerciais (BioSystems S.A, Barcelona). Para a realização dos testes foram seguidas as determinações do fabricante. As leituras foram realizadas em um fotômetro com microprocessador (Stardust MC 15, Diasys) a 340 e 500 nm.

4.4 Pesquisa e Identificação de Crioglobulinas:

A pesquisa da presença de crioglobulinas foi realizada através dos métodos de crioprecipitação em tubo de Wintrobe e da difusão em gel. A identificação dos isotipos de imunoglobulinas participantes do crioprecipitado foi realizada por imunodifusão, após dissolução a 37°C do crioprecipitado em gel de agarose, frente a antissoros policlonais monoespecíficos para IgA, IgG e IgM.

4.4.1. Método do criócrito:

A presença de crioglobulinas foi detectada utilizando o método da crioprecipitação em tubo de wintrobe (criócrito). Tubos de wintrobe foram preenchidos com 1 mL do soro dos pacientes e controles, mantidos a 4° C por até 7 dias e observando diariamente a formação de precipitados ou floculação. As amostras positivas foram levadas ao Banho-Maria a 37° C, por uma hora. Precipitados constituídos de crioglobulinas se dissolvem após este aquecimento, confirmando assim o resultado ³³.

4.4.2. Método da Imunodifusão em Gel de Agarose a 1%:

A pesquisa e identificação de crioglobulinas foram realizadas através da técnica de imunodifusão em gel de agarose, com ligeiras modificações ²³. Foram utilizadas placas contendo gel de agarose de média eletroendosse (Reagen, Rio de Janeiro) a 1% em tampão Dulbecco com pH ajustado para 7,0. A solução tampão de Dulbecco foi preparada a partir de três soluções A, B e C, nas proporções 8:1:1, respectivamente. A solução A foi preparada com NaCl - 0,1g, KCl - 0,25 g, Na₂HPO₄ - 1,44 g, KH₂PO₄ - 0,25 g, água qsp 1L. A solução B com CaCl₂.2H₂O - 1,33 g e água qsp - 1L. A solução C com MgCl₂.6H₂O -1g e água qsp 1L. A agarose foi dissolvida em banho-maria fervente na solução tampão de Dulbecco e adicionada a placas de plástico tipo Petri para produzir um gel de 2 mm de espessura. Quatro orifícios de 5 mm de diâmetro , um destinado à aplicação da amostra e os outros três aos antissoros anti-IgA, anti-IgG e anti-IgM, foram feitos nas placas. Para a pesquisa de crioglobulinas 20 µL do soro dos pacientes e controles foram depositados no orifício central da placa, a qual foi incubada a 4°C por 48 horas. Após

o período estabelecido, foi investigada a presença de um anel de precipitado ao redor do orifício central. Placas positivas, que apresentavam o anel, foram imersas em solução salina 0,9% (gelada) a 4° C por 48 horas, para remoção de outras proteínas que poderiam contribuir para um resultado falso-positivo. Após as 48 horas, desaparecendo o precipitado estaria confirmado o resultado negativo. Os isotipos das crioglobulinas foram identificados utilizando antissoros específicos para os diferentes isotipos de Imunoglobulinas. Assim, foram adicionados 20 µL dos antissoros anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM aos três orifícios restantes na placa positiva, a qual foi incubada a 37° C por 12 horas. A identificação do isotipo de crioglobulina foi obtida pela linha de precipitação produzida frente aos diferentes antissoros.

4.5 Pesquisa de Auto-Anticorpos:

4.5.1. ELISA

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi adotado como método para determinação semi-quantitativa dos auto-anticorpos nos soros dos pacientes e controles: antinúcleo (ANA), anti-SS-A/Ro e anti-SS-B/La, anti-Sm, antiribonucleoproteínas (RNP) , anti-DNA fita dupla (dsDNA), anticardiolipina (ACA IgA, IgG e IgM), anti- CCP2 e anti-citocromo oxidase P450 IID6 (LKM-1). Todos os auto-anticorpos foram pesquisados através de conjuntos diagnósticos comerciais QUANTA Lite IgG ELISA™ (INOVA Diagnostics, Inc., USA), específicos para cada anticorpo. Como cut-off pré-estabelecido destas reações foi usado o limite inferior de 20 UI/ mL de anticorpos.

4.5.2. Imunofluorescência Indireta (IFI)

A imunofluorescência Indireta (IFI) foi o método utilizado para a pesquisa de anticorpos anticitoplasma de neutrófilos e antimúsculo liso. Auto-anticorpos anticitoplasma de neutrófilos, ANCAc e ANCAp, foram investigados utilizando conjunto diagnóstico comercial INOVA Lite™ ANCA (INOVA Diagnostics, Inc., USA), usando leucócitos polimorfonucleares neutrófilos previamente fixados com etanol, enquanto os auto-anticorpos antimúsculo liso (SMA) foram pesquisados com o conjunto diagnóstico comercial NOVA Lite™ Mouse Kidney & Stomach, da mesma

procedência, utilizando como substrato antigênico cortes de rim e estômago de rato, e como conjugado anti-IgG humana marcado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) em solução de azul de Evans.

O cutoff correspondente a uma diluição 1/40 do soro teste, foi usado em ambas as reações, que foram lidas em microscópio para imunofluorescência de luz transmitida Olympus modelo BHF (Olympus, Japan).

4.5.3. Aglutinação Indireta

Anticorpos anti-peroxidase tireoidiana ou anti-tireoidiano microssomal (anti-TPO/AMC) e anti-tireoglobulina (ATG/AAT) foram detectados por testes de aglutinação indireta, utilizando conjuntos diagnósticos comerciais SERODIA-AMC e SERODIA-ATG (Fujirebio, Inc. Tokyo, Japan) representados por micropartículas de gelatina sensibilizadas com o antígeno peroxidase tireoidiana e tireoglobulina, soros controles positivo e negativo e solução diluente para diluição dos soros. Os soros foram testados em diluições seriadas, a partir de 1/100, considerada também como cutoff para uma reação positiva.

A triagem sorológica de fator reumatóide (FR) foi realizada utilizando-se soro sem diluir e suspensão de partículas de látex de poliestireno com gamaglobulina humana adsorvida como antígeno, em tampão 100mmol/L de glicina pH 8,2 (Doles, Brasil). Soros fornecendo reações de aglutinação positivas ou inconclusivas foram avaliados quantitativamente por imunoturbidimetria.

4.5.4 Imunoturbidimetria

Os soros positivos ou inconclusivos na triagem sorológica para FR foram avaliados por imunoturbidimetria, usando-se uma curva de referência confeccionada com um padrão da World Health Organization (WHO) de concentração conhecida, usando-se um cutoff de 30 UI/ml de FR.

A quantificação das imunoglobulinas IgA e IgG foi realizada também por imunoturbidimetria, utilizando solução de anticorpos policlonais mono-específicos (Capricorn, USA). As leituras das reações foram realizadas após incubação da mistura antígeno-anticorpos por 10 minutos a 37°C, no mesmo fotômetro a 340 nm.

4.6. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa de estatística GraphPad Prism 3.03 (San Diego, CA, USA). Os títulos de auto-anticorpos foram expressos como medianas e comparados pelo teste U de Mann-Whitney, enquanto as análises de correlação foram realizadas através do teste não-paramétrico de Spearman, sendo consideradas significativas às diferenças quando $P < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Pacientes

Neste estudo todos os pacientes foram avaliados sorologicamente para os marcadores laboratoriais de doenças reumáticas, tireoidites auto-imunes, hepatites auto-imunes, crioglobulinemia, anticorpos antifosfolípidos e vasculites. Dentre os pacientes portadores de hepatite viral C crônica, sorologicamente e clinicamente confirmados para VHC, 29/60 (48%) eram portadores do genótipo 1, 2/60 (3%) genótipo 2, 13/60 (22%) genótipo 3 e os demais apresentavam resultados de PCR qualitativo positivo (13/60) ou Indetectável (3/60), concordando com os dados apresentados em um estudo populacional previamente realizado ²⁵.

Neste grupo apenas 26/60 (43%) possuíam resultado de biópsia com diferentes estágios de fibrose e, dentre estes, 11/26 (42%) apresentavam evolução para cirrose. A presença de esteatose foi detectada em 6/60 (10%) dos pacientes. Apenas 1/60 (1,6%) dos pacientes apresentou um quadro clínico de artrite reumatóide e 2/60 (3%) tireoidites auto-imunes. Glomerulonefrite e vasculite foram documentadas em apenas um paciente; e neuropatia na mesma frequência. Todos os demais pacientes não tinham diagnóstico de doenças auto-imunes.

5.2. Análises Bioquímicas

Entre os soros analisados, 26/60 (43%) apresentaram valores de proteínas totais aumentados (entre 8,4 a 11,5 G/dL), considerando como valores de referência 6,4 – 8,3 G/dL. A comparação dos resultados obtidos no grupo dos portadores de hepatite viral C crônica com os resultados do grupo controle demonstrou uma diferença significativa entre estes dois grupos (teste U de Mann-Whitney, $U = 876,5$, $P = 0,0231$). Apenas um dos sessenta soros (1,6%) apresentou um valor aumentado da concentração de albumina (6,4 G/dL) e 4/60 (7%) apresentaram valores diminuídos entre 2,0 – 3,5 G/dL, utilizando os valores de referência 3,5 – 5,5 G/dL. Os resultados obtidos no grupo de portadores de VHC foram comparados aos obtidos com os controles, não sendo observado diferenças significativas entre os mesmos (figura 1).

Apenas um soro dos pacientes (1,6%) apresentou concentração de creatinina acima do limite de referência (1,7 mg/dL). Em 4 soros (7%) as concentrações foram próximas do limite superior de referência de 1,5 mg/dL, situando-se entre 1,4 e 1,5 mg/dL. Os demais apresentaram valores sem alterações. Dentre os valores obtidos para ALT, 12/60 soros (20%) apresentaram valores acima da referência (40 U/mL), variando de 40-129 UI/mL. Ao se comparar as concentrações de ALT obtidas dos soros dos pacientes com as dos controles, uma diferença significativa foi observada (teste U de Mann-Whitney, $U = 349,0$, $P < 0,0001$; figura 2)

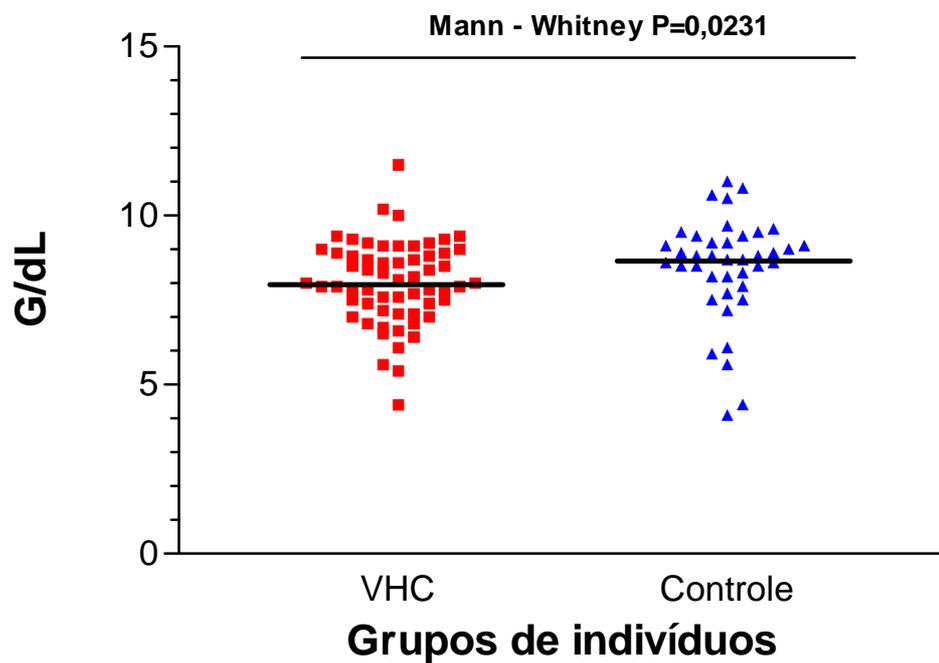


Figura 1. Concentrações de Proteínas Totais nos soros de portadores de hepatite viral C crônica e no grupo controle. Valores de referência para proteínas totais correspondem a 6,4 – 8,3 G/dL pelo método do Biureto.

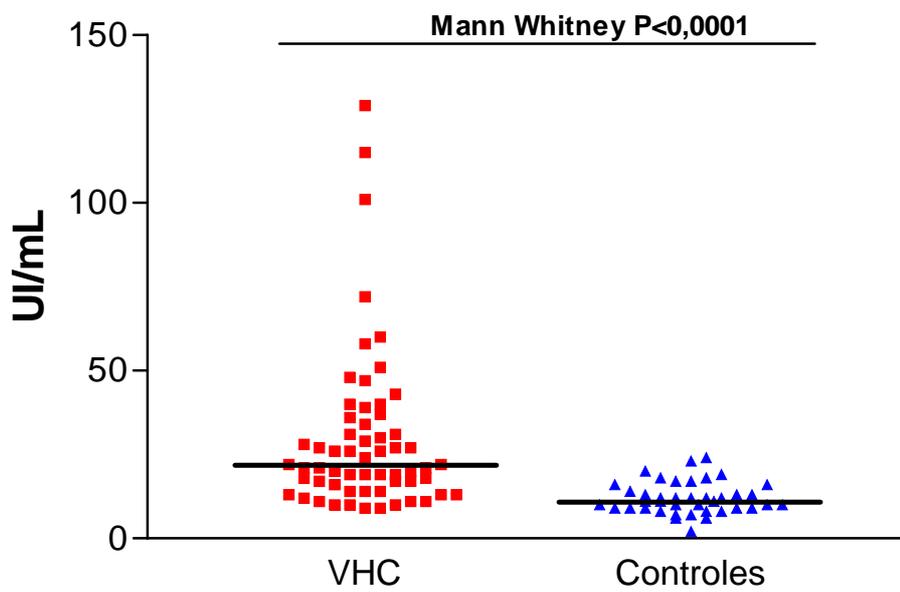


Figura 2. Concentrações séricas de ALT obtidas no grupo de portadores de hepatite viral C crônica comparado com o grupo controle, obtidas por dosagens cinéticas com valor de referência superior igual a 40 U/mL.

5.3. Pesquisa e Identificação de crioglobulinas

As crioglobulinas foram pesquisadas e identificadas no soro de 39/60 portadores de HVC, o equivalente a 65% da população estudada, através dos métodos do criocrito³³ e da imunodifusão em gel de agarose a 1%²³ (Figura 3). Dentre estes, 13/39 (33%) apresentaram manifestações clínicas associadas com crioglobulinemia tais como, artrite, fadiga, febre, fraqueza, mialgias, glomerulonefrite, vasculite, púrpura cutânea palpável e neuropatia periférica, enquanto 26/39 (67%) não demonstraram nenhuma manifestação clínica apresentando uma crioglobulinemia assintomática. No grupo controle foram identificadas no soro de 4/40 (10%).

Foram identificadas as classes IgA/IgG/IgM, IgG/IgM, IgA/IgG, IgG e IgM (tabela 1).

Classes Ig	HVC		Controles	
	Masculino (%)	Feminino (%)	Masculino (%)	Feminino (%)
IgA IgG IgM	14/39 (36)	8/39 (21)	1/40 (2,5)	-
IgA IgG	1/39 (2,5)	2/39 (5)	-	-
IgG IgM	7/39(18)	-	-	1/40 (2,5)
IgG	2/39 (5)	2/39 (5)	-	-
IgM	2/39 (5)	1/39 (2,5)	1/40 (2,5)	1/40 (2,5)

Tabela 1. Frequência e composição imunoquímica de crioglobulinas nos grupos HVC e controles sadios.

5.4. Pesquisa de auto-anticorpos associados com doenças reumáticas

Anticorpos IgG anti-núcleo foram detectados nos soros de 18/60 (30%) dos pacientes, com títulos variando de 22 a 109, mediana igual a 38,5 e nos controles 6/40 (15%), com títulos variando de 22 a 37, mediana de 29,5 (figura 4). Dentre os pacientes, somente 6/18 (33%) dos soros foram positivos para anticorpos anti-ENA, reagindo todos com o antígeno SSA/Ro, com títulos entre 20 e 66, mediana igual a 22,5 (figura 5). Nenhum soro reagiu com os demais antígenos do perfil ENA (SS-B,

Sm e RNP). Do mesmo modo, não foi observada nenhuma reatividade para os anticorpos anti-DNA nativo nos soros testados e positivos para ANA.

A análise comparativa entre os resultados de ANA e o sexo dos pacientes não demonstrou nenhuma correlação.

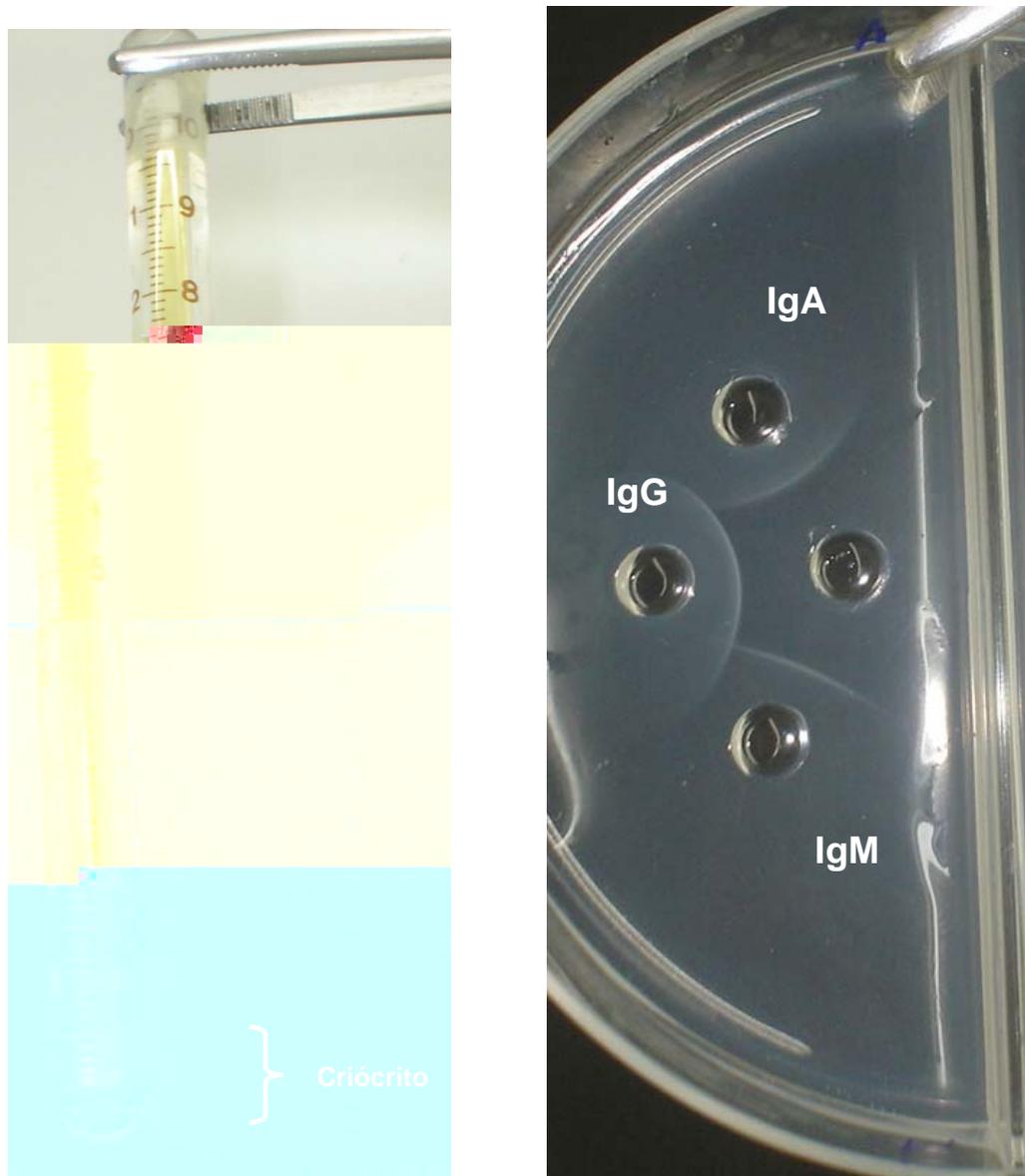


Figura 3. Pesquisa positiva de crioglobulinas pelos métodos do Criócrito em tubo de Wintrobe e de gel-difusão, seguida de identificação das classes de Imunoglobulinas envolvidas na crioprecipitação após imunodifusão em gel frente à antissoros policlonais monoespecíficos anti-IgA, anti-IgG e anti-IgM.

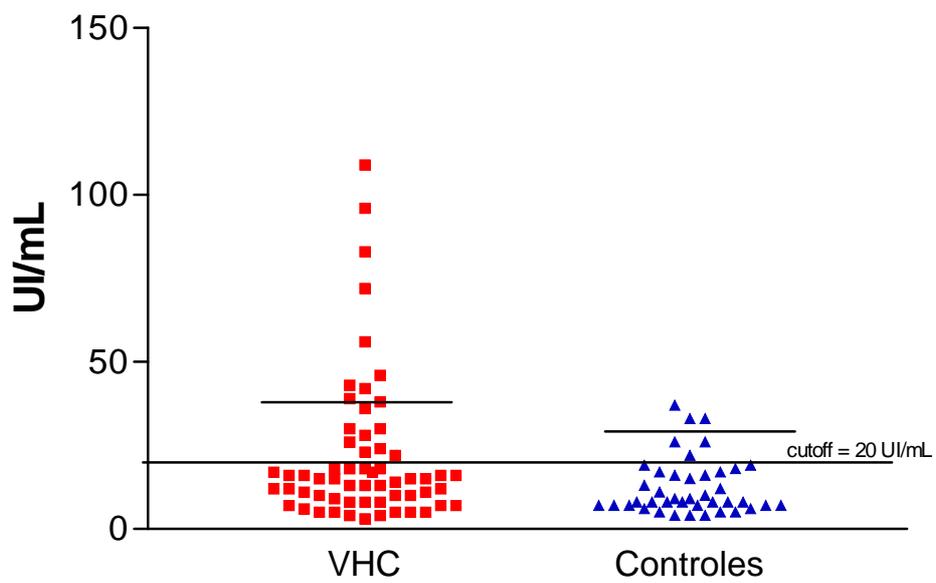


Figura 4. Títulos de ANA-IgG em pacientes e controles, obtidos através de teste de ELISA indireto, usando como cutoff 20 UI/mL. As retas horizontais correspondem as medianas dos títulos de soros positivos.

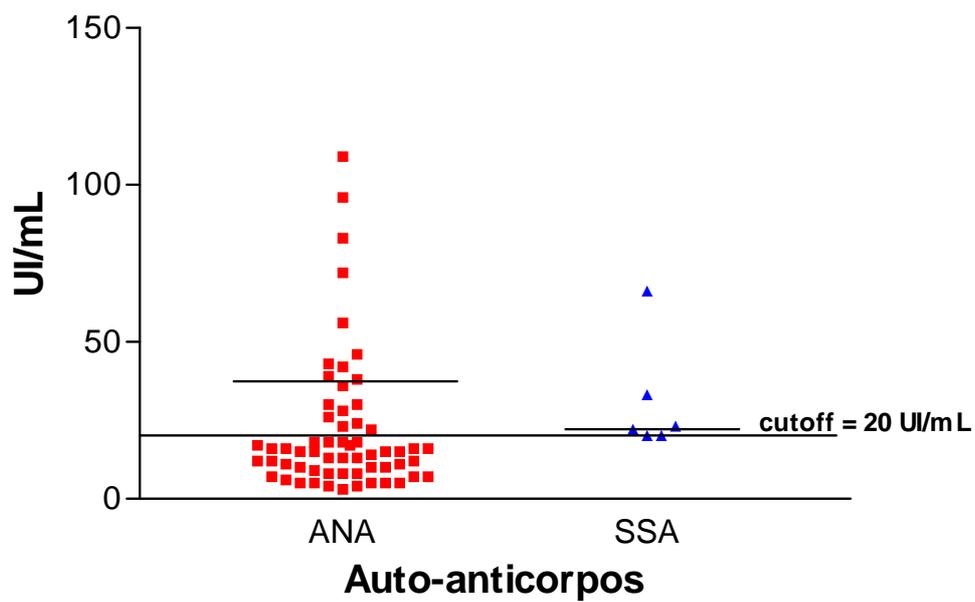


Figura 5. Especificidade antigênica dos soros positivos em ANA frente ao antígeno ENA-SSA (frequência = 33%, cutoff= 20 IU/mL).

5.5 Pesquisa de auto-anticorpos associados com síndrome de anticorpos antifosfolípidas e vasculites

Anticorpos IgA anticardiolipina (ACA) não foram detectados em nenhum dos soros testados. Anticorpos IgG ACA foram observados em 2/60 (3%) dos soros testados, com títulos de 22,8 e 24 GPL. Anticorpos IgM ACA em 21/60 (35%) dos soros testados, com títulos entre 20,1 e 43,3 MPL, mediana igual a 23,19. Conforme observado (Figura 6).

Análises realizadas para verificar a correlação entre sexo e a presença de anticorpos ACA, indicaram uma maior frequência e títulos mais elevados de ACA IgM em indivíduos do sexo masculino, não sendo observada nenhuma diferença para os demais anticorpos (Teste de Fisher, $P = 0,005$; Teste U de Mann-Whitney, $P=0,0002$ Figura 7).

Anticorpos anticitoplasma de neutrófilos, ANCA-c e ANCA-p foram detectados em 1/60 (1,6%) e 5/60 (8%) dos soros testados, respectivamente.

5.6 Pesquisa de marcadores laboratoriais associados com hepatites auto-imunes

A presença de anticorpos antimúsculo liso (SMA) foi observada em 18/60 (30%) dos pacientes, considerando um título mínimo de 1:40, enquanto apenas um soro (1,6%) apresentou reatividade para os anticorpos anti-LKM1 com título baixo de 20 UI/mL.

Entre os soros avaliados para IgA, apenas um (1,6%) apresentou concentração aumentada (420mg/dL), tendo como valores de referência 40 - 390 mg/dL. O mesmo ocorreu para IgG, onde também apenas um soro apresentou concentração ligeiramente aumentada desta proteína (1655 mg/dL), baseado nos valores normais de 650 a 1600 mg/dL. (Figura 8).

5.7 Pesquisa de auto-anticorpos associados com artrite reumatóide

O fator reumatóide foi pesquisado pela técnica de aglutinação indireta e quantificado pela imunoturbidimetria. Desta maneira, foram detectadas 27/60 (45%) amostras de soro reagentes para o fator reumatóide, cujas dosagens variaram entre 24 e 91 UI/mL (mediana 54 UI/mL, Figura 9). Uma baixa reatividade para esse auto-anticorpo foi também observada em 13,3% dos controles. Na pesquisa de anticorpos IgG anti-CCP das amostras previamente testadas reativas para fator reumatóide foram detectados dois soros positivos, em com títulos de 25 e 358 UI/mL.

5.8 Pesquisa de auto-anticorpos antitireóide

Anticorpos antiperoxidase tireoidiana (anti-TPO) foram detectados em 4/60 (7%) apresentando título mínimo de 6400 a > 25600. De forma similar, anticorpos anti-tireoglobulina (AAT) foram observados também em 4/60 (7%), porém, com títulos menores, de 100 a 25600.

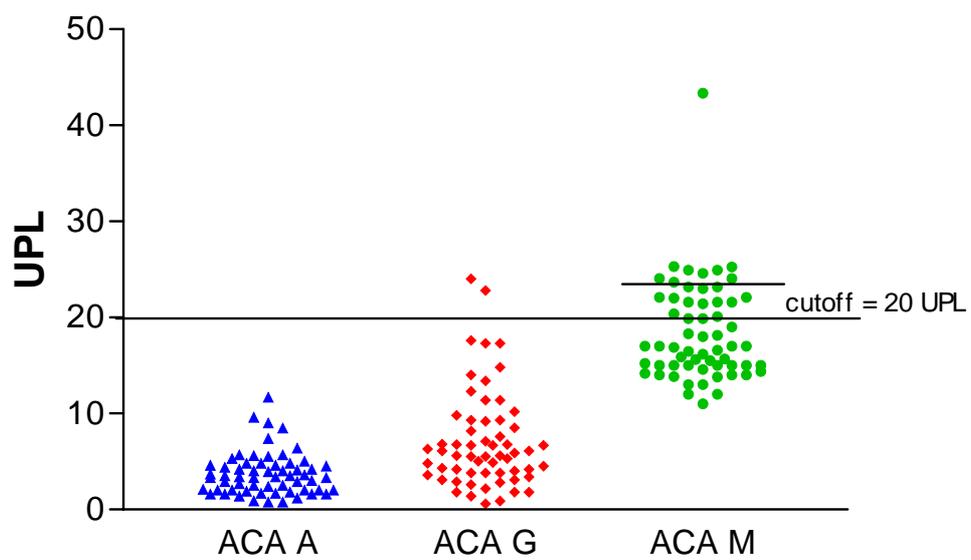


Figura 6. Títulos de anticorpos anticardiolipina apresentados de acordo com os isotipos IgA, IgG e IgM. Os anticorpos foram pesquisados por ELISA indireto, sendo estabelecido um cutoff = 20 UPL/mL

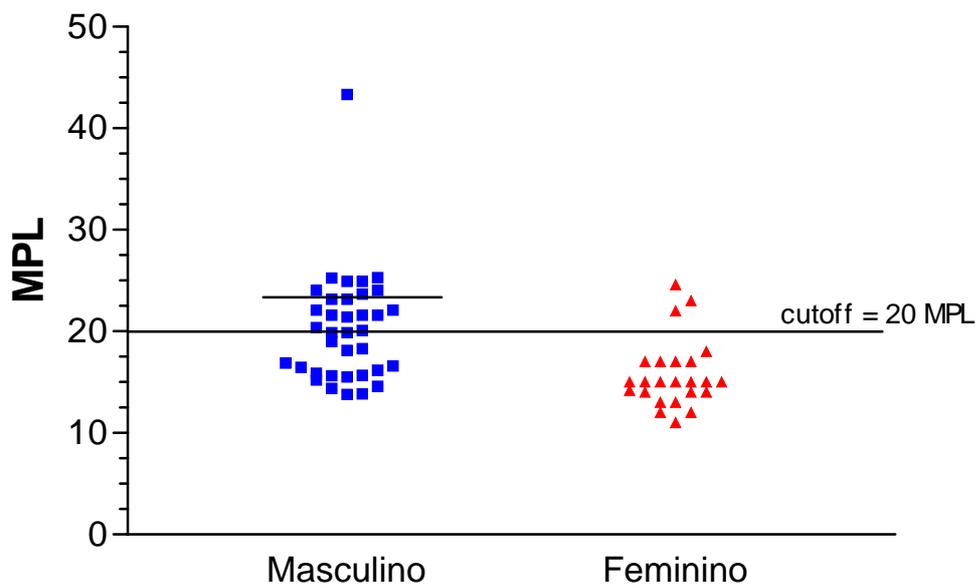


Figura 7. Títulos de ACA IgM em pacientes distribuídos conforme o sexo, obtidos através de teste de ELISA indireto, usando como cutoff 20 MPL. Observa-se uma diferença entre a freqüência (Teste exato de Fisher, $P = 0,005$) e também entre os títulos (Teste U de Mann-Whitney, $P=0,0002$). A reta horizontal na população masculina corresponde a mediana dos títulos de soros positivos.

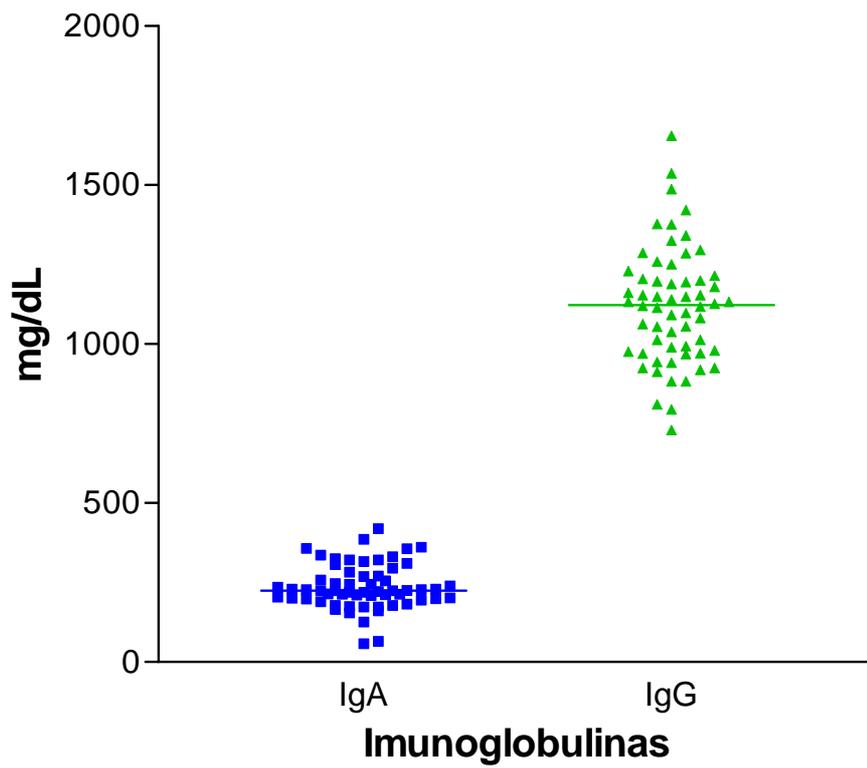


Figura 8. Níveis de Imunoglobulinas IgA e IgG em portadores de hepatite C , determinados por imunoturbidimetria. As barras correspondem à mediana.

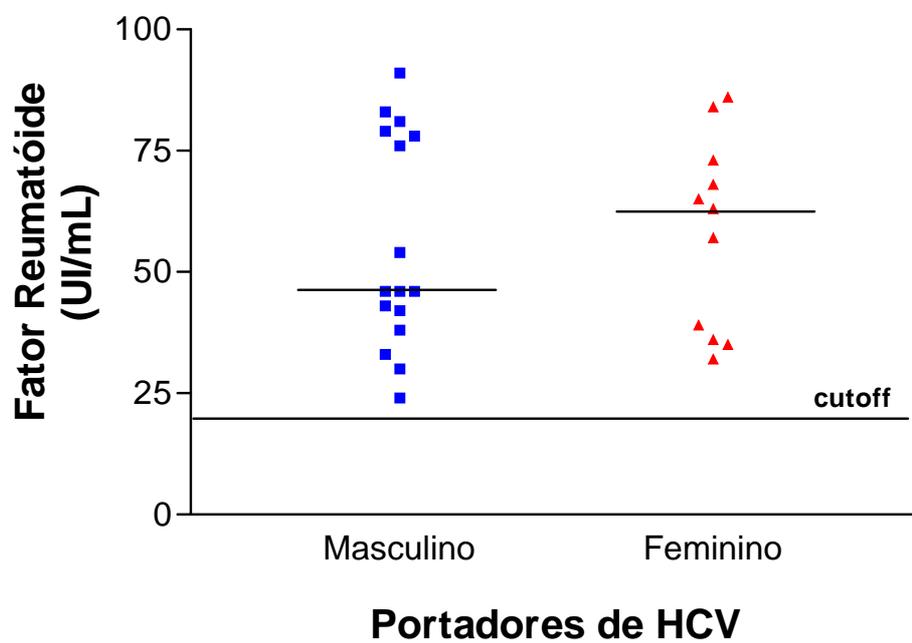


Figura 9. Níveis séricos de fator reumatóide em portadores de hepatite C, distribuídos conforme o sexo e determinados por imunoturbidimetria, n=27/60 (47%).

6. Discussão

A hepatite viral C é uma doença caracterizada principalmente por uma infecção crônica persistente. Entre os diferentes aspectos imunológicos presentes na HVC podem ser citados: a resposta imune específica de anticorpo contra o vírus, a qual possibilita o diagnóstico sorológico da infecção, e a resposta auto-imune dissociada de doença clínica, revelada pela produção de vários marcadores laboratoriais de doenças reumáticas, tireoidites auto-ímmunes, hepatites auto-ímmunes ou síndromes diversas mediadas imunologicamente, como crioglobulinemias, anticorpos antifosfolípidos ou vasculites.

As crioglobulinemias são as mais freqüentes manifestações clínicas encontradas em pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus C, com uma prevalência que varia de 21 a 59% independente da origem étnica ²⁴. Neste estudo, a presença de crioglobulinas foi observada em 69% dos pacientes. Os níveis de ALT associados nos pacientes com crioglobulinemia encontraram-se normais ou pouco alterados, concordando com observações recentes de que os pacientes com vasculite crioglobulinêmica, freqüentemente apresentam dano hepático mínimo e níveis de aminotransferases levemente aumentados ou dentro dos valores de referência ³⁴.

Títulos de fator reumatóide acima do valor de referência foram observados com maior freqüência nos pacientes com crioglobulinemia, concordando com a presença deste auto-anticorpo nos crioprecipitados. Os casos de crioglobulinemia onde não foi possível a detecção sérica do FR poderiam ser explicados pela possibilidade de complexos ímmunes circulantes destes auto-anticorpos e/ou o seqüestro destas estruturas ímmunes em órgãos e tecidos. A ausência de artrite reumatóide nos pacientes soropositivos para FR, documentada pelos dados clínicos disponíveis, e inclusive confirmada com a ausência de reatividade sorológica para anticorpos anti-CCP, demonstram que a produção de FR pode estar associada com uma estimulação de linfócitos B CD5⁺ durante a infecção crônica. Estudos recentes demonstram que ocorre um aumento no número destas células e na expressão do CD81 em pacientes portadores do VHC, o que poderia estar associado tanto com a produção de fator reumatóide como de crioglobulinas.

O conjunto destes resultados envolvendo FR e crioglobulinemia concordam com relatos prévios, alguns inclusive mostrando a ausência de reatividade para

anticorpos anti-CCP e sinais clínicos de artrite reumatóide em portadores crônicos da HVC ^{18,22,30}.

Anticorpos antinucleares IgG foram observados em 30% dos pacientes, e diferentemente do que é observado nas doenças reumáticas sistêmicas como o SLE, ocorreu uma maior soropositividade para este auto-anticorpo em pacientes do sexo masculino, embora não existissem diferenças significativas entre as freqüências observadas nos dois sexos, di4j1an do dosdvados ncoentvados es

síndrome de anticorpos antifosfolípidas, discordando de relatos, nos quais foi observada uma maior frequência de ACA IgG durante HVC, inclusive acompanhada de hipergamaglobulinemia ³⁵.

Anticorpos ACA foram descritos inicialmente associados com LES e algumas doenças infecciosas como sífilis e leishmaniose visceral. Porém, os mecanismos pelos quais são produzidos e seu significado clínico em pacientes com doenças hepáticas ainda são desconhecidos. Contudo, pacientes com desordens auto-imunes diferentes do LES, podem ser ACA positivos sem associação com trombose ou perda fetal ¹⁷.

Anticorpos antimúsculo liso (SMA), anti-LKM-1, ANCA-c e ANCA-p foram observados em frequência inferior àquela descrita em pacientes portadores de hepatites auto-imune, subtipos 1 e 2 ⁴⁴. Adicionalmente, não existiu nenhuma associação entre a presença de fibrose e aumento nos níveis de IgG e IgA nos pacientes estudados, diferentemente do que foi previamente reportado ⁴².

Auto-anticorpos antitireóide (a-TPO e/ou antitireoglobulina) foram de baixa frequência e dentro dos limites observados na população geral para estes auto-anticorpos, não fornecendo, portanto, suporte para uma associação entre VHC crônica e doença auto-imune da tireóide.

Os resultados apresentados neste estudo mostram que a infecção crônica pelo vírus C estimula a produção de auto-anticorpos, independentemente das condições ambientais e da população avaliada. Por outro lado, excetuando a relação entre crioglobulinemia mista e o achado nos pacientes de sintomas e sinais causados pela sua presença no organismo, no presente estudo não foram encontradas evidências de doenças auto-imunes que permitam associações diretas com a infecção persistente pelo vírus hepatotrópico C. Contudo, os dados aqui apresentados, obtidos na população local, são relevantes, devido aos relatos de que as terapias antivirais utilizadas para tratamento da infecção pelo vírus C geralmente estão associadas com o desenvolvimento de manifestações auto-imunes, e que o tratamento de pacientes que já apresentam tais manifestações é muito mais complexo.

Assim, a determinação da frequência destes auto-anticorpos, na população atendida nos ambulatórios de Hepatite na Cidade de Salvador, possibilitou definir

qualidade de vida dos mesmos, além de proporcionar protocolos mais adequados de tratamento aos portadores de hepatite viral C crônica no País.

7. Conclusões

1. Crioglobulinemia mista pode ser detectada nos pacientes baianos portadores de Hepatite viral C crônica com frequências semelhantes às aquelas descritas em estudos populacionais de diferentes etnias, associada ou não a sintomas clínicos.
2. Auto-anticorpos ANA, SMA podem ser detectados em pacientes com Hepatite viral C crônica independente de manifestações clínicas de auto-imunidade.
3. Anticorpos anti-LKM1 não são produzidos durante a HVC crônica constituindo-se seu achado uma forte indicação de hepatite auto-imune na população local.
4. O achado de fator reumatóide e crioglobulinemia em pacientes de serviços reumatológicos deve servir de orientação para uma investigação clínica e sorológica de hepatite viral C crônica.
5. A detecção de anticorpos anticardiolipina do isotipo IgM durante a investigação de fenômenos trombóticos deve ser avaliada à luz de sorologia negativa para hepatite C.
6. A prevalência de tireoidites auto-ímmunes, laboratorialmente documentadas, em pacientes portadores de HVC é semelhante àquela observada na população geral.

8. Referências Bibliográficas

1. Adinolfi, L.E. *et al.* **Accelerates the progresión of the liver damage of chronic hepatitis C patients and correlatos with specific VHC genotype and visceral obesity.** *Hepatology*, 2001, 33:1358-64.
2. Ajacio BM Brandão & Sandra Costa Fuchs. **Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study.** *BMC Gastroenterology* 2002, 2:18.
3. Arbuckle, M.R. *et al.* **Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic Lupus erithematosus.** *Scandinavian Journal of Immunology*, 2001, 54:211-219.
4. Booth, J.C.L & Thomas, H.C. **Pathogenesis of Chronic Hepatitis C and Associated Clinical Manifestations.** *Baillière`s Clinical Gastroenterology* Vol. 10, nº2, July 1996.
5. Cervera, R. **Systemic lupus erithematosus in Europe at the Change of the Millenium: Lesson from the “Euro-Lupus Project CT”.** *Autoimmunity Reviews*, 2005.
6. Christen, U. & von Herrath, M. **Initiaton of autoimmunity.** *Current Opinion in Immunology*, 2004, 16: 759-767.
7. Colin W Shepard, Lyn Finelli, Miriam J Alter. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet Infectious Disease* 2005, 5: 558–67.
8. Conte VP. **Hepatite crônica por vírus C.** Parte 1. Considerações gerais. V. 37 - no. 3 - jul./set. 2000 *Arq Gastroenterologia*. p. 187 - 194
9. Cotter J (Coord.). **Hepatites Viricas.** In: Augusto, F. & Lobato, C. (Orgs.). *Hepatite C.* Printer Portuguesa 2003. p. 99 -130.
10. Cotter J (Coord.). **Hepatites Viricas.** In: Freitas, J. (Org.). *Hepatites Víricas Perspectiva Histórica.* Printer Portuguesa 2003. p. 15 -41.
11. Cribier B. *et al.* **In vitro infection of peripheral blood mononuclear cells by hepatitis C virus.** *Journal of General Virology*, 1995, 76:2485-2491.
12. Daniel Favre, D & Muellhaupt, B. **Potential Cellular Receptors Involved in Hepatitis C Virus entry into Cells.** *Lipids in Health and Disease* 2005, 4:9
13. Esdaile, J.M. **How to manage patients with Lupus nephritis.** *Best Praticce & Research Clinical in Rheumatology*, 2002, 16:195-210.

14. Ferri *et al.* . **Mixed Cryoglobulinemia: Demographic, Clinical, and Serologic Features and Survival in 231 Patients.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Vol.33, Nº 6, June 2004:pp 355-374.
15. Focaccia R. *et al.* **Demographic and Anthropometrical Analysis and Genotype Distribution of Chronic Hepatitis C Patients Treated in Public and Private Reference Centers in Brazil.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2004, 8(5):348-355.
16. Jinushi, M. *et al.* **Negative Regulation of NK Cell Activities by Inhibitory Receptor CD94/NKG2A Leads to Altered NK Cell-induced Modulation of Dendritic Cells Functions in Chronic Hepatitis C Virus Infection.** *J. Immunol.* 2002, 173: 6072-6081.
17. Mangia, A.M.D. *et al.* **Anticardiolipin antibodies in patients with liver disease.** *The American Journal of Gastroenterology*, 1999, vol.94, 10: 2983-2987.
18. Mark H. Wener, M.H. *et al.* **Absence of Antibodies to Cyclic Citrullinated Peptide in Sera of Patients With Hepatitis C Virus Infection and Cryoglobulinemia.** *Arthritis & Rheumatism*, 2004, vol. 50, 7:2305-2308.
19. McMurray, R.W. & Elbourne, K. **Hepatitis C virus infection and autoimmunity.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 1997, vol. 26, 4:689-701.
20. Mertens, j.C.C. *et al.* **Rheumatic manifestations of hepatitis C virus infection.** *Netherlands Journal of Medicine*, 1997, 51:225-227.
21. Muratori, P. *et al.* **Clinical impact of Non-Organ-Specific autoantibodies on the response to combined antiviral treatment in patients with hepatitis C.** *Clinical Infectious Diseases* , 2005, 40:501-7.
22. Nissen, M.J. *et al.* **Rheumatological manifestations of hepatitis C: incidence in a rheumatology and non-rheumatology setting and the effect of methotrexate and interferon.** *Rheumatology*, 2005, 44:1016-1020.
23. Okazaki *et al.* **Gel Diffusion Procedure for the Detection of Cryoglobulins in Serum.** *Clinical Chemistry*. 1998; 44:1559-1559.
24. Okuse, C. *et al.* **Detection, using a novel method, of a high prevalence of crioglobulinemia in persistent hepatitis C virus infection.** *Hepatology Research*, 2003, 27: 18-22.

25. Paraná, R. **Comparative Study of Hepatitis C Virus Genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003;7(6):409-417.
26. Pawlotsky, J. **Pathophysiology of Hepatitis C virus Infection and Related Liver Disease.** TRENDS in Microbiology Vol.12 No.2 February 2004
27. Piazzolla, G. *et al.* **Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and *in vitro* effects of interferon-alpha.** Journal Clinical Immunology, 2000, 20:54-61.
28. Pleister, A. & Eckels, D. D. **Cryptic infection and autoimmunity.** Autoimmunity Reviews, 2003, 2:126-132.
29. Poynard, T. *et al.* **Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa-2b and ribavirina on steatosis in patients infected with hepatitis C.** Hepatology, 2003, 38: 75-85.
30. Ramos-Casals, M. & Font, J. **Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C virus infection.** Current Opinion in Rheumatology, 2005, 17:447-455.
31. Ramos-Casals, M. *et al.* **Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis C virus infection (the HISPAMEC Registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases.** Journal of Internal Medicine, 2005, 257: 549-557.
32. Rehermann, B. & Nascimbeni, M. **Immunology of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Infection.** Nature Reviews. Immunology 2005; 5: 215-229.
33. Rose, N. R (Coord.). **Manual of Clinical Laboratory Immunology.** In: Gorevic D. P & Galanakis, D. (Orgs.) Cryoglobulins, cryofibrinogenemia and Pyroglobulins 6th edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2002. p. 97-103.
34. Sansonno, D. & Dammacco, F. **Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculites: immune complex relations.** Lancet Infectious Diseases, 2005, 5:227-236.

35. Stoeberl, M.Z. *et al.* **Anticardiolipin autoantibodies in serum samples and cryoglobulins of patients with chronic hepatitis C infection.** *Rheumatology Diseases*, 2000, 59, 483-486.
36. Strassburg, C.P. *et al.* **Autoimmunity and hepatitis C.** *Autoimmunity Reviews*, 2003, 2:322-331.
37. Thimme, R. *et al.* **Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence and disease.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99: 15661-15668.
38. Thomson, B.J. & Finch, R.G. **Hepatitis C virus infection.** *Clinical Microbiology and Infection*, february 2005; n° 2, 11: 86–94
39. Treichel, U. *et al.* **Hepatitis C virus infection and autoimmunity: clinical features, diagnostic tools and therapeutical aspects.** *Med Mal Infect*, 1995, 25:1089-96.
40. Tseng, C.T. & Klimpel G. R. **Binding of the Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 to CD81 Inhibits Natural Killer Cell Functions.** *Journal Exp Med*, 2002, 195: 43-49.
41. Vento, S. & Cainelli, F. **Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis?** *Autoimmunity Reviews*, 2004, 3:61-69.
42. Watt, K. **Serum immunoglobulins predict the extent of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection.** *Journal of Viral Hepatitis*, 2004, 11, 251–256
43. Z. Ackerman, E. Ackerman, O. Paltiel. **Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review.** *Journal of Viral Hepatitis*, 2000, 7: 93±103.
44. Zachou, K., Rigopoulou, E., Dalekos, G.N. **Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease.** *Journal of Autoimmune Disease*, 2004, 1:2: 1-17.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)