

ANA TERESA RODRIGUEZ VISO

Hepatite C crônica e citocinas - estudo no soro e no fígado

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone

**São Paulo
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Dedico a todos meus pacientes, dos mais queridos aos mais ausentes, objetivo maior a que qualquer doutorado poderia ter.

Dedico este doutorado a meu marido, pelo bom humor e sorrisos diários apesar de minhas longas horas de “ausência” no computador.

Dedico à minha mãe que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial para meus maiores sonhos, como deste doutorado na USP.

Dedico a meu pai, que tanto me incentivou a estudar, desde muito pequena.

Dedico à “minha bebê”, que se movimenta intensamente o dia todo aqui dentro e se aquieta enquanto escrevo.

À/os meu/minhas querido/as e verdadeiro/as amigo/as, cuja presença física ou em pensamento fazem grande diferença em minha vida, que compartilharam de muitos momentos nestes anos todos e sem o/as quais a vida não teria o sentido que tem.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pacientes que me estimulam a cada dia a conhecer mais e pensar alternativas para o tratamento da hepatite C, a compreender sua história, conhecendo a de cada um, compartilhando de suas intimidades, angústias e esperanças. Especialmente àqueles que participaram desta pesquisa, que confiaram em minhas palavras mesmo com pouco tempo de contato.

Aos doadores de sangue, grandes “anônimos” que além do sangue doado a desconhecidos, participaram desta pesquisa.

Aos doadores de órgãos, que após sua partida contribuíram para esta pesquisa.

Agradeço o privilégio de ter tido o Professor Barone como orientador, mais uma vez, contribuindo com seu estilo para meu aprendizado nestes anos todos.

Agradeço a Professora Maria Irma, minha co-orientadora na prática, mas que por motivos “burocráticos” não teve seu nome nesta tese. Suas contribuições desde o pensar nesta pesquisa até a discussão dos resultados foram fundamentais para a existência desta.

Agradeço ao professor Gil que considero meu terceiro orientador, mas que pelas regras da pós-graduação não recebeu este título. Ele completou o “hall” de professores com seu olhar de imunologista e suas palavras que me ajudaram a simplificar a discussão dos dados.

Às colegas pesquisadoras envolvidas neste trabalho – Carla Pagliari, Carla Romano, Elaine, Roose e Soraia – pela fundamental ajuda nas reações e interpretações dos resultados. À Carla Pagliari pela revisão do texto.

Ao Dr Luiz Augusto Pereira, diretor da Central de Transplantes, por disponibilizar os prontuários dos doadores de órgãos, além de compartilhar sua sala com uma aluna desconhecida. Sem seu auxílio este doutorado não seria feito desta forma.

Ao Dr Paulo Massarolo que abriu as portas do Grupo de Transplantes do HC na ocasião de minha coleta, além de grande apoio e sugestões a esta pesquisa.

À Magali Dias, pela ajuda na formatação do texto e das inúmeras tabelas.

A todos os funcionários do Hemocentro do HC-FMUSP, pela gentileza diária durante todo o mês que oferecemos nossa pesquisa aos doadores de sangue.

A todas as funcionárias da biblioteca do CRT-DST-Aids, pela ajuda contínua nestes anos para encontrar todas as referências que precisei.

A FAPESP, financiadora deste projeto, que acreditou em nosso propósito (processo 00/14345-0).

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

INSTITUIÇÕES E PESQUISADORES PARTICIPANTES

Ambulatório de Hepatites da Divisão Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Laboratório de Investigação Médica em Hepatites por Vírus (LIM 47): Prof. Dr. Antônio Alci Barone, Dra. Norma de Paula Cavalheiro, Mestrando Carlos Eduardo de Melo.

Laboratório da Disciplina de Patologia de Doenças Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP: Profa. Dra Maria Irma Seixas Duarte, Dra. Carla Pagliari, Dra Rooseceles Araújo Brasil, Doutoranda Elaine Raniero Fernandes.

Laboratório de Investigação Médica em Imunologia (LIM 56): Prof. Dr. Gil Benard, Dra. Carla Cristina Romano, Mestranda Soraya Ogusuku.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fatores virais.....	3
1.2. Fatores do hospedeiro na hepatite C crônica.....	7
1.3. Interação hospedeiro e VHC.....	11
1.3.1. Resposta inata ao VHC.....	12
1.3.2. Resposta humoral ao VHC e estratégias de evasão do VHC da resposta imune.....	15
1.3.3. Resposta celular, citocinas e populações celulares na hepatite C.....	16
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MÉTODOS.....	28
3.1. Seleção dos casos.....	28
3.2. Seleção dos controles.....	30
3.2.1. Controles doadores de sangue.....	30
3.2.2. Controles doadores de órgãos.....	31
3.3. Exames laboratoriais.....	32

3.4. Exames de biologia molecular.....	33
3.5. Biópsias hepáticas.....	37
3.6. Reações de imuno-histoquímica.....	38
3.7. Reações de ELISA.....	45
3.8. Análise Estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Análise dos pacientes com hepatite C crônica.....	48
4.1.1. Análise da anamnese e exame físico dos casos.....	48
4.1.2. Análise dos exames laboratoriais e anátomo-patológicos dos casos.....	50
4.1.3. Análise das citocinas e populações celulares dos casos.....	54
4.1.4. Análise das citocinas e populações celulares em relação aos dados demográficos dos pacientes com hepatite c crônica.....	66
4.1.5. Análise das citocinas e populações celulares dos casos em relação às transaminases, à carga viral e aos genótipos do VHC.....	67
4.1.6. Análise das citocinas e populações celulares dos casos em relação às alterações histológicas.....	68
4.2. Análise dos controles.....	75
4.3. Análise entre casos e controles.....	77
4.4. Resumo dos resultados significantes.....	84
5. DISCUSSÃO.....	88
6. CONCLUSÕES.....	102
7. ANEXOS.....	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168

LISTA DE SIGLAS

AA	AFRO-AMERICANOS
AL	ATIVIDADE ou INFLAMAÇÃO LOBULAR ou PARENQUIMATOSA (GRAU DE)
ALT	ALANINA AMINOTRANSFERASE
AP	ATIVIDADE ou INFLAMAÇÃO PORTAL (GRAU DE)
APCS	CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO
APP	ATIVIDADE ou INFLAMAÇÃO PERI-PORTAL (GRAU DE)
AST	ASPARTATO AMINOTRANSFERASE
CA	CAUCASIANO-AMERICANOS
DP	DESVIO PADRÃO
E	ENVELOPE
F	FIBROSE (GRAU DE)
FA	FOSFATASE ALCALINA
FAN	FATOR ANTI NUCLEAR
FAPESP	FUNDAÇÃO DE AUXÍLIO À PESQUISA DO ESTADO DE SP
FMUSP	FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
GGT	GAMAGLUTAMIL TRANSPEPTIDASE
HC	HOSPITAL DAS CLÍNICAS
IBGE	INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA
IHQ	IMUNO-HISTOQUÍMICA
IL	INTERLEUCINA(S)

IFN	INTERFERON
INOS	ISOFORMA DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE
JAK	JANUS QUINASE INTRACELULAR
LB	LINFÓCITO B
LDL	LIPOPROTEINA DE BAIXA DENSIDADE
LIM	LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA
LSN	LIMITE SUPERIOR DA NORMALIDADE
LT CD4+	LINFÓCITOS T AUXILIARES (T HELPER CELLS)
LT	LINFÓCITO (S) T
LTC	LINFÓCITO (S) T CITOTÓXICOS ou LTCD8+
MHC	COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE
NK	“NATURAL KILLER” (CÉLULAS MATADORAS NATURAIS)
NO	OXIDO NÍTRICO
NOS	OXIDO NÍTRICO SINTETASE
NS	NÃO ESTRUTURAL (S)
OAS	OLIGOADENILATO SINTETASE
PBMC	CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO
PBS	(PHOSPHATE BUFFER SALINE) SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA EM FOSFATO
PCR	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
PKR	PROTEÍNA QUINASE
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
SABC	CONJUGADO ESTREPTAVIDINA-BIOTINA
TCR	RECEPTOR DE CÉLULAS T
TMA	AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO
TNF	FATOR DE NECROSE TUMORAL

USG	ULTRA-SONOGRAFIA DE ABDOME TOTAL
USP	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
UTR	REGIÕES TERMINAIS ALTAMENTE CONSERVADAS E NÃO CODIFICADORAS
VHC	VÍRUS DA HEPATITE C
VLDL	LIPOPROTEINAS DE MUITO BAIXA DENSIDADE
VR	VALOR DE REFERÊNCIA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do genoma do VHC.....	3
Figura 2	Esquema do retículo acoplado à ocular do microscópio óptico e utilizado nas contagens das células marcadas na imuno-histoquímica.....	44
Figura 3	Alterações histológicas dos pacientes com hepatite C crônica ao microscópio óptico.....	53
Figura 4	Imuno-histoquímica de citocinas marcadas com coloração castanha (flechas) em pacientes com hepatite C crônica (400x).....	61
Figura 5	Imuno-histoquímica de populações celulares marcadas com coloração castanha (flechas) em pacientes com hepatite C crônica.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica das citocinas em material parafinado.....	39
Tabela 2	Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica das populações celulares em material parafinado.....	42
Tabela 3	Concentração das citocinas por ELISA em picogramas/mL dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	55
Tabela 4	Densidade das citocinas por imuno-histoquímica no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	57
Tabela 5	Densidade das populações celulares no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	59
Tabela 6	Correlação entre as populações celulares e citocinas no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	64
Tabela 7	Correlação entre a expressão das populações celulares no fígado e as alterações histológicas dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	69
Tabela 8	Correlação entre citocinas no fígado e as alterações histológicas dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	71
Tabela 9	Correlação entre citocinas no sangue e alterações histológicas dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	73
Tabela 10	Comparação entre as populações celulares dos 51 pacientes com hepatite C crônica e os 33 doadores de órgãos.....	79
Tabela 11	Comparação entre as citocinas no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica e os 33 doadores de órgãos.....	81
Tabela 12	Comparação entre as citocinas no sangue dos 51 pacientes com hepatite C crônica e os 51 doadores de sangue.....	83

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Termo de Consentimento dos Casos.....	105
Anexo 2	Ficha de atendimento de doadores de sangue.....	107
Anexo 3	Termo de Consentimento dos doadores de sangue.....	108
Anexo 4	Ficha de levantamento dos doadores de órgãos.....	110
Anexo 5	Tabela de dados demográficos, fatores de risco para aquisição do VHC e tempo de infecção dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	111
Anexo 6	Tabela de genótipos do VHC, carga viral do VHC, transaminases e histologia dos 51 pacientes com VHC crônica.....	113
Anexo 7	Tabela das alterações nos hepatócitos dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	115
Anexo 8	Tabela das alterações nos sinusóides hepáticos dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	117
Anexo 9	Tabela das alterações do espaço-portal dos 51 casos com hepatite C crônica.....	119
Anexo 10	Tabela de correlação entre a expressão das populações celulares no fígado e a idade dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	121
Anexo 11	Tabela de correlação entre os níveis das citocinas no fígado e no sangue e a idade dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	122
Anexo 12	Tabela de correlação entre o tempo de infecção pelo VHC e as populações celulares no fígado.....	123
Anexo 13	Tabela de correlação entre o tempo de infecção pelo VHC e as citocinas no fígado e no sangue.....	124
Anexo 14	Tabela de comparação entre as populações celulares no fígado e o gênero dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	125
Anexo 15	Tabela de comparação entre as citocinas no fígado e o gênero dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	126

Anexo 16	Tabela de comparação entre os níveis de citocinas no sangue e o gênero dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	127
Anexo 17	Tabela de comparação entre as populações celulares no fígado e a “raça” dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	128
Anexo 18	Tabela de comparação entre as citocinas no fígado e a “raça” dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	129
Anexo 19	Tabela de comparação entre as citocinas no sangue e a “raça” dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	130
Anexo 20	Tabela de comparação dos graus de fibrose entre homens e mulheres com hepatite C crônica.....	131
Anexo 21	Tabela de comparação da fibrose e a raça dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	132
Anexo 22	Tabela de correlação das populações celulares com as trasaminases e a carga viral do VHC dos pacientes com hepatite C crônica.....	133
Anexo 23	Tabela de correlação das citocinas no fígado com as trasaminases e a carga viral do VHC dos pacientes com hepatite C crônica.....	134
Anexo 24	Tabela de correlação das citocinas no sangue com as transaminases e a carga viral do VHC dos pacientes com hepatite C crônica.....	135
Anexo 25	Tabela de comparação entre as populações celulares no fígado e os genótipos 1 e “não 1” dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	136
Anexo 26	Tabela de comparação entre as citocinas no fígado e os genótipos 1 e “não 1” dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	137
Anexo 27	Tabela de comparação entre citocinas no sangue e os genótipos 1 e “não 1” dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	138
Anexo 28	Tabela de comparação entre as populações celulares e a presença de folículo linfóide em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	139
Anexo 29	Tabela de comparação entre as citocinas e a presença de folículo linfóide em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	140
Anexo 30	Tabela de comparação entre citocinas no sangue e a presença de folículo linfóide em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	141

Anexo 31	Tabela de comparação entre populações celulares e inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	142
Anexo 32	Tabela de comparação entre citocinas e inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	143
Anexo 33	Tabela de comparação entre citocinas no sangue e inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	144
Anexo 34	Tabela de comparação entre populações celulares e proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	145
Anexo 35	Tabela de comparação entre citocinas e proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	146
Anexo 36	Tabela de comparação entre citocinas no sangue e proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	147
Anexo 37	Tabela de comparação entre as populações celulares e a presença de edema e esteatose em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	148
Anexo 38	Tabela de comparação entre citocinas no fígado e no sangue com a presença de edema no espaço portal de biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	149
Anexo 39	Tabela de correlação entre citocinas no fígado e sangue a presença de esteatose em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica.....	150
Anexo 40	Tabela de comparação entre os genótipos 1 e “não 1” e as alterações da biópsia hepática segundo a classificação de Ishak dos 51 pacientes com hepatite C crônica.....	151
Anexo 41	Tabela de comparação entre a expressão de populações celulares e pacientes com fibrose avançada (F5/F6) e sem fibrose avançada (F1-F4).....	152
Anexo 42	Tabela de comparação entre a expressão de citocinas e pacientes com fibrose avançada (F5/F6) e sem fibrose avançada (F1-F4).....	153
Anexo 43	Tabela de comparação entre as citocinas no sangue e pacientes com fibrose avançada (F5/F6) e sem fibrose avançada (F1-F4).....	154

Anexo 44	Tabela de dados demográficos dos 51 doadores de sangue e IMC	155
Anexo 45	Tabela de dados demográficos e evolução durante internação na UTI dos 33 doadores de órgãos.....	157
Anexo 46	Tabela de anátomo patológico dos 33 doadores de órgãos.....	159
Anexo 47	Tabela de densidade das populações celulares no fígado dos 33 doadores de órgãos.....	161
Anexo 48	Tabela de densidade das citocinas no fígado dos 33 doadores de órgãos.....	163
Anexo 49	Tabela de concentração das citocinas no sangue dos 51 doadores de sangue.....	165

RESUMO

Rodriguez-Viso, AT. *Hepatite C e citocinas - estudo no soro e no fígado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 190p.

INTRODUÇÃO: A patogênese da hepatite C crônica resulta principalmente de mecanismos imuno-mediados com a atuação central das citocinas tanto na lesão hepatocelular como na eliminação e na persistência do vírus da hepatite C (VHC). **OBJETIVOS:** Investigar a resposta imune adaptativa da hepatite C crônica através da expressão das células inflamatórias no tecido hepático e de citocinas no tecido hepático e no sangue, relacionando-os com dados demográficos, laboratoriais e histológicos. **MÉTODOS:** Pacientes com hepatite C crônica, virgens de tratamento foram selecionados no ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas. Foram utilizados dois grupos controles para comparação: de doadores de sangue saudáveis e fragmentos de biópsia hepática de doadores de órgãos. Todos os controles selecionados não tinham evidência de hepatopatia. As seguintes citocinas foram analisadas no sangue pelo método quantitativo de ELISA no sangue dos casos e dos doadores de sangue: interleucina (IL) 1, IL2, IL4, IL6, IL 10, interferon (IFN) γ , fator de necrose tumoral (TNF) α e fator de crescimento e transformação (TGF) β . As mesmas citocinas e as populações celulares CD4+, CD8+, CD45RO+, CD57+, CD68+ e S100 foram quantificadas através de método imuno-histoquímico no espaço portal e no lobo hepático dos casos e dos doadores de fígado. Esses dados foram posteriormente associados às alterações histológicas pela classificação de Ishak. **RESULTADOS:** Foram selecionados 51 pacientes com hepatite C crônica, 58% do gênero masculino; 66,6% brancos e média de idade de 39 anos (variando de 20 a 59). Foram selecionados 33 doadores de órgãos e 51 doadores de sangue. Comparando com os doadores de sangue, os casos apresentaram maiores níveis séricos de IL2 (p <0,001), IL10 (p <0,001), INF γ (p 0,018) e TGF β (p <0,001). Na análise das biópsias hepáticas, os casos apresentaram maior expressão de LTCD4+ portais (p <0,001), LTCD8+ portais (p <0,001), IL4 lobular (p 0,001), IL10 lobular (p 0,007), INF γ lobular (p <0,001), TNF α portal (p <0,001) e lobular (p <0,001), TGF β portal (p <0,001) e lobular (p <0,001) do que os doadores de órgãos. Entre os casos, houve correlações significantes diretas entre os seguintes marcadores e as alterações histológicas: CD4+ portal com a atividade peri portal (p 0,004); CD4+ lobular com a atividade lobular (p 0,017); TGF β lobular com a atividade lobular (p 0,016); IL1 β portal com atividade peri portal (p 0,009) e IL8 do sangue e fibrose (p 0,036). As populações celulares foram correlacionadas às citocinas no fígado dos casos e houve significância direta entre: CD4+ portal e TNF α portal (p 0,004); CD8+ portal e TGF β portal (p 0,030); CD57+ portal e IL10 portal (p 0,008); CD57+ lobular com TGF β lobular (p 0,040) e IL2 lobular (p 0,048); S100 portal e IL10 portal (p 0,014). Não houve correlação significativa entre as citocinas do fígado e as citocinas do sangue nos pacientes com hepatite C crônica. A carga viral do VHC teve correlação indireta com LTCD8+ lobulares (p 0,020), IL2 portal (p 0,049) e lobular

(p 0.004). DISCUSSÃO: O comando da resposta imune nesta casuística foi orquestrado pelos linfócitos T CD4+ e CD8+, com predomínio da resposta Th1 e o principal local dos eventos foi o espaço portal. A compartimentalização da resposta imune ao VHC foi evidenciada pela ausência de correlações significantes entre as citocinas do tecido hepático e do sangue nos pacientes com hepatite C crônica.

Descritores: hepatite C crônica, citocinas, linfócitos T, imunoistoquímica, hepatite C crônica/ fisiopatologia

SUMMARY

Rodriguez-Viso, AT. *Hepatitis C and cytokines - study in blood and liver* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 190p.

BACKGROUND: The pathogenesis of chronic hepatitis C results mainly of immunological mechanisms with cytokines playing a central role in hepatocellular necrosis and in the immunopathogenic process involved in viral clearance and persistence. **AIM:** To investigate immune response to hepatitis C virus (HCV) through expression of inflammatory cells in liver and cytokines in liver and serum, and assess the relationship with demographic, laboratorial and histological features. **METHODS:** Naïve patients with chronic hepatitis C were selected from Infectious Diseases Division at a University Hospital. Two sets of controls were selected for comparison: healthy blood donors and liver biopsy specimens from liver donors. All controls had no evidence of hepatic disease. The following cytokines were analyzed by quantitative ELISA method in serum of cases and healthy blood donor controls: interleukin (IL) 1, IL2, IL4, IL6, IL10, interferon (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , and transforming growth factor (TGF) β . The same cytokines and cellular populations of CD4+ T lymphocytes (TL), CD8+ TL, CD45+, CD57+, CD68+ and S100 were quantified by immunohistochemistry in acinar and portal spaces in liver biopsies of cases and liver donor controls. These data were additionally associated to histological parameters by Ishak Score. **RESULTS:** Were selected 51 patients with chronic hepatitis C, 58% were males; 66,6% white and the median age was 39 (range 20 to 59) years. Were selected 33 liver donors and 51 blood donors. Compared with healthy blood donor controls, cases showed higher levels of IL2 (p <0.001), IL10 (p <0.001), IFN γ (p 0.018) and TGF β (p <0.001). In liver biopsy analyses, cases showed greater expression of the following cell populations and cytokines: portal CD4+ TL (p <0.001), portal CD8+ (p <0.001), acinar IL4 (p 0.001), acinar IL10 (p 0.007), acinar IFN γ (p <0.001), portal TNF α (p <0.001), acinar TNF α (p <0.001), portal TGF β (p <0.001) and acinar TGF β (p <0.001). Among cases, significant positive correlations were found between the following markers and Ishak graded patterns: portal CD4+TL and periportal inflammation (p 0.004); acinar CD4+ and focal inflammation (p 0.017); acinar TGF β and focal inflammation (p 0.016); portal IL1 β and periportal inflammation (p 0.009) and IL8 in blood and fibrosis (p 0.036). The cellular populations were correlated to cytokines in liver of hepatitis C patients and there was significant positive correlation between: portal CD4+ and portal TNF α (p 0.004); portal CD8+ TL and portal TGF β (p 0,030); portal CD57+ and portal IL10 (p 0,008); acinar CD57+ and acinar TGF β (p 0,040) and acinar IL2 (p 0,048); portal S100 and portal IL10 (p 0,014). No significant correlation was found between liver and serum cytokines in cases. Hepatitis C viremia was inversely correlated to acinar CD8+ TL (p 0.020); portal (p 0.049) and acinar IL2 (p 0.004). **DISCUSSION:** The command of the immune response in this casuistic was orchestrated by CD4+ TL and CD8+ T lymphocytes, with predominance of Th1 answer, and the main site where of the events occurred was the portal space. The compartmentalization of immune

response to HCV was evidenced by the absence of significant correlations between cytokines in hepatic tissue and blood from patients with chronic hepatitis C.

Descriptors: chronic hepatitis C, cytokines, T-lymphocytes, immunohistochemistry, chronic hepatitis C/ physiopathology

1. INTRODUÇÃO

A hepatite crônica por vírus C constitui um problema de Saúde Pública, com cerca de 170 milhões de pessoas infectadas no mundo, sendo a principal causa de transplante hepático nos países desenvolvidos (Marcellin et al., 1999; Cohen, 1999). No Brasil, estima-se que 2,5 a 4,9% da população esteja infectada pelo VHC (Cohen, 1999) e na cidade de São Paulo por volta de 1,42% da população segundo Focaccia et al. (1998), totalizando 155 mil pessoas infectadas por esse vírus de acordo com as estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2005).

Aproximadamente 15% dos indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) o eliminam espontaneamente, 25% têm doença assintomática com aminotransferases persistentemente normais e lesões histológicas leves, enquanto 60% evoluem para doença crônica progressiva (Marcellin et al., 1999). Cerca de 20% dos pacientes com hepatite C crônica evoluem para cirrose num período que pode variar de 10, 20 (Marcellin et al., 1999), ou 30 anos (Poynard et al., 1997). Além disso, podem evoluir para óbito em decorrência das complicações da cirrose ou hepatocarcinoma (Marcellin et al., 1999).

Até o momento, não há testes séricos que predigam a taxa de progressão da fibrose em cada paciente, mas níveis séricos de ALT foram associados com maiores riscos de progressão da fibrose (Marcelin et al., 2002). A alteração histológica, especialmente o grau de fibrose, é o maior preditor de progressão na hepatite C crônica (Chitturi e George, 2000; Alberti et al., 2004) e a biópsia hepática continua

sendo a melhor forma de avaliar o grau de lesão da doença (Marcelin et al., 2002; Friedman, 2004). À histologia, a hepatite crônica é caracterizada por inflamação e necrose de hepatócitos, acompanhadas ou não por alterações estruturais e agressão à placa limitante e alterações do lobo hepático (Ishak, 2000). A hepatite de interface (que já foi chamada de necrose em saca-bocado ou hepatite periportal) inicialmente destrói a placa limitante periportal e evolui com contínua erosão do parênquima hepático e a partir daí segue-se fibrose regional que leva a importantes modificações estruturais, podendo culminar com o desenvolvimento de cirrose (Ishak, 2000). Os marcadores histológicos da hepatite C são os agregados linfóides nos espaços porta com ou sem centros germinativos, as lesões de ductos biliares “tipo hepatítico” com alterações degenerativas ou de proliferação dos mesmos, a esteatose macrofotocitica e a linfocitose sinusal (Ishak, 2000).

A progressão da hepatite C crônica não é linear em todos os pacientes e a histologia hepática pode permanecer relativamente estável com lesões mínimas não evolutivas em alguns indivíduos (Scheuer, 1994) ou progredir rapidamente para cirrose em outros (Chisari, 1997). Muitos estudos têm analisado variáveis na determinação da gravidade das lesões histológicas, mas o impacto desses fatores na evolução da hepatite C crônica ainda está em discussão (Chitturi e George, 2000).

A história natural da hepatite C é influenciada pela ação de três pilares principais:

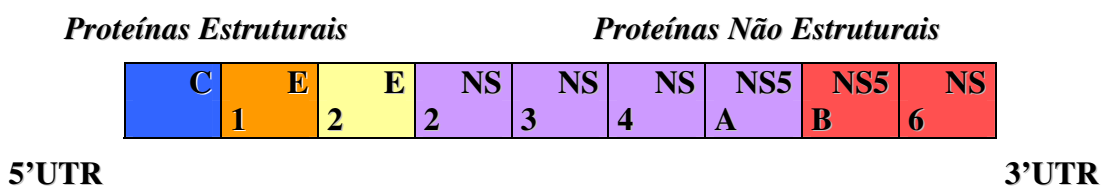
- a) os fatores virais, como a cinética do VHC e lesão citopática que ele causa;
- b) os fatores do hospedeiro, como os fatores intrínsecos ao hospedeiro e a exposição do mesmo a fatores externos;

c) a interação entre hospedeiro e o VHC.

1.1. Fatores virais

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus pequeno com aproximadamente 50 nm, envelopado que pertence à família *Flaviviridae* (Major e Feinstone, 1997). Seu genoma é constituído por uma molécula de RNA que contém aproximadamente 9.500 nucleotídeos que codificam as informações para a replicação viral (McGarvey et al., 1998). A cadeia de RNA é composta por duas regiões terminais altamente conservadas e não codificadoras (UTR) 5' e 3' e entre estas, uma única fase de leitura aberta (ORF do inglês “open reading frame”) que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada no pólo N-terminal em três proteínas estruturais, o nucleocapsídeo (core), envelope um (E1) e envelope dois (E2) que estão envolvidas na organização arquitetural do VHC. No pólo carboxi-terminal a poliproteína é clivada em seis proteínas não-estruturais, NS2, NS3, NS4 (NS4A e NS4B), NS5 (NS5A e NS5B) e NS6, responsáveis pelo ciclo biológico do vírus (Figura 1) (McGarvey et al., 1998).

Figura 1 - Representação do genoma do VHC



Os fatores virais relacionados à progressão da doença crônica pelo VHC são (Gremion e Cerny, 2005):

- ✓ o inóculo da infecção pelo VHC;
- ✓ citopatogenicidade direta do VHC;
- ✓ genótipo do VHC;
- ✓ esteatose induzida pelo VHC;
- ✓ síndrome colestásica induzida pelo VHC;
- ✓ hepatite aguda lobular induzida pelo VHC;
- ✓ apoptose induzida pelo VHC.

O VHC entra no hospedeiro suscetível, penetra na corrente sanguínea, segue ao fígado por tropismo, passando por diversos tecidos em que pode infectar e se replicar (Gowans, 2000). Sabe-se que o VHC não é apenas hepatotrópico, mas é também um vírus linfotrópico, capaz de replicar *in vitro* em linhagem de células T humanas (Koziel et al., 1992), já que seqüências genômicas do vírus foram encontradas em populações de células B e T periféricas de pacientes com hepatite C crônica (Mac Donald et al., 2002). O VHC pode infectar diretamente o tecido linfático e sua estimulação levar ao desenvolvimento de linfomas de células B com malignidade (Ferri et al., 1994). Há evidências de que o VHC também se replica no pâncreas, na tireóide, glândulas adrenais, baço e medula óssea (Gowans, 2000). A infecção do VHC em sítios extra-hepáticos pode favorecer o aparecimento de variantes do VHC (Maggi et al., 1997; Giannini e Bréchet, 2003) e diminuir seu reconhecimento pelo sistema imune do indivíduo.

Para a entrada na célula hospedeira, a proteína do envelope E2 do VHC reconhece e se liga à molécula de superfície CD81 (molécula tetraplasmina) presente na superfície dos hepatócitos e linfócitos (Pileri et al., 1998). As partículas circulantes do VHC estão associadas a lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e baixa densidade (LDL), fato que leva a discussões na literatura de que o receptor LDL também poderia ser um receptor viral (Giannini e Bréchet, 2003). Além da molécula de superfície E2, a proteína E1 do envelope tem sido implicada na participação da entrada do VHC na célula alvo (Polyak, 2003). Após a interação do envelope do vírus com a membrana da célula do hospedeiro, o VHC entra na célula por endocitose e no citoplasma sofre tradução do RNA mensageiro e processamento das poliproteínas; depois disto, seu RNA se replica, os novos “RNA”s virais são empacotados e transportados até a superfície da célula hospedeira para saírem e completar novo ciclo (Lindenbach e Rice, 2005).

O VHC apresenta alta taxa de replicação, aproximadamente 1×10^{12} virions ao dia, além de alta taxa de mutação, estimada em 10^{-3} substituições de nucleotídeos ao ano (Giannini e Bréchet, 2003), o que leva a grande heterogeneidade de apresentações, denominadas quasiespécies (Major et al., 1997). O inóculo da infecção pelo VHC ou a alta taxa de replicação viral pode ser um dos responsáveis pela persistência do vírus quando ela excede a resposta do hospedeiro (Cerny e Chisari 1999; Gremion e Cerny, 2005). Há controvérsias se a carga viral do VHC está associada a lesões mais intensas, já que alguns demonstraram que sim (Haruna et al., 1993), enquanto outros demonstraram o contrário, ou seja, que níveis baixos de cargas virais de VHC se relacionaram a variados graus de lesões histológicas (Brillanti et al, 1993; Poynard et al., 1997).

A seleção e a adaptação do hospedeiro às quasiespécies deu origem a distintos genótipos (Simmonds et al., 1993) cuja classificação baseia-se na similaridade da sequência de nucleotídeos, sendo que similaridade menor do que 67 a 69% caracteriza um novo tipo viral e similaridade entre 75 e 80% dá origem a um subtipo (Simmonds et al., 2005). Na classificação atual há 6 tipos de genótipos numerados de 1 a 6, com os subtipos 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 2k, 3a, 3b, 3k, 4a, 5a, 6a, 6b, 6d, 6g, 6h e 6k (Simmonds et al., 2005) que apresentam diferentes prevalências no mundo (Zein, 2000). No Brasil, há predomínio do genótipo 1, seguido pelo 3 e 2 respectivamente (Bassit et al., 1995).

Estudos sugeriam que determinados genótipos, como o 1, poderiam ser mais citopáticos (Dusheiko et al., 1994) ou induzir a maior progressão da doença que outros (Kobayashi et al., 1996), além deste genótipo ter maior associação com cronificação do VHC (Amoroso et al., 1998). O genótipo 1b foi associado a maior risco de cirrose e hepatocarcinoma que os genótipos 2 e 3 numa pesquisa do norte da Itália (Bellentani et al., 1999). Por outro lado, Poynard et al. (1997) afirmaram que o genótipo e a carga viral do VHC não influenciam a progressão da doença, mas a resposta ao tratamento da hepatite C crônica (Marcellin et al., 1999).

Estudos apontam que o core e o NS5A do VHC estão presentes na superfície das vesículas de lipídios e podem alterar seu metabolismo com o aumento de depósito de gordura nas células hepáticas, induzindo a esteatose (Giannini e Bréchet, 2003). Sabe-se que a esteatose é um co-fator que influencia na progressão da fibrose na hepatite C crônica (Cholet et al., 2004) e diversos estudos têm associado diretamente a esteatose ao genótipo 3 do VHC (Rubbia-Brandt et al., 2004; Sharma et al., 2004) e por isto, o genótipo 3 tem sido apontado como citopático (Kumar et al., 2002; Negro,

2006). Kumar e colaboradores (2002) identificaram a redução da esteatose como única variável preditora da resposta virológica ao tratamento da hepatite C crônica em genótipo 3.

Há na literatura outras evidências da lesão citopática direta causada pelo VHC, como a observação de lesões histológicas com infiltrado inflamatório escasso causadas pelo VHC (Miller et al., 1990; Gonzalez-Peralta et al., 1994; Barone et al., 1999), à semelhança de outros patógenos da família *Flaviviridae* (Alberti e Bortolotti, 2001). A descrição de casos de hepatite fulminante pelo VHC após quimioterapia em transplante de fígado (Naumov, 1999), de hepatite lobular aguda pelo VHC após transplante de fígado (Gane et al., 1996) e síndrome colestática aguda pelo VHC após transplante de rim (Delladestsima et al., 2001) corroboram com esta teoria.

1.2. Fatores do hospedeiro na hepatite C crônica

Diversos fatores, tanto intrínsecos como extrínsecos ao hospedeiro, têm sido implicados na manutenção e progressão da hepatite C.

Os fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro são:

- ✓ o gênero masculino;
- ✓ a idade acima de 40 anos no momento da exposição ao VHC;
- ✓ a “raça negra”;
- ✓ o diabetes melitus;
- ✓ o índice de massa corpórea (IMC) e obesidade;

- ✓ a imunidade do hospedeiro;
- ✓ fatores genéticos como alguns haplótipos de HLA;
- ✓ depósito de ferro no fígado.

Os fatores extrínsecos do hospedeiro relacionados à progressão da hepatite C crônica são:

- ✓ o uso abusivo de álcool;
- ✓ o tabagismo;
- ✓ a aquisição do VHC por via endovenosa;
- ✓ a co-infecção com outros vírus como HIV, VHB e HTLV;
- ✓ a duração da infecção pelo VHC.

Os dados demográficos como idade, gênero (Poynard et al., 1997; Bellentani et al., 1999) e “raça” (Reddy et al., 1999; Lepe et al., 2006) têm sido discutidos em nosso meio, mas o como eles influenciam na progressão da hepatite C ainda é discutido.

Diversas pesquisas descrevem que a positividade do VHC aumenta com a idade (Bellentani et al., 1999; Lepe et al., 2006) onde haveria maior chance de progressão da doença (Poynard et al., 1997; Bellentani et al., 1999). O gênero masculino é mais prevalente em grande parte dos estudos de hepatite C (Poynard et al., 1997; Lepe et al., 2006) e, além disto, ele foi associado a progressão da doença para cirrose (Poynard et al., 1997; Bellentani et al., 1999). Lepe et al (2006) analisando 1225 pacientes em Chicago, evidenciaram que havia mais homens nos três grupos

analisados, de brancos, hispânicos e afro-americanos. Além disto, os hispânicos mostravam maiores níveis de aminotransferases, atividade portal (classificação de Knodell) e que as mulheres hispânicas tinham maior prevalência de cirrose que os outros grupos (Lepe et al., 2006). A discussão da razão destas mulheres terem mais cirrose, é que eram mais obesas, com maior chance de esteatose e progressão da hepatopatia (Lepe et al., 2006).

Alguns estudos sugerem que descendentes afro-americanos (AA) têm pior evolução da hepatite C devido à maior propensão à cronicidade, resistência ao tratamento (maior porcentagem de genótipo 1) e desenvolvimento de hepatocarcinoma do que os descendentes caucasiano-americanos (CA) (Reddy et al., 1999; el-Serag, 2001). Analisando 99 indivíduos cronicamente infectados e 31 que tiveram eliminação espontânea do VHC, Sugimoto et al. (2003) evidenciaram que a etnia de AA estava associada a uma resposta LTCD4+ mais vigorosa que CA, com predomínio da resposta Th2 e manutenção da infecção. A evolução da hepatite C nas diferentes etnias poderia ser devido a fatores genéticos, como HLA classe-II que poderiam definir a eliminação espontânea do VHC (Azoscar et al., 2003).

Alguns alelos de MHC-II, como o DR5, têm sido relacionados com menor incidência de cirrose em indivíduos cronicamente infectados pelo VHC (Thursz et al., 1997). Rehmann et al. (1996) reconheceram LTC restritos a HLA-A2 em 97% de pacientes cronicamente infectados pelo VHC, em contraste a 2% de controles negativos para anti-VHC. Algumas citocinas pró-inflamatórias parecem estar associadas à resposta da infecção viral, bem como a expressão de determinados haplótipos (Thursz et al., 1997).

O “status” imune do hospedeiro influencia profundamente o curso da infecção

pelo VHC (Chitturi e George, 2000). Em revisão da literatura, Einav e Koziel (2002) constataram maior prevalência de VHC crônica em imunodeprimidos como pacientes com hipogamaglobulinemia (21%), co-infecção pelo HIV (73%), transplantados de medula (45%), rins (29%) e fígado (mais de 95%). Além disto, estes pacientes apresentavam maiores viremias dos que os imunocompetentes e a doença era mais grave e rapidamente progressiva. A co-infecção por HTLV-1 parece alterar a eliminação do VHC tanto espontaneamente, como após tratamento com interferon (Kishihara et al., 2001).

O uso abusivo de álcool tem sido relacionado a aumento da progressão da hepatite C crônica em diversos trabalhos, onde se discute a dose de pelo menos 30g ao dia (Bellentani et al., 1999), ou de 40g ao dia (Poynard et al., 1997; Monto et al., 2004) ou que oscila entre 50 e 80 g de etanol ao dia (Campollo, 2002; Vento e Cainelli, 2002). Diversas observações sugerem que o álcool aumente a habilidade do VHC para entrar e persistir no organismo (Campollo, 2002) e que os indivíduos que ingerem álcool têm maior prevalência de infecção pelo VHC (Campollo, 2002; Sánchez Ávila, 2002). Além disto, o uso de álcool afeta alguns componentes da resposta imune (Campollo, 2002), pode alterar a resposta inflamatória das citocinas, aumentando a viremia e pode ser um importante co-fator no desenvolvimento do hepatocarcinoma (Schiff, 1999). Além disto, o uso de álcool em indivíduos com VHC aumenta a esteatose hepática e induz apoptose (Campollo R, 2002; Vento e Cainelli, 2002; Bhattacharya e Shuhart, 2003). O uso de álcool também tem sido associado a deposição de ferro no fígado de pacientes com VHC crônica (Vento e Cainelli, 2002; Bhattacharya e Shuhart, 2003).

O tabagismo também tem sido implicado na progressão da hepatite C (Pessione

et al., 2001). O tabagismo pode induzir a lesão direta no fígado, indireta (efeito tóxico), ter efeitos imunológicos (produção de IL1, IL6 e TNF α que causam lesão hepática), além de aumentar a atividade inflamatória e fibrose hepáticas (El-Zayadi, 2006).

1.3. Interação hospedeiro e VHC

Na infecção pelo VHC, a constituição genética é um importante fator envolvido na persistência do vírus (Gremion e Cerny, 2005), pois influencia desde o reconhecimento e apresentação do antígeno até o tipo de resposta Th (Thursz et al., 1997).

Vários autores evidenciaram a participação da patogênese imuno-mediada na infecção pelo VHC, pois parte dos portadores não desenvolve doença (Naoumov, 1999; Abrignani, 1997; Cribier et al., 1998; Rehmann, 2000). Outros autores discutem que esse mecanismo é o único responsável pela lesão hepática (Botarelli et al., 1993; Cerny e Chisari 1999; Brown e Neuman, 2001; Bertolotti et al., 2003).

Os fatores da resposta imune ao VHC relacionados à progressão da doença crônica são (Gremion e Cerny, 2005):

- ✓ resposta das células NK;
- ✓ resposta humoral e formação de imunocomplexos;
- ✓ resposta TCD8+: lesão direta da célula infectada;
- ✓ resposta TCD4+: polarização Th1/Th2 inapropriada e secreção de citocinas.

O fígado é um componente do sistema imune (Racanelli e Rehermann, 2006), já que substâncias da resposta inata e adaptativa estão presentes ou são sintetizados por este órgão (Martins, 2001). A resposta inata ao VHC é responsável pela ativação de citocinas, como o interferon (IFN), que ativam proteínas antivirais inibindo a replicação do vírus (Thimme et al., 2006). A resposta adaptativa ao VHC neutraliza partículas virais e destrói células infectadas (Thimme et al., 2006). O balanço entre a efetividade, especificidade e rapidez destas respostas e a taxa de replicação do VHC contribui para a eliminação ou persistência da infecção por esse vírus (Brown e Neuman, 2001).

1.3.1. Resposta inata ao VHC

A primeira linha de defesa contra qualquer agente viral é feita pela resposta inata de forma inespecífica (Janeway et al., 2007a). A maioria das células infectadas pelo VHC reconhece sua cadeia de RNA viral e responde com a produção de interferons, principalmente interferons tipo 1 α e β (Taylor et al., 2000; Mizukoshi e Rehermann, 2001). Estes IFN α e β têm várias ações antivirais como a expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) tipo I, que facilitam o reconhecimento de antígenos virais pelo sistema imune, além da ativação de células como LTCD8+, células NK (“natural killer”) e macrófagos (Taylor et al., 2000). Na infecção pelo VHC, diversas proteínas induzidas pelo IFN-1, como a PKR (Proteína quinase), a 2',5'-oligoadenilato sintetase (2-5OAS) e a proteína Mx (Taylor et al., 2000) são responsáveis pela expressão dos genes que inibem a replicação deste vírus no interior dos hepatócitos. Análises de terapia com interferon têm mostrado

que essa citocina tem grande ação contra o VHC através de mecanismos diretos e indiretos mas, por outro lado, o VHC pode impedir a ativação celular de genes, que por sua vez podem inibir o interferon tipo I (Duong et al., 2004).

O IFN-I estimula a enzima óxido nítrico sintetase (NOS) que sintetiza óxido nítrico (NO). Este óxido nítrico inibe a replicação de vírus em macrófagos, tem efeito citotóxico e participa da patogênese de doenças inflamatórias e auto-imunes (Samuel, 2001). A enzima NOS é expressa em hepatócitos e macrófagos como isoforma (iNOS), produzindo grandes quantidades de NO em resposta a citocinas como o IFN γ . Pacientes com VHC tratados com IFN têm maiores níveis de iNOS que se correlacionam com diminuição dos níveis séricos de alanina aminotransferase. Além disto, a expressão hepática de iNOS tem forte correlação com os níveis hepáticos de HCV-RNA e uma fraca correlação com a expressão de IFN γ (Taylor et al., 2000).

As células NK têm habilidade de destruir células infectadas e inibir diretamente a replicação viral (Taylor et al., 2000). Estas provavelmente são uma das mais importantes células na defesa de hepatites virais, pois o fígado humano contém grande número delas, maior do que no sangue ou qualquer outro órgão (Mizukoshi e Rehermann, 2001; Racanelli e Rehermann, 2006). As células NK são componentes da resposta inata que respondem minutos ou horas após a infecção através da polarização dos grânulos em direção à célula infectada e liberação de seu conteúdo com perforinas que vão fragmentar o núcleo da célula infectada e induzir sua morte (Rehermann, 2000). Elas inibem a replicação viral com produção de interferon gama (IFN γ), que recrutam células inflamatórias intra-hepáticas e estimulam a resposta Th1 (Janeway et al., 2007a). Além destas, as células TNK constituem grande número no fígado e expressam CD57, exercendo funções citotóxicas e produzindo IFN γ e

IL4. As células NK também produzem interleucinas (IL) como IL1, IL2 e estimulam a maturação das células dendríticas (Janeway et al., 2007a). Na hepatite C essas células atuam induzindo a necrose ou apoptose da célula infectada (Winnock et al., 1993) sinalizando a presença do vírus. Estudos sugerem que o VHC inibe genes de receptores da ativação das células NK, diminuindo a ação destas células e reduz o número e função das mesmas em indivíduos cronicamente infectados (Thimme et al., 2006).

Na entrada do VHC na célula hospedeira, a ligação da glicoproteína E2 ao receptor CD81 das células NK inibe a função destas células (Crotta et al., 2002; Pawlotsky, 2004;), alterando a resposta imune à infecção pelo VHC. A glicoproteína E2 também inibe a citotoxicidade e a produção de IFN γ pelas células NK (Thimme et al., 2006).

As células dendríticas, assim como os macrófagos, fazem parte das células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais que, quando ativadas nos focos inflamatórios, expressam em sua superfície grandes quantidades de moléculas co-estimuladoras, que auxiliam na ativação dos linfócitos T (Janeway et al., 2007b). Elas têm importante papel na resposta inata, pois secretam altos níveis de IFN α (Colonna et al., 2002; Diebold et al., 2003). Análises de células dendríticas em pacientes com hepatite C crônica mostraram uma diminuição da capacidade de ativar células NK em resposta ao estímulo do IFN α , sugerindo que esta diminuição pode afetar a resposta ao IFN α na fase aguda da infecção (Pawlotsky, 2004). As células NK também têm a capacidade de aumentar as funções das células dendríticas na presença de células hepáticas, mas essa capacidade está comprometida em células NK derivadas de pacientes com hepatite C crônica, onde a produção de IL10 e TGF β

pode inibir a ação das células dendríticas (Jinushi et al., 2004).

O complexo de replicação viral parece ser formado por uma rígida estrutura de membrana, altamente resistente a proteases e nucleases *in vitro*, o que provavelmente protege o VHC da detecção da resposta imune inata (Thimme et al., 2006). A proteína do core do VHC interage com diversos fatores celulares, como receptor do TNF, o que diminui a atividade citolítica dos LT (Chen et al., 1997). O VHC possui estratégias de evasão da resposta inata passiva, pois as proteínas do core, as proteases NS3/4A e NS5A interferem na resposta inata, impedindo a ação anti-viral do IFN α (Thimme et al., 2006).

1.3.2. Resposta humoral ao VHC e estratégias de evasão do VHC da resposta imune

A imunidade humoral ao VHC é avaliada na prática clínica através de exames como ELISA que detectam anticorpos específicos. Postula-se que após a infecção pelo VHC haja produção de altos títulos de anticorpos contra múltiplos epitopos do VHC na tentativa de debelar a permanência do vírus (Taylor et al., 2000). A expressão da região hipervariável NS1/E2 do envelope do VHC na superfície do vírus estimula os LB para produção de anticorpos neutralizantes contra o VHC. O vírus sofre pressão seletiva do hospedeiro, o que estimulará a elevada variação nucleotídica e o aparecimento de mutações das proteínas do envelope, selecionando variantes genômicas na tentativa de eliminar o sítio de reconhecimento da resposta imune (Botarelli et al., 1993). As diferentes mutações dão origem às quasiespécies do VHC que circulam como uma mistura de variantes imunológicas, sendo que qualquer uma delas pode passar a ser a cepa dominante quando as outras cepas coexistentes

são controladas pelo sistema imune (Major e Feinstone, 1997). A grande quantidade de quasispécies do VHC formada dribla a resposta humoral e há persistência da infecção (Giannini e Bréchet, 2003) e a ação dos anticorpos neutralizantes no controle da infecção do VHC parece ser insuficiente (Pawlotsky, 2004).

Os anticorpos contra o VHC têm sido implicados no dano tecidual devido à formação de imunocomplexos, como anticorpos anti-nucleares (Cacoub et al., 1999), auto-anticorpos contra citocromo P450 e anticorpo contra fígado e rim (Cerny e Chisari, 1999). A deposição de imunocomplexos tem sido relacionada ao surgimento de manifestações extra-hepáticas, como artrite, crioglobulinemia (Agnello, 1995), vasculite cutânea, glomerulonefrite, síndrome Sicca e prurido, que representam substancial morbidade ao paciente (Cacoub et al., 1999). O VHC pode mimetizar o sistema imune levando ao escape viral ou a uma imunidade pós infecciosa, como a hepatite auto-imune tipo 2 (Cerny e Chisari, 1999; Cerny e Chisari, 2000).

Há evidências de infecção pelo VHC resolvida pela resposta celular com CD4+ e CD8+ específicos onde não houve formação de anticorpos contra o VHC (Takaki et al., 2000; Lechner et al., 2000), mostrando que nem sempre a resposta humoral participa da resposta à infecção pelo VHC.

1.3.3. Resposta celular, citocinas e populações celulares na hepatite C

A imunidade celular mediada por linfócitos T (LT) é um dos principais mecanismos de lesão hepática e de fundamental importância nas doenças virais e auto-imunes (Martins, 2001). Como há fraca resposta humoral ao VHC, considera-se que a reatividade de LT citotóxicos seja fundamental para a eliminação viral na

infecção pelo VHC (Gruner et al., 2000). Após sua ativação, os LT entram em proliferação clonal secretando citocinas e outras substâncias que podem afetar de forma variável a função hepática (Kerr et al., 1979). Estudos demonstraram que a infiltração de células mononucleares, incluindo LT e células NK no parênquima hepático causa destruição dos hepatócitos por apoptose, levando a necrose em sacabocado (Kerr et al., 1979). Como os linfócitos têm dificuldade para se movimentar na densa estrutura celular do fígado, muitas de suas ações são mediadas por citocinas (Martins, 2001), substâncias que têm papel fundamental na resposta do hospedeiro ao VHC, corroborando para maior ou menor lesão hepática e progressão da doença (Marcellin et al., 2002). Algumas citocinas estimulam a síntese de colágeno pelos fibroblastos e formação de fibrose na hepatite crônica em atividade (Kerr et al., 1979), a qual pode progredir e levar à distorção da arquitetura hepática e cirrose na hepatite C crônica (Marcellin et al., 2002). As quimiocinas, que são uma grande família de pequenas citocinas, importantes no recrutamento e migração de células inflamatórias quando há inflamação tecidual (Baggiolini et al., 1997). Sua atuação na hepatite C crônica tem sido discutida e foi encontrada correlação entre a expressão de quimiocinas intra-hepáticas e atividade inflamatória (Apolinario et al., 2002).

Os primeiros meses de interação entre o VHC e a resposta do hospedeiro oferecem a principal oportunidade de identificar o mecanismo eficaz da resposta imune (Cerny e Chisari, 1999).

Para alguns autores, os LTCD8⁺ são as principais células envolvidas na eliminação do VHC (Missale et al., 1996) e sua ação deficiente seria um dos fatores responsáveis pela cronificação do VHC (Chisari, 1997; Timme et al., 2001; Pawlotsky, 2004). Os LTCD8⁺ podem eliminar o VHC do fígado por dois

mecanismos: indução da apoptose em hepatócitos infectados (mecanismo citolítico) ou pela supressão da replicação através da produção de IFN γ (Kanto e Hayashi, 2006). A morte das células infectadas pelo VHC pode ocorrer tanto pela liberação de moléculas que fazem canais na superfície celular (perforinas) como pela ação de substâncias que ativam os mecanismos de apoptose, induzindo a destruição do núcleo (granzimas B). Nos grânulos dos linfócitos T citotóxicos existem substâncias com ação microbicida (granulisina) que atuam na destruição da célula parasitada (Cerny e Chisari, 1999). Outros mecanismos que podem contribuir para a persistência do VHC são: a infecção em sítios privilegiados (infecção extra-hepática), a inibição viral da apresentação do antígeno, a supressão imune seletiva, a regulação negativa dos genes de expressão do VHC e as mutações virais que dificultam o reconhecimento do antígeno específico pelos LT (Cerny e Chisari, 1999). A resposta dos LTCD8⁺ ou LTC é menos vigorosa em pacientes cronicamente infectados do que durante a fase aguda da infecção (Cerny e Chisari, 1999). Isto pode ser resultado da imunotolerância ou da exaustão da resposta dos TCD8⁺ à alta carga viral do VHC que persiste nos indivíduos cronicamente infectados (Cerny e Chisari, 1999).

Além dos LTCD8⁺, os LTCD4⁺ também parecem estar envolvidos na lesão viral mediados pelo aumento da expressão do MHC classe II. Há algumas evidências de que os LTCD4⁺ poderiam ser diretamente citotóxicos, tais como os LTCD8⁺ (Martins, 2001). Estudos têm relacionado a resposta vigorosa e duradoura dos LTCD4⁺ e a eliminação do VHC na infecção aguda (Cerny e Chisari, 1999; Wertheimer et al., 2003). Essa resposta imune é geralmente direcionada a epítomos do VHC como a proteína NS3 (Cerny e Chisari, 1999). Gerlach et al. (1999)

evidenciaram que os LTCD4+ em PBMC (células mononucleares do sangue periférico) eram responsáveis pela eliminação do vírus na infecção aguda, enquanto que a perda de resposta dos LTCD4+ se relacionou com a cronificação do VHC. Um estudo sobre hepatite C recorrente após transplante mostrou que o principal componente do infiltrado inflamatório é o LTCD4+ e que a perda da reatividade específica dos LTCD4+ ao VHC está associada à persistência do vírus e progressão do dano ao fígado (Carucci et al., 1997).

Na infecção crônica pelo VHC há inúmeras quasiespécies deste vírus que coexistem com a resposta multiespecífica dos LTC (linfócitos T citotóxicos), o que suscita a dúvida de se as mutações contribuem para ou são consequência da persistência deste vírus (Cerny e Chisari, 1999). O encontro de diferentes quasiespécies do VHC no sangue e PMN tem sido discutido por diversos autores (Roque-Afonso et al., 2005), sendo que a diversidade de quasiespécies entre o sangue, PMN e fígado corrobora para o conceito de “compartimentalização” da resposta imune (Crispe e Mehal, 1996; Maggi et al., 1997), onde a resposta observada em sangue periférico difere do que ocorre no fígado na hepatite C crônica (Minutello et al., 1993; Cerny e Chisari, 1999; Sakai et al., 1999; Exley et al., 2002). Além disto, Sakai et al. (1999) relacionaram a diversidade genética dos isolados do VHC no fígado com fibrose mais avançada.

A resposta imune adaptativa ao VHC requer a apresentação de antígenos através de células dendríticas, plasmócitos, monócitos ou macrófagos (Gremion e Cerny, 2005). Discute-se a possibilidade de que a resposta mediada pelos LTCD4+ possa ser prejudicada pela infecção do VHC nas células dendríticas (Pawlotsky, 2004) e, desta forma, as células apresentadoras de antígenos podem contribuir para a cronicidade da

hepatite C (Longman et al., 2004). Autores evidenciaram que células dendríticas como macrófagos estão diminuídas na infecção pelo VHC (Bain et al., 2001; Sarobe et al., 2002) e que algumas proteínas virais inibem a apresentação do antígeno induzida pelo IFN (Taylor et al., 2000).

Macrófagos são células fagocitárias que possuem receptores para constituintes relativamente invariáveis dos patógenos, cujo reconhecimento induz a produção de citocinas, como a IL1, IL6, IL8, IL10, IL12, TGF β e TNF α (Fator de Necrose Tumoral), que agem no local ou podem ter ação em outras partes do organismo (Racanelli e Rehermann, 2006; Janeway et al., 2007a, b). No fígado, os macrófagos são denominados células de Kupffer e podem expressar o fenótipo CD68+, além de atuar como células apresentadoras de antígeno (Racanelli e Rehermann, 2006). No fígado normal há poucas células de Kupffer, que se situam nos sinusóides e predominantemente nas áreas periportais (Racanelli e Rehermann, 2006). Quando há uma injúria hepática essas células sofrem proliferação e aumento de tamanho (Thung e Gerber, 1997), reconhecem o patógeno (Janeway et al., 2007a) e podem ter papel semelhante às células endoteliais no fígado, sinalizando o processo de adesão para o contato com os linfócitos (Winnock et al., 1993) além de passar ao espaço de Disse e fagocitar hepatócitos em apoptose (Racanelli e Rehermann, 2006).

Além das populações celulares citadas, diversas citocinas têm sido implicadas na patogênese da hepatite C crônica. Na maioria dos tecidos, como no fígado, a produção de citocinas é ausente ou baixa, mas frente a alguma lesão, como infecção pelo VHC é estimulada. Diversas citocinas mediadoras da inflamação hepática têm sido relacionadas à morte do hepatócito, colestase e fibrose e, paradoxalmente, são mediadoras da regeneração após a injúria hepática. Na hepatite C crônica, o

desbalanço entre a produção de citocinas Th1 e Th2 está relacionado com a progressão da doença. As citocinas envolvidas nas doenças hepáticas podem ser classificadas como pró-inflamatórias, como IL1 (α e β), IL8, TNF α , já que estimulam a síntese de IFN γ , além de ter ação imunoregulatória de Th1; citocinas anti-inflamatórias como IL6, IL10; citocinas envolvidas na resposta imune Th1 como IL2, IFN γ ; citocinas envolvidas na resposta Th2 como IL4 e IL5; além de citocinas fibrogênicas como TGF β e anti-fibrogênicas como o IFN α (Tilg et al., 2006).

A IL1 é um coestimulador da ativação das células T produzida por fagócitos mononucleares (Dinarello, 1984). É importante mediador da resposta imune na fase aguda a infecções, lesões teciduais, reações imunes e processos inflamatórios diversos (Dinarello, 1984). Está associada à necrose, inflamação de hepatócitos, produção de matriz extracelular e proliferação celular (Andrade e Andrade Junior, 1997). A IL1 β é uma das mais importantes citocinas no fígado (Peters, 1996) e age como co-estimulador de LT, LB, células em crescimento, fibroblastos e outras citocinas (Onozaki et al., 1985). Alguns estudos de hibridização *in situ* em hepatites crônicas demonstraram a positividade de IL1 α nos hepatócitos, células de Kupffer (Kaasprzak et al., 2004), células inflamatórias portais e no parênquima lobular (Andrade e Andrade Junior, 1997); outros estudos em células mononucleares sanguíneas de pacientes com VHC evidenciam a produção de IL1 *in vitro* (Tilg et al., 1992; Koziel et al., 1999).

A IL2 é uma citocina envolvida na expansão celular, sendo a principal citocina responsável pela maturação e proliferação dos LTCD8+, estimulando a secreção de IFN γ e de outras moléculas que vão mediar a resposta imune (Napoli et al., 1996). Ela está aumentada na hepatite C (Gonzalez-Peralta et al., 1994; Napoli et al., 1996).

e o aumento do receptor de IL2 no sangue periférico está associada a uma resposta imune intra-hepática contra o VHC (Yamashiki et al. 1992).

A IL4 é um fator de crescimento e diferenciação de células T (Th2), inibe a ativação de macrófagos e bloqueia os efeitos do IFN γ e IL 1 (Janeway et al., 2007c). Ela estimula a produção de anticorpos neutralizantes e induz a produção de citocinas anti-inflamatórias como a TGF β e a IL10. Há evidências de que ela pode modular a resposta imune em indivíduos com VHC (Cacciarelli et al., 1996).

A IL6 é produzida por fagócitos mononucleares, células endoteliais e outras em resposta a IL1 e ao TNF (Winnock et al., 1993). Ela está associada à necrose, inflamação de hepatócitos e produção de matriz extracelular com proliferação celular (Abrignani, 1997). Na hepatite C crônica a IL6 foi encontrada tanto no sangue como no fígado, sendo localizada nas células de Kupffer (Oyanagi et al., 1999).

A IL8, uma quimiocina também conhecida como CXCL8 (Baggiolini et al., 1997), é uma citocina pró-inflamatória que atrai células T virgens para o local de infecção, ativa neutrófilos e a angiogênese (Janeway et al., 2007a). Ela pode ser produzida por monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e hepatócitos (Janeway et al., 2007a, b) e tem sido relacionada a doenças do fígado (Tilg et al., 2006). Pode inibir as ações antivirais do IFN (Polyak et al., 2001a), através da indução do NS5A do VHC, interferindo na resposta imune (Polyak et al., 2001a; Girard et al., 2002). A IL8 está aumentada no sangue de pacientes com hepatite C crônica (Polyak et al., 2001b) e sua expressão intra-hepática foi relacionada a maiores graus de atividade inflamatória no fígado de pacientes com hepatite C crônica (Shimoda et al., 1998).

A IL10 é produzida por diversas populações celulares, como LT, células

dendríticas, LB e monócitos (Tilg et al., 2006; Janeway et al., 2007a). No fígado, sua produção é feita pelos hepatócitos, células endoteliais, células de Kupffer, células estreladas e linfócitos (Zang e Wang, 2006). Ela participa da resposta inflamatória inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN γ (Curfs et al., 1997), IL2, IL1 α , IL1 β , IL6 e IL8 pela ativação de macrófagos (Gerlach et al., 1999; Tilg et al., 2006). Estudos mais recentes apontam que a IL10 suprime a proliferação tanto da resposta Th1 como da Th2 e pode induzir a anergia (Taylor et al., 2006). Há evidências do aumento desta citocina na hepatite C crônica (Cacciarelli et al., 1996), sendo que alguns trabalhos relatam a redução da atividade inflamatória (Nelson et al., 2003) e outros da fibrose quando essa interleucina é administrada a pacientes com VHC crônica (Nelson et al., 2000). Alterações genéticas em determinados haplótipos da IL10 podem ser preditores de uma eliminação espontânea do VHC (Mangia et al., 2004). Alguns trabalhos têm mostrado que o polimorfismo no gene da IL10 influencia a progressão da hepatite C crônica, a eliminação espontânea do vírus, bem como a resposta ao tratamento do VHC com interferon (Yee et al., 2001). Entretanto, há divergências na literatura, pois outros autores não evidenciaram que o polimorfismo dos genes estudados seja relevante na eliminação do VHC ou na resposta ao tratamento (Bozkaya et al., 2000; Constantini et al., 2002; Minton et al., 2005).

O interferon- γ (IFN γ) é uma importante citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos na replicação viral e regulação das células T, B, NK e macrófagos (Napoli et al., 1996) e tem papel na morte de hepatócitos em ratos. É secretado por células Th1 e é um potente ativador de macrófagos (fator pró-inflamatório), induzindo a produção de substâncias microbidas como o superóxido e o óxido

nítrico. É uma citocina produzida em infecções virais que tem papel importante na resposta imune adaptativa a patógenos intracelulares, inibindo sua replicação (Janeway et al., 2007a). Ele está aumentado em indivíduos com hepatite C crônica (Tilg et al., 1992; Cacciarelli et al., 1996; Kamal et al., 2004) e alguns autores têm mostrado que seu aumento é proporcional à lesão histológica (Gonzalez-Peralta et al., 1994).

O fator de necrose tumoral (TNF) exerce proteção contra vírus, aumenta a expressão de MHC classe I, potencializa a lise mediada por LTC de células infectadas por vírus, além de estimular células como fagócitos a produzir interleucinas (Janeway et al., 2007a). O $\text{TNF}\alpha$ é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados (Ding e Yin, 2004). Está associado à necrose, inflamação e produção de matriz extra-celular com proliferação celular. O $\text{TNF}\alpha$ também estimula a proliferação das células de Ito o que é fundamental para o processo de fibrose hepática (Tsukamoto, 1999). Esta citocina foi relacionada à morte celular dos hepatócitos em ratos (Andrade e Andrade Junior, 1997) e implicada na indução de apoptose nos hepatócitos nas hepatites virais (Ding e Yin, 2004). Alguns trabalhos evidenciaram o aumento do $\text{TNF}\alpha$ no fígado de pacientes com hepatite C crônica (Kaasprzak et al., 2004) e outros, aumento no sangue (Polyak et al., 2001b) e o correlacionaram com a atividade inflamatória (Neuman et al., 2002).

O fator de crescimento e transformação beta ($\text{TGF}\beta$) é sintetizado principalmente por monócitos e LTCD4^+ que se diferenciam em células Th3 (Taylor et al., 2006). Ele pode inibir ou estimular o crescimento de diversas células, estimular a angiogênese e sintetizar proteínas da matriz extracelular (colágeno) (Janeway et al.,

2007d). O TGF β é um potente desativador de macrófagos, controlando o processo inflamatório, e um indutor da produção de anticorpos IgA. No fígado agrava a perda de hepatócitos, aumenta a resposta fibrogênica e inibe a expressão de RNAm de perforinas (Andrade e Andrade Junior, 1997). Há evidências de que esta citocina esteja aumentada na hepatite C crônica (Roulot et al., 1995; Nelson et al., 1997) e até que esteja envolvida na progressão da fibrose (Nelson et al., 1997), o que é discutido por alguns autores (Roulot et al., 1995). Outros estudos sugerem que essa citocina possa contribuir para a apoptose (Taylor et al., 2006).

Na literatura encontramos diversas correlações entre hepatite C e ativação de células T no fígado (Abrignani, 1997) assim como de citocinas (Kamal et al., 2004), entretanto os dados ainda são controversos e se questiona se são apenas marcadores de infecção ou estão envolvidas na progressão da doença (Cacciarelli et al., 1996). Partindo do estudo da expressão das populações celulares mais relevantes na hepatite C crônica como os LTCD4⁺ e CD8⁺, ele foi expandido para outras populações celulares já citadas, que participam fisiopatogenia da hepatite C como as células de Kupffer, as células NK e as células apresentadoras de antígeno. Após a avaliação da expressão das células no fígado este estudo avaliou a expressão de diversas citocinas que poderiam participar da patogênese da hepatite C crônica. Assim, elas foram analisadas tanto no fígado como no soro na tentativa de compreender quais têm papel central na resposta crônica ao VHC, além de identificar quais fatores poderiam influenciar a lesão hepática provocada por esse vírus.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a resposta imune adaptativa da hepatite C crônica através da expressão das células inflamatórias e de citocinas no tecido hepático e no sangue, relacionando-os com dados demográficos, laboratoriais e histológicos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar e quantificar o fenótipo das populações celulares envolvidas no processo inflamatório de pacientes cronicamente infectados pelo VHC, através de método imuno-histoquímico usando-se os anticorpos anti-CD45RO+, CD4+, CD8+, CD57+, CD68+ e S100;
- b) analisar a expressão das citocinas IL1, IL2, IL4, IL6, IL10, IFN γ , TNF α e TGF β no tecido hepático e no sangue periférico de pacientes cronicamente infectados pelo VHC, através de método imuno-histoquímico e de ELISA, respectivamente;
- c) comparar os níveis das citocinas e populações celulares entre pacientes com hepatite C crônica e controles sem hepatite;
- d) relacionar as mesmas citocinas e populações celulares de pacientes com hepatite C crônica e:
 - ✓ os dados demográficos;

- ✓ os dados laboratoriais;
- ✓ os genótipos do VHC;
- ✓ alterações histológicas do tecido hepático.

3. MÉTODOS

Trata-se de um estudo comparativo que analisa pacientes com hepatite crônica pelo VHC selecionados no Ambulatório de Hepatites da Divisão da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram utilizados dois grupos controles, um para os dados histológicos e imuno-histoquímicos composto de doadores de órgãos sem hepatopatia dos quais o bloco da biópsia hepática foi disponibilizado pelo Laboratório de Patologia do HC-FMUSP e outro representado por doadores de sangue, selecionados no Hemocentro do HC-FMUSP para análise das citocinas no sangue.

3.1. Seleção dos casos

Os pacientes com hepatite C crônica foram selecionados durante atendimento no Ambulatório de Hepatites da Divisão da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) de forma seqüencial durante acompanhamento de março de 2001 até outubro de 2002. Esse ambulatório atendia aproximadamente 4000 pacientes matriculados e destes, 800 devido à hepatopatia viral. Na ocasião, a maior parte dessa população foi encaminhada pelo banco de sangue do HC-FMUSP por apresentar sorologia positiva para o VHC.

Os critérios de inclusão dos pacientes com hepatite crônica por VHC foram:

- ✓ idade entre 18 e 60 anos;
- ✓ sem distinção de gênero ou cor (pela classificação do IBGE, 2000);
- ✓ ELISA de segunda ou terceira geração e/ou imunoblot positivos para o VHC;
- ✓ pesquisa qualitativa do VHC positiva através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- ✓ TGP elevada de 1,5 a 4 vezes do limite superior da normalidade (LSN);
- ✓ biópsia hepática comprovando hepatopatia crônica por vírus C de acordo com a classificação de Ishak et al. (1995);
- ✓ assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/Informado (Anexo 1) aprovado pela CAPPESQ nº 850/00.

Dentre as características demográficas analisadas, a raça foi incluída devido às diversas discussões de sua implicação na hepatite C - como colocado na introdução - bem como no campo da epidemiologia sendo discutida na determinação e ocorrência dos processos de saúde e doença (Laguardia, 2007). A classificação de cor/etnia escolhida para esta pesquisa foi a do IBGE, pois é a classificação oficial do Brasil e levada em conta em inúmeras pesquisas deste país.

Os critérios de exclusão dos pacientes com hepatite C crônica foram:

- ✓ evidência de outras causas de doença hepática como: hepatite B (agHBS ou anti-HBC total positivos), álcool, hepatotoxicidade a drogas, deficiência de α 1-

antitripsina, hepatite auto-imune;

- ✓ uso prévio de corticosteróides, IFN α ou qualquer tratamento para o VHC;
- ✓ anti-HIV positivo (ELISA de 2^a ou 3^a geração);
- ✓ anti-HTLV positivo;
- ✓ diagnóstico atual ou história de doença maligna;
- ✓ outro processo infeccioso ativo.

3.2. Seleção dos controles

3.2.1. Controles doadores de sangue

A seleção de doadores de sangue foi realizada no Hemocentro do HC-FMUSP de forma sequencial, de agosto a setembro de 2002. Foram entrevistados indivíduos de acordo com Anexo 2 e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/Informado (Anexo 3). Foram excluídos aqueles com história de etilismo ou hepatopatia.

Os critérios de inclusão dos doadores de sangue foram:

- ✓ idade entre 18 e 60 anos;
- ✓ sem distinção de gênero ou cor (pela classificação do IBGE, 2000);
- ✓ sorologias negativas para HIV, hepatites B e C e HTLV;
- ✓ TGP normal.

As amostras de sangue colhidas foram separadas em 3 ou 4 alíquotas e estocadas

a -20°C no Laboratório de Investigação Médica em Hepatites por Vírus (LIM-47) do HC-FMUSP para posterior análise das citocinas.

3.2.2. Controles doadores de órgãos

Foram selecionados doadores de órgãos de pacientes operados pela Unidade de Transplante de Fígado do HC-FMUSP, de fevereiro de 1998 a abril de 2001. Os exames laboratoriais foram realizados na rotina do Laboratório Central do HC-FMUSP e os blocos de biópsia hepática obtidos na Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Estes foram revistos no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP. A revisão dos prontuários foi feita na Central de Transplantes da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo e foram analisadas as características segundo o Anexo 4.

Os critérios de inclusão dos doadores de órgãos foram:

- ✓ idade entre 18 e 60 anos;
- ✓ sem distinção de gênero ou cor;
- ✓ sorologias negativas para HIV, hepatites B e C e HTLV;
- ✓ exame histológico sem evidência de hepatopatia;
- ✓ ausência de hipotermia durante o coma;
- ✓ ausência de antecedente de uso de álcool.

3.3. Exames laboratoriais

Foram realizados os seguintes exames durante atendimento dos pacientes com hepatite C crônica:

- ✓ dosagem sérica de aminotransferases (AST, ALT);
- ✓ dosagem sérica de gamaglutamiltranspeptidase (GGT);
- ✓ dosagem sérica de fosfatase alcalina (FA);
- ✓ dosagem sérica de bilirrubinas (total, direta e indireta);
- ✓ dosagem sérica de creatinina, ureia, sódio, potássio;
- ✓ dosagem sérica de proteínas por eletroforese;
- ✓ dosagem sérica de alfa 1 anti-tripsina;
- ✓ alfa feto proteína no sangue;
- ✓ dosagem sérica de Ferro;
- ✓ dosagem sérica de Ferritina;
- ✓ dosagem sérica de Cobre;
- ✓ ceruloplasmina;
- ✓ crioglobulina;
- ✓ hemograma;
- ✓ tempo e atividade de protrombina;
- ✓ pesquisa de FAN;
- ✓ pesquisa de anticorpo anti-músculo liso;
- ✓ pesquisa de anticorpo anti-mitocôndria;
- ✓ pesquisa de anticorpo anti-microsomal;

- ✓ sorologia para hepatite B (HbsAg e anti-HBc total);
- ✓ sorologia para anti-HIV (ELISA de 2ª geração);
- ✓ sorologia para HTLV I-II;
- ✓ ultrassonografia de abdome total (USG).

Os exames laboratoriais como hemograma, bioquímica, coagulograma, auto-anticorpos, alfa feto proteína e sorologias, foram realizados na Divisão do Laboratório Central do HC-FMUSP dentro da rotina de atendimento do Ambulatório de Hepatites deste hospital. O valor anotado foi aquele de data mais próxima à biópsia hepática, sendo que antes da biópsia hepática eram solicitados hemograma, bioquímica e coagulograma de rotina.

Todos os pacientes foram submetidos à ultrassonografia de abdome na Divisão de Radiologia do HC-FMUSP, antes da realização das biópsias.

3.4. Exames de biologia molecular

Os exames de biologia molecular como PCR qualitativo, quantitativo e a genotipagem do VHC foram realizados no Laboratório de Investigação Médica em Hepatites por Vírus (LIM-47) do HC-FMUSP.

A quantificação do VHC foi realizada através da Reação da Cadeia de Polimerase (PCR) utilizando o AMPLICOR HCV MONITOR (ROCHE DIAGNÓSTICOS, Mannheim), com limite de detecção de 600 UI/ml a 850.000 UI/ml. Este teste é baseado em quatro processos principais detalhados a seguir (Davis, 2002; Nainan et al., 2006):

a) Preparação das amostras: o RNA do HCV foi isolado do soro por lise de partículas virais com agente caotrópico, seguido por precipitação de RNA com álcool. Em cada amostra foi introduzido um número conhecido de moléculas de padrão de quantificação do HCV de RNA em conjunto com reagentes de LISE. As amostras e os reagentes foram manuseados à temperatura ambiente. No próximo passo foram pipetados 100 µL do “HCV Monitor Quantitation Standard” (QS) no frasco do tampão de lise, seguido de agitação vigorosa. Após, foram pipetados 400 µL do reagente de lise preparado na etapa anterior em cada tubo de 1,5 mL identificados para cada amostra e controles. Em seguida foram adicionados 100 µL de plasma de cada paciente, seguido de agitação vigorosa imediata por 3 a 5 segundos. Nos controles negativo e positivo foram adicionados 100 µL de plasma humano normal, seguido também de agitação vigorosa imediata. Adicionou-se 100 µL dos controles negativo e positivo nos tubos correspondentes, seguido de agitação. Após, os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura de 60°C seguido de agitação vigorosa. No próximo passo foram adicionados 500 µL de isopropanol, seguido de agitação vigorosa por 3 a 5 segundos. Os tubos foram incubados por 2 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16000g por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante formado foi descartado utilizando-se uma pipeta de transferência. Em seguida, foram adicionados 1 mL de etanol à 70%, seguido de agitação vigorosa e centrifugação de 16000g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado. Após, foram adicionados 1 mL de solução diluente (HCV Monitor Specimen Diluent). O precipitado formado foi raspado com uma ponteira de 200 µL da parede do tubo, este então foi armazenado enquanto se aguardava a preparação dos reagentes da reação de

amplificação e transcrição reversa (Master Mix).

b) Transcrição reversa e amplificação: para amplificação foram utilizados os iniciadores KY78 e KY80 para definir uma sequência de 244 nucleotídeos dentro da altamente conservada região 5'NS do VHC. Sendo assim, foram adicionados 50 µL de solução contendo todos os componentes para as reações de transcrição reversa e amplificação que ocorrerão no mesmo tubo; somando-se a 50µL de cada amostra e controles preparados na etapa anterior. Os tubos foram agitados de 10 a 15 vezes por inversão. Em seguida essas amostras foram amplificadas. Foi utilizado o termociclador Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400 com a seguinte programação:

CICLOS	TEMPO	TEMPERATURA
1	5 min	50°C
1	30 min	62°C
32	10 seg	90°C
32	25 seg	58°C

c) Deteção das amostras: após o término das reações de amplificação, foram adicionados 100 µL de solução de desnaturação (Monitor Denaturation Solution) em cada tubo e homogeneizados. Foram pipetados 100 µL de solução de hibridização em cada poço, seguido pela adição de 25 µL da amostra desnaturada nos poços da fileira A das placas de detecção contendo as sondas de hibridização específicas para o vírus da Hepatite C. Diluições seriadas foram realizadas nas fileiras de A a E, e ao final

foram desprezados 25 µL de cada poço da fileira E. Da mesma forma, foram adicionados 25 µL das amostras desnaturadas na fileira F das placas de detecção que contêm sondas de hibridização específicas para o isolamento do padrão de quantificação QS. Diluições seriadas também foram feitas na fileira F a H e foram desprezados 25 µL ao final de cada poço da fileira H. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Em seguida a placa foi lavada cinco vezes. Adicionou-se 100 µL do conjugado (Avidin-HRP Conjugate), seguida de nova incubação por 15 minutos a 37°C. A placa foi lavada 5 vezes para posterior adição de 100 µL de substrato (Working Substrate Solution) seguida pela incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizando, adicionou-se 100 µL de reagente de parada (Stop Reagent). A leitura da placa foi realizada em 450nm por espectofotometria.

d) Cálculo de resultado: o cálculo de títulos de RNA em UI/mL em soro ou plasma foi obtido da seguinte forma: $[\text{DO total do HCV} / \text{DO total do QS}] \times 200 = \text{RNA do HCV em UI/mL}$.

A genotipagem foi avaliada a partir do produto de Nested-PCR purificado, delimitado por iniciadores (NCR4). As amostras foram processadas em seqüenciador automático ABI Prism DNA Sequencer utilizando-se o Kit ABI Prism Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 2.0 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas também foram analisadas e comparadas no banco de dados HCV Data Base, com referência no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, 2003) que ofereceram genótipos compatíveis ao VHC.

3.5. Biópsias hepáticas

As biópsias hepáticas dos pacientes com hepatite C crônica foram realizadas no Hospital-Dia do HC-FMUSP com agulha “Tru cut”, sob anestesia local. Os fragmentos de fígado obtidos foram fixados em formalina tamponada a 10% e enviados ao Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP. Nesse laboratório, os fragmentos sofreram processamento para inclusão em blocos de parafina e depois seguiram para obtenção de cortes que foram corados na rotina com Hematoxilina-Eosina, tricrômico de Masson, reticulina e Perls. Foram efetuados cortes especiais, em lâminas silanizadas, destinados às reações imuno-histoquímicas.

Os blocos parafinados dos controles (doadores de órgãos) foram levados ao Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP onde foram feitos cortes para rotina e cortes especiais para as reações imuno-histoquímicas.

A análise anátomo-patológica das biópsias hepáticas dos casos e dos controles foi feita por duas patologistas e a classificação seguiu os critérios de Ishak (1995, 2000) de forma semi-quantitativa, que analisa a inflamação portal (graduada de 0 a 4), periportal ou periseptal ou hepatite de interface (de 0 a 4), atividade lobular (de 0 a 4), necrose confluyente (de 0 a 6) e a fibrose (de 0 a 6) sendo que a graduação final decorre da soma dos escores. Além dessa classificação, os casos foram divididos em dois sub-grupos, um com cirrose (F6) ou lesões pré-cirróticas (F5) e outro sem cirrose (F1 a F4) para posterior análise mais detalhada.

Foram avaliados outros detalhes histológicos com três focos principais: as

alterações dos hepatócitos, do espaço portal e dos sinusóides hepáticos tais como a presença e graduação da esteatose, alterações degenerativas e regenerativas do hepatócito, presença de pigmentos (hemossiderina, bilirrubina), degeneração glicogênica, alteração dos sinusóides (dilatação, neutrófilos e linfocitose sinusoidal e trama reticulínica), hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, alteração da veia centro-lobular, da veia porta, da artéria hepática, dos ductos biliares, formação de folículo linfóide e edema do espaço porta. Essas alterações foram avaliadas por semiquantificação variando os eventos de zero a 3, sendo que zero significou ausente; 1 leve; 2 moderado e 3 intenso.

3.6. Reações de imuno-histoquímica

A expressão das citocinas em biópsia hepática dos casos e controles foi feita através da imunomarcção por técnica imuno-histoquímica (IHQ) em amostras parafinadas utilizando os anticorpos conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica das citocinas em material parafinado

ANTICORPO	CÓDIGO/MARCA	DILUIÇÃO
TGFβ	MCA 797-SEROTEC	1:30 (tripsina)
IFNγ	MAB285 R&D Systems	1:300 (tripsina)
TNFα	AF-210-NA R&D Systems	1:200 (tripsina)
IL1α	AF-200-NA- R&D Systems	1:50 (tripsina)
IL1β	AF-201-NA- R&D Systems	1:50 (tripsina)
IL2	AF-202-NA- R&D Systems	1:10 (tripsina)
IL4	AF-204-NA R&D Systems	1:40 (tripsina)
IL6	AF-206-NA- R&D Systems	1:20 (tripsina)
IL10	MAB217 R&D Systems	1:10 (tripsina)

A técnica de estreptavidina-biotina peroxidase em material parafinado foi realizada seguindo os passos descritos abaixo:

- 1) as lâminas foram preparadas com adesivo à base de 3-amino-propiltriethoxi-silano;
- 2) desparafinização dos cortes histológicos com dois banhos de xilol (o primeiro a 57°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente durante 20 minutos);
- 3) reidratação com passagens decrescentes em álcool absoluto, seguidas de álcool 95% e 70% (5 minutos cada);
- 4) lavagem dos preparados em água corrente por 10 minutos e duas passagens

em água destilada;

- 5) bloqueio da peroxidase endógena tecidual com peróxido de hidrogênio (3x de 10 minutos cada em solução a 3%);
- 6) lavagem em água corrente, água destilada e tampão PBS pH 7,4 (5 minutos cada);
- 7) recuperação antigênica quando necessário (Tabelas 1 e 2);
- 8) incubação em PBS-saponina (PBS pH 7,4 contendo saponina a 0,1%) por 10 minutos à temperatura ambiente;
- 9) incubação em solução de leite desnatado a 10% (Molico) por 30 minutos;
- 10) incubação com anticorpos primários descritos na Tabela 1, diluídos em tampão PBS pH7,4, contendo 1% de albumina sérica bovina, acrescida de azida sódica a 0,1%, “over-night” a 4°C;
- 11) lavagem com tampão PBS acrescido de saponina 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente. Incubação com anticorpo secundário biotilado polivalente por 30 minutos (37°C em diluição 1:1000 em tampão PBS-saponina);
- 12) lavagem com tampão PBS acrescido de saponina 0,1% por 10 minutos a temperatura ambiente;
- 13) segundo bloqueio de peroxidase endógena: 3 passagens de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio a 3%;
- 14) lavagem em água corrente, água destilada e PBS, por 5 minutos cada;
- 15) incubação com complexo estreptavidina-biotina peroxidase (SABC) na diluição de 1:1000 em tampão PBS pH 7,4 por 30 minutos a 37°C;
- 16) duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos cada;

- 17) revelação da reação com solução cromógena de diaminobenzidina a 0,03%, adicionada de 1200 µl de H₂O₂ (10 volumes) por 2 minutos em média;
- 18) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 19) contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- 20) lavagem em água corrente;
- 21) desidratação em sequência de álcool crescente (70%, 95%, 100%);
- 22) diafanização em xilol;
- 23) montagem dos preparados em *Permount*.

As subpopulações celulares no tecido hepático (linfócitos TCD4+, TCD8+, TCD45RO+, células CD57+, CD68+ e S100) também foram identificadas por método imuno-histoquímico (Tabela 2).

Tabela 2 - Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica das populações celulares em material parafinado

ANTI-CORPOS	FONTE	DILUIÇÃO	EXPOSIÇÃO DE ANTÍGENOS / AMPLIFICAÇÃO DO SINAL	ESPECIFICIDADE
Camundongo anti-CD45RO	M742 DAKO	1:100	-	Linfócitos T memória
Camundongo anti-CD4+	M834 DAKO	1:1000	CSA	Linfócitos T CD4+
Camundongo anti-CD8+	M7103 DAKO	1:50	CSA	Linfócitos T CD8+
Camundongo anti-CD57+	1166 CH IMMUNO-TECH	1:100	Calor úmido	Células NK
Camundongo anti-CD68+	M876 DAKO	1:100	Calor úmido	Macrófagos
Coelho anti-S100	Z311 DAKO	1:1000	-	Células Apresentadoras de Antígenos

A seqüência de reações é a mesma da descrita anteriormente, excetuando-se a utilização de saponina no tampão de lavagem (itens 6 e 10) e o segundo bloqueio de peroxidase endógena (item 11).

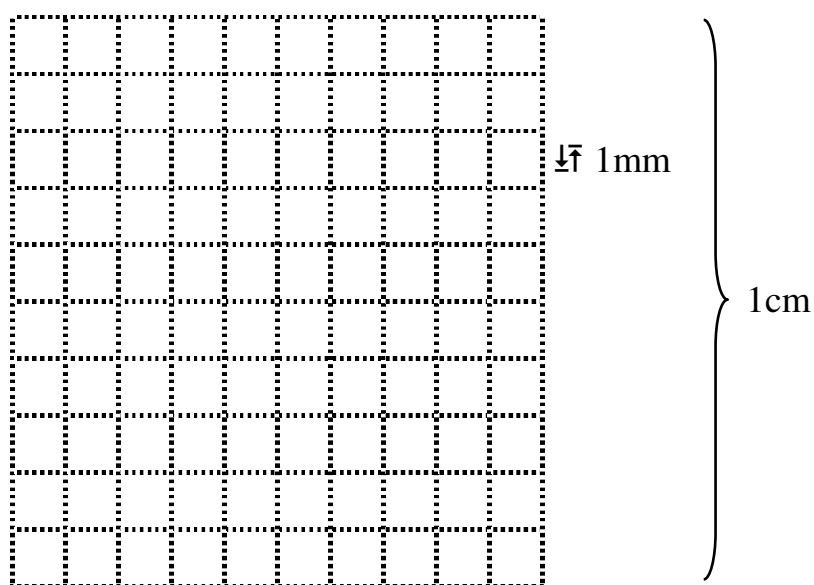
Para obter melhores resultados na detecção de antígenos como dos LTCD4+ e LTCD8+ utilizou-se o sistema de amplificação de sinal CSA (Catalysed Signal Amplification) da Dako, cód. K1500. Para sua execução procedeu-se os mesmos passos descritos anteriormente até o item 10, quando iniciou-se o uso do “kit” de CSA com os seguintes passos:

- 11) duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos cada;
- 12) incubação com anticorpo secundário biotinilado (imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de camundongo), por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 13) duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos cada;
- 14) incubação com complexo SABC na diluição de 1:40 em tampão PBS pH7,4, por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 15) duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos cada;
- 16) incubação com reagente de amplificação (Biotinil Tiramida) por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 17) duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos cada;
- 18) incubação com conjugado de estreptavidina peroxidase por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 19) duas lavagens com tampão PBS, por 5 minutos cada;
- 20) revelação da reação com solução cromógena de diaminobenzidina a 0,03% adicionada de 1200µl de H₂O₂ (10 volumes) por 2 minutos em média;
- 21) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 22) contra-coloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- 23) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 24) desidratação em sequência crescente de álcool (70%, 95%, 100%);
- 25) diafanização em xilol;
- 26) montagem dos preparados em *Permout*.

A presença das citocinas e das populações celulares foi avaliada de forma

quantitativa através de contagem usando-se retículo graduado com área de 1cm^2 dividida em 10 porções de 1mm^2 adaptado à ocular do microscópio óptico (Figura 2). A contagem das células positivas foi feita em duas áreas da biópsia hepática, nos lóbulos e nos espaços portais.

Figura 2. Esquema do retículo acoplado à ocular do microscópio óptico e utilizado nas contagens das células marcadas na imuno-histoquímica



A contagem das células positivas iniciou-se com o aumento de 100 vezes, com objetiva posicionada na extremidade superior esquerda, no lobo hepático ou no primeiro espaço porta a depender da análise. A ocular do microscópio óptico era direcionada sempre para a direita e para baixo. Com o aumento de 400 vezes, o graticulo era posicionado no lobo ou no espaço porta como descrito acima, e iniciada a contagem das células imuno-marcadas. A busca do próximo espaço porta foi feita com aumento de 200 vezes. Quando era contado o lobo, a busca do próximo era feita no mesmo aumento de 400 vezes. Foram contadas 10 áreas lobulares cobertas pelo

gratículo e de 5 a 10 áreas no espaço porta (a depender do número de espaços portais presentes naquela lâmina).

Para calcular o número de citocinas ou populações celulares positivas por milímetro quadrado, dividiu-se o número de células contadas em cada gratículo pelo número de campos contados em cada lâmina. O resultado foi dividido pela constante 0,0625 (Weibel, 1979) obtendo-se o valor da área de expressão do antígeno por mm^2 . Esta constante decorre das medidas do gratículo, pois o lado do quadrado tem 10mm e é dividido por 40, pois a objetiva é de 40 vezes, o que resulta no valor de 0,25. Para que o resultado seja dado em área, este valor foi calculado “ao quadrado”, o que definiu a constante de 0,0625.

3.7. Reações de ELISA

No sangue periférico as citocinas foram dosadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) no LIM-56 da FMUSP, utilizando-se pares de anticorpos e respectivos padrões recombinantes obtidos comercialmente por R&D System (Duo Sets), seguindo as recomendações do fabricante. As alíquotas de soro foram submetidas a dosagem das citocinas IL1 α , IL2, IL4, IL6, IL10, TNF α , IFN γ e TGF β . Além destas, as citocinas IL8 e TNF β foram analisadas no sangue periférico, pois houve disponibilidade destes reagentes no laboratório.

Microplacas de 96 alvéolos de alta afinidade de ligação (Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas (Pharmlingen, USA) e permaneceram “overnight” à temperatura ambiente. Após bloqueio com PBS 4% BSA por 2 horas em temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com

PBS-Tween e foram adicionados sobrenadantes e efetuadas as curvas padrão de citocinas recombinantes (Pharmingen, USA). As placas foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas. Após nova lavagem foram adicionados anticorpos monoclonais anti-citocinas biotinilados (Pharmingen, USA) e as placas foram mantidas por mais uma hora a temperatura ambiente. O sistema de detecção utilizado foi estreptavidina-peroxidase, o substrato tetrametilbenzidina (TMB-Organon). Os resultados foram expressos em densidade óptica e os valores abaixo de 10 picogramas/mL foram considerados zero, já que abaixo desse valor não há significado biológico de expressão das citocinas no sangue.

3.8. Análise Estatística

Trata-se de uma análise comparativa entre casos e dois grupos controles. O tamanho da amostra foi calculado através do programa Epi-Info 6.04, baseando-se num estudo que testou a IL6 e teve resultados significantes (Cribier et al., 1998). O Intervalo de Confiança (IC) foi de 90%, com um alfa (α) de 0,05, definindo a proporção de pacientes com VHC (casos) de 0,683 e a de doadores de órgãos e sangue (controles) de 0,43 e odds ratio (OR) de 2,86. Assim, definiu-se o número ideal de 53 casos e que o número dos dois grupos controles poderia ser o mesmo ou a metade.

O programa estatístico utilizado para análise dos resultados foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 12.0. As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta (n) e relativa (%) e as quantitativas por média, desvio padrão (d.p.), mediana e valores mínimo e máximo.

A comparação entre dois grupos independentes foi realizada pela Prova de Mann-Whitney para amostras independentes. Na comparação entre três ou mais grupos foi aplicada a Prova de Kruskal-Wallis para amostras independentes.

A presença de correlação entre as variáveis foi avaliada pelo coeficiente de correlação por postos de Spearman (r_s) e sua significância foi testada.

A presença de associação entre as variáveis qualitativas foi avaliada pelo Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

Inicialmente foram analisados os dados dos casos (pacientes com hepatite C crônica), depois dos dois grupos controles (doadores de sangue e doadores de órgãos) e, por fim, comparados o grupo dos casos aos dos controles.

4.1. Análise dos pacientes com hepatite C crônica

Inicialmente foram recrutados 60 pacientes com hepatite C crônica (casos) e numerados de 1 a 60. Após a realização da biópsia hepática, foram excluídos nove casos, quatro por não apresentarem pelo menos 10 espaços porta ou 1 cm de comprimento na biópsia hepática (casos 11, 24, 25 e 38), 2 por não apresentarem evidência de fibrose hepática na análise histológica (fibrose zero nos casos 48 e 56), 1 por relatar posteriormente que havia feito uso de corticóide 4 meses antes da biópsia (caso 16), 1 devido ao diagnóstico de esquistossomose intestinal logo após a biópsia (caso 32) e 1 devido ao resultado posterior positivo da sorologia para HTLV-I/II (caso 27). Assim, 51 casos foram selecionados neste estudo, sendo que 34 (66,6%) destes vieram encaminhados do banco de sangue do HC-FMUSP.

4.1.1. Análise da anamnese e exame físico dos casos

Em relação às características demográficas dos 51 casos selecionados (Anexo 5), 30 (58%) eram do gênero masculino e 21 (42%) feminino, a média de idade foi

de 38 anos (variando de 20 a 59 anos) e a classificação de cor (IBGE, 2000), foi de 34 brancos (66,6%), 15 pardos (29,4%) e 2 pretos (3,9%). Em relação à escolaridade, 24 (47%) tinham ensino fundamental, 14 (27%) ensino médio e 13 (25%) ensino superior.

Em relação às possíveis formas de aquisição do VHC (Anexo 5), o principal fator de risco desta casuística foi ter feito cirurgia no passado (52%), seguido por transfusão sanguínea (41%). Nenhum dos casos tinha feito “body piercing”, 1 (2%) tinha mãe com hepatite C crônica (caso 45), 2 (4%) tinham irmão com hepatite C crônica (casos 22 e 28) e 3 casos (6%) tinham antecedentes de UDI. Quatro casos não tinham qualquer história de risco para hepatite C como os citados acima ou antecedente de parceiro/a com hepatite C, múltiplos parceiros, acupuntura ou tatuagem.

O tempo de infecção foi calculado a partir do ano de contato com o fator de risco de infecção pelo VHC até a data da biópsia hepática. Em 10 casos não foi possível precisar o ano da infecção pelo VHC, pois não tinham fator de risco definido. Assim, nos 41 pacientes com data de infecção provável, o tempo de infecção pelo VHC variou de 3 a 31 anos (Anexo 5), com média de 18,2 anos.

Ainda em relação a anamnese no dia da biópsia, 4 queixavam-se de astenia (casos 12, 13, 34 e 37); 6 queixavam-se de lesão de pele (casos 14, 22, 42, 46, 47 e 49), sendo que 1 tinha antecedente de psoríase (caso 42); 5 tinham queixa de artralgia sem artrite (casos 33, 34, 35, 47 e 59) e 7 tinham história de dor em hipocôndrio direito de leve intensidade (casos 7, 18, 21, 30, 34, 35 e 51). Nos antecedentes mórbidos desta casuística, 5 tinham hipertensão arterial sistêmica (casos 26, 34, 36, 40 e 54) e 4 diabetes melitus (casos 35, 36, 40 e 54).

Considerando-se o exame físico no dia da biópsia hepática, apenas 2 pacientes apresentaram hepatomegalia (casos 5 e 37); nenhum paciente apresentou esplenomegalia; 4 tinham eritema palmar (casos 33, 37, 44 e 50); 4 telangectasias (casos 35, 37, 50 e 54); o caso 36 tinha leve edema de pernas; o caso 50 tinha varizes em pernas; 4 apresentavam manchas na pele (casos 36, 46, 49 e 50) e apenas o caso 14 com xerodermia.

Quanto ao IMC (índice de massa corpórea), a média foi de 26,7, ou seja, índice saudável; 3 (6%) tinham IMC abaixo do peso (casos 3 e 20 com IMC 19 e caso 45 com IMC 17); 20 (39%) casos com IMC saudável (de 20 a 25); 14 (27%) casos com IMC de sobrepeso (de 26 a 30) e 14 (27%) casos com IMC obeso, que variou de 31 a 37 (valor máximo encontrado).

4.1.2. Análise dos exames laboratoriais e anátomo-patológicos dos casos

Quanto aos exames laboratoriais, nenhum tinha anemia; 3 casos (6%) apresentaram leucopenia com valor de referência (VR) de 4,0-11,0 mil/mm³; 6 (12%) apresentaram plaquetas entre 50 e 150 mil/mm³ (casos 30, 35, 37, 42, 50 e 55), com VR entre 150 e 450 mil/mm³; 11 tinham hipoalbuminemia (VR 3,8-5,0 g/dL); 16 casos (31%) tinham hipergamaglobulina (VR 0,7-1,6 g/dl); 2 (4%) com discreto aumento de triglicérides (caso 50, 215 mg/dL e caso 59 de 184 mg/dL), com VR menor do que 150 mg/dL; 2 (4%) com discreto aumento de colesterol (caso 2 com colesterol de 215, caso 31 de 262, caso 41, 243 e caso 59 de 213), com VR menor do que 200 mg/dL. Os níveis de transaminases estão descritos no Anexo 6.

Dos casos selecionados, nenhum apresentou crioglobulinas positivas no sangue

(que não foi feito em 11 pacientes devido a problemas na rotina do laboratório do HC na ocasião do pedido ou por abandono de seguimento do paciente), aumento de cobre, ceruloplasmina, alfa 1 antitripsina. Sete tinham FAN (fator anti-nuclear) alterado (casos 2, 7, 18, 37, 40, 52 e 57). Apenas o caso 4 não realizou esse exame.

A distribuição dos genótipos do VHC foi de 39 (76%) indivíduos com genótipo 1 (10 ou 19% com genótipo 1a e 29 ou 57% com genótipo 1b); 12 (23%) com genótipo “não 1”, sendo dois (4%) com genótipo 2 (um 2a e outro 2b) e 10 (19%) com genótipo 3a (Anexo 6).

O exame de USG não foi padronizado, ou seja, foi feito por diferentes profissionais na rotina do HC-FMUSP. Mesmo assim, este dado foi analisado e 33 (64%) dos casos tinham o exame normal. Dentre as alterações, houve 11 (21%) exames sugestivos de esteatose (casos 3, 4, 35, 37, 40, 42, 44, 50, 53, 54 e 58), 12 (23%) com hepatomegalia (casos 3, 26, 33, 35, 36, 42, 44, 47, 53, 54, 59 e 60), apenas o caso 14 (2%) com fígado reduzido de tamanho e 2 (4%) com sinais sugestivos de hipertensão portal (casos 37 e 44).

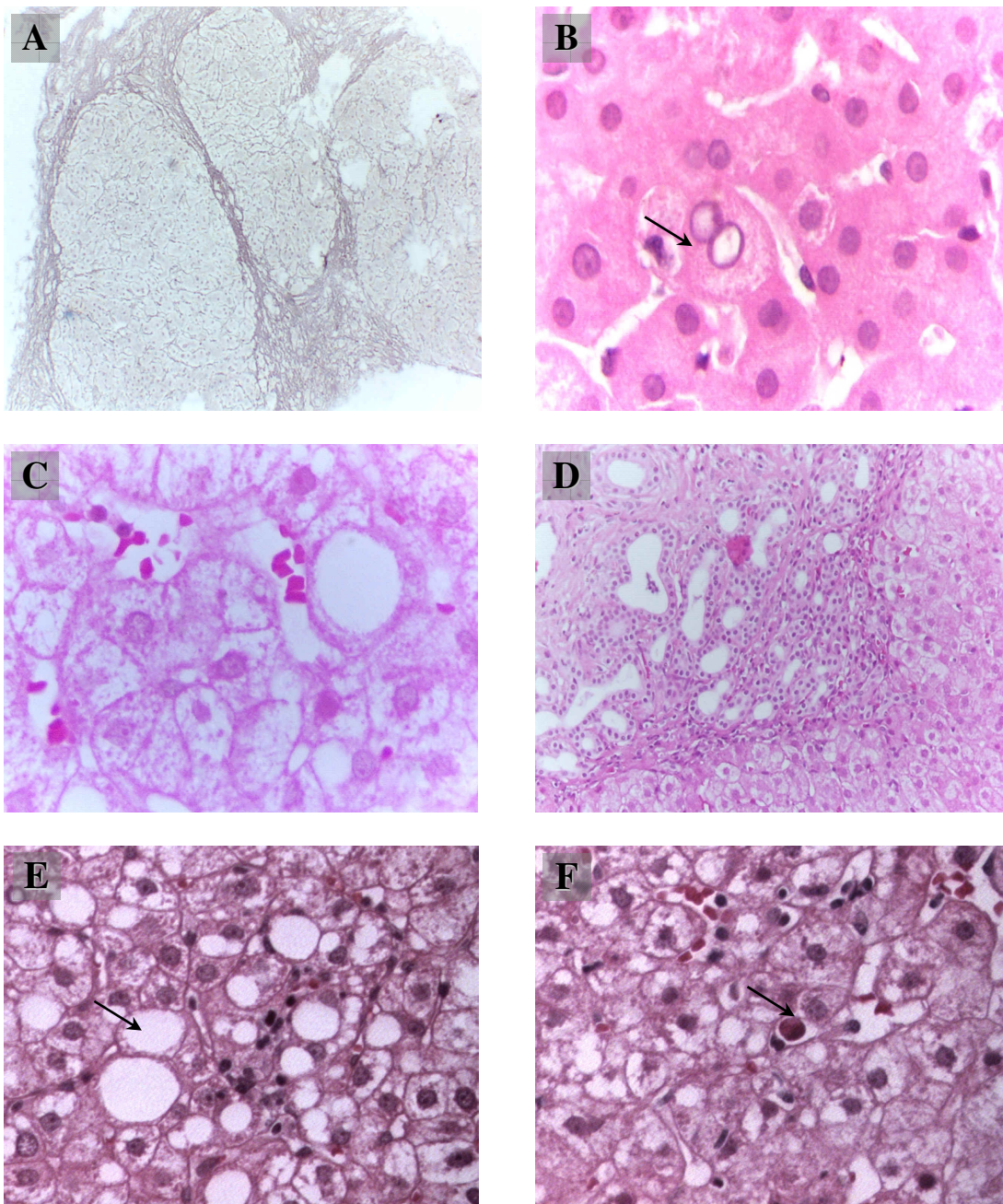
As alterações anátomo-patológicas foram descritas segundo a classificação de Ishak et al. (1995) e detalhadas no Anexo 6. A necrose confluyente estava ausente em todos os casos. Trinta pacientes (58,8%) apresentaram fibrose grau 1 (F1), 2 (3,9%) fibrose grau 5 (F5) e 7 (13,7%) pacientes fibrose grau 6 (F6) como pode ser visto na Figura 3A. Analisando-se a inflamação no espaço porta, 11 pacientes (21,5%) apresentaram inflamação ou atividade portal grau 1 (AP1), 29 pacientes (56,8 %) AP2; 26 (50,9%) pacientes apresentaram inflamação ou atividade peri-portal (APP) 1; 44 pacientes (86,2 %) com inflamação ou atividade lobular ou parenquimatosa (AL) grau 1. O Ishak total desta casuística variou de 3 a 14, com 7 (13%) pacientes

com Ishak 3; 9 (17%) pacientes com Ishak 4; 10 (19%) pacientes com Ishak 5; 9 (17%) pacientes com Ishak 6; 3 (13%) pacientes com Ishak 7; 2 (4%) pacientes com Ishak 8; 1 (2%) pacientes com Ishak 9; 4 (8%) pacientes com Ishak 10; 1 (2%) pacientes com Ishak 11; 4 (8%) pacientes com Ishak 12 e 1 (2%) pacientes com Ishak 14.

Nos hepatócitos dos pacientes com hepatite C crônica (Anexo 7):

- ✓ todos apresentavam corpúsculos de Coulciman no parênquima hepático (Figura 3F);
- ✓ 78 % dos casos revelaram algum tipo de esteatose (leve, moderada ou intensa), localizada ou difusa, macrogoticular e microgoticular (Figura 3E);
- ✓ aspectos de regeneração com binucleação ocorreu em todos os casos de leve intensidade e regeneração acinar em 4 casos;
- ✓ pigmento biliar esteve presente apenas no caso 13 e deposição de hemossiderina em hepatócitos em 3 pacientes (casos 23, 25 e 31).

Figura 3 - Alterações histológicas dos pacientes com hepatite C crônica ao microscópio óptico



- A Caso 23 com nódulos cirróticos corados por Reticulina, 100x
- B Caso 21 Degeneração glicogênica (flecha) 400x
- C Caso 3 com regeneração acinar, 400x
- D Caso 10 com espaço porta, infiltrado inflamatório mononuclear, agressão focal à placa limitante lobular e proliferação dos ductos biliares, 200x
- E Caso 4 Esteatose macró (flecha) e micro goticular dos hepatócitos, 400x
- F Caso 52 com corpúsculos de Councilman (flecha)

Nos sinusóides hepáticos (Anexo 8) houve discreta hiperplasia, hipertrofia das células de Kupffer e linfocitose sinusoidal em todos os casos. Apenas 3 casos apresentaram deposição de hemossiderina nas células de Kupffer (casos 23, 25 e 31).

As alterações do espaço portal como proliferação e necrose de ductos biliares, edema, formação de folículos linfóides e deposição de hemossiderina foram leves e podem ser vistas no Anexo 9.

Exceto nos casos de cirrose, os demais não apresentaram alterações da veia porta ou da artéria hepática e apenas o paciente 1 apresentou alteração inflamatória leve da veia centro-lobular.

4.1.3. Análise das citocinas e populações celulares dos casos

As citocinas no sangue dos pacientes com hepatite C crônica variaram como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração das citocinas por ELISA em picogramas/mL dos 51 pacientes com hepatite C crônica

Nº	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
1	67.558	1.069.299	0	0	956.808	0	0	0	12.563	0
2	846.239	1.173.055	13.365	21.813	51.695	51.510	188.480	387.488	689.879	189.108
3	0	1.098.126	0	0	629.560	15.046	16.056	0	549.367	0
4	0	1.230.658	0	0	0	21.173	0	36.207	242.212	0
5	0	1.211.498	0	0	0	15.046	0	0	606.784	24.950
6	107.418	1.221.525	0	0	569.163	33.038	0	29.053	72.768	10.571
7	615.396	1.201.721	0	0	87.982	39.657	118.159	127.101	77.646	178.359
8	23.537	1.241.081	40.457	0	895.178	71.528	27.307	188.003	735.691	0
9	0	531.515	0	0	968.096	0	0	0	10.541	0
10	14.719	315.869	0	0	566.073	14.175	0	0	300.229	17.808
12	0	1.191.924	0	0	582.960	0	20.846	0	26.123	0
13	106.823	1.229.517	0	0	238.583	18.530	0	0	324.992	0
14	0	1.200.548	0	0	734.458	33.015	0	0	62.853	46.373
15	100.873	1.231.800	0	0	896.393	19.401	0	24.064	769.082	0
17	113.403	1.175.122	0	0	446.098	40.618	0	0	389.292	10.705
18	0	1.136.216	0	0	666.797	29.319	0	36.923	13.155	0
19	16.368	999.585	0	0	421.159	57.658	0	24.775	12.407	0
20	0	510.010	26.869	0	89.517	0	0	0	494.743	0
21	0	520.036	0	0	725.871	11.618	0	13.407	37.705	11.508
22	0	523.387	0	0	34.208	11.618	0	31.915	11.901	0
23	132.155	586.548	0	0	312.080	20.276	0	0	182.871	0
26	14.719	1.062.511	0	0	148.349	48.490	0	36.207	621.049	0
28	67.558	1.263.713	0	0	11.242	65.028	11.576	26.196	104.279	10.571
29	29.639	957.905	0	0	0	41.597	0	0	81.368	11.508
30	49.853	546.867	0	0	55.082	0	0	55.641	12.499	0
31	0	667.188	0	0	969.485	0	0	11.290	30.180	0
33	103.253	1.201.635	0	0	896.749	17.659	0	311.459	376.425	0
34	0	955.776	0	0	53.400	13.308	0	227.027	405.324	13.807

continua

conclusão

Nº	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
35	30.196	1.076.141	0	0	851.379	56.623	0	160.367	12.504	16.236
36	306.076	1.016.444	0	0	50.399	42.576	0	119.607	493.211	10.437
37	14.169	950.156	0	0	0	50.503	12.436	81.124	12.429	0
39	0	1.212.612	0	0	26.479	0	0	0	627.789	0
40	42.510	1.180.290	0	0	826.977	0	10.190	100.281	12.547	18.807
41	0	1.235.233	0	0	465.406	13.308	0	0	581.695	0
42	181.369	535.345	0	0	768.499	22.967	0	44.103	786.244	17.093
43	0	417.586	0	0	0	12.463	0	0	107.245	20.665
44	0	318.391	0	0	645.297	71.528	0	19.801	983.172	0
45	0	0	0	0	12.634	44.533	0	0	439.876	0
46	13.619	1.158.814	0	0	672.524	36.804	12.110	14.117	12.359	0
47	0	1.055.833	0	0	0	0	0	0	416.437	10.571
49	26.856	1.176.156	0	0	169.773	10.774	0	74.548	12.310	0
50	0	1.048.376	0	0	109.801	22.967	0	0	40.318	0
51	31.309	522.900	46.816	0	20.554	26.556	12.219	0	593.682	0
52	18.018	467.648	0	0	685.518	15.917	0	140.647	12.649	20.093
53	0	534.387	0	0	281.013	42.576	0	162.658	721.596	0
54	10.886	444.802	0	0	844.566	42.576	0	17.670	658.282	11.642
55	82.635	462.415	0	0	0	37.755	10.830	137.626	43.435	0
57	54.963	1.108.098	0	0	714.651	0	0	0	37.270	25.379
58	0	1.135.257	0	0	861.682	28.395	0	139.892	640.447	0
59	10.340	1.149.857	0	0	753.951	51.510	0	0	12.461	0
60	15.269	313.852	0	0	961.426	56.623	0	115.882	504.802	0

A densidade das reações de imuno-histoquímica positivas no fígado para identificação do fenótipo das citocinas e populações celulares podem ser observadas nas Tabelas 4 e 5 respectivamente.

Tabela 4 - Densidade das citocinas por imuno-histoquímica no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica

Nº	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
1	0	0,1	0,4	1,1	0,1	0	0,1	0	0,2	0,1	0,2	0,2	0	0,1	0	0,1	0	0,1
2	0	0,2	0,8	0,5	0	0	0,3	0	0	0	0	0,1	0	0,3	0	0	0	0,1
3	0,2	0,1	0,8	0,9	0,4	0,1	0,2	0	0	0	0	0,3	0	0,1	0	0	0,4	0,4
4	0,3	0,1	0,5	1,1	1,2	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0	0,1	0	0	0,1	0,2
5	0,1	0,2	0,1	0,6	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,1	0,1
6	0,2	0,4	0,4	0,2	0,6	0,1	0	0	0	0	0	0,4	0,2	0	0,1	0	0,2	0,2
7	0,3	0,1	0,4	0,4	1,6	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0	0,3	0	0	0,125	0,1
8	0,1	0,5	0,3	0,2	0,4	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,3	0	0,1	0,125	0,2
9	0,1	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0,1	0,1
10	0	0,3	0,3	0,6	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,1	0	0,2	0,1	0,1
12	0	0,2	0	0,2	0,1	0,3	0	0,1	0	0,1	0,5	0,4	0	0,1	0,1	0,1	0	0
13	0,1	0,4	0,2	0,2	0	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0,4	0,1	0	0,1	0	0
14	0,3	0,2	0	0,1	0,2	0	0,1	0	0	0	0,3	0,2	0,2	0	0	0	0	0
15	0,3	0,2	0	0,4	0	0,1	0,2	0	0,7	0	0	0	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0
17	0	0	0,1	0,5	0	0	0,1	0	0,4	0	0	0,2	0,1	0,3	0	0	0	0,2
18	0,1	0,3	0	0	0	0,3	0	0	0,3	0	0,1	0,3	0,1	0,1	0	0,2	0	0,2
19	0	0,2	0,2	0,1	0	0	0,2	0	0	0	0	0,3	0	0,1	0	0	0	0,2
20	0	0,2	0,3	0,2	0	0,3	0,4	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0,1
21	0,3	0,6	0,1	0,7	0,1	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
22	0,1	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0	0	0,7	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1
23	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0	0
26	0,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
28	0,2	0,6	0,3	0,6	0,4	0,1	0	0	0	0	0,2	0	0	0,1	0	0,1	0	0,1
29	0,2	0,7	0	0,2	0	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	0,2	0	0	0,1	0,2
30	0,7	0,2	0,2	0,3	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0
31	0,2	0,3	0	0,2	0	0,5	0	0	0	0	0,4	0,2	0,2	0	0	0	0	0
33	0,2	0,3	0,1	0,4	0	0	0,1	0	0,2	0	0	0	0,2	0,4	0	0	0	0

continua

conclusão

Nº	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
34	0,3	0,6	0,6	0,2	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0,2	0,3	0	0,2	0	0,2
35	0,4	0	1,1	0,2	0,5	0,1	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0,4
36	0,2	0,1	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1	0,1	0	0	0	0
37	0,2	0	0,1	0,2	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0
39	0,3	0	0	0,2	0,1	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0	0,1	0,5	0	0	0	0
40	0,5	0,6	0,3	0,3	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0	0	0	0
41	0	0	0,1	0,5	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0,2	0,3	0	0	0	0
42	0,1	0,3	0,7	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,2	0	0	0	0,1
43	0,4	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,4	0	0,2
44	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,5	0	0	0	0	0,2	0	0,1	0,3	0	0	0	0
45	0,3	0,1	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0,1	0	0	0	0
46	0,4	0,2	0,3	0,2	0	0,2	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0,1
47	0,9	0,1	0,2	0,2	0,5	0,3	0,2	0,1	0,1	0	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,4	0	0
49	0,3	0,1	0	0,2	0	0,4	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0
50	0,3	0,4	0,2	0,2	0,9	0,7	0,2	0	0,1	0,1	0	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0
51	0,3	0,5	0	0,4	0,4	0,7	0	0,1	0	0	0	0	0,4	0,1	0	0	0	0
52	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0	0,1	0,2	0	0,2	0	0,1	0	0,1
53	0,7	0,3	0,4	0,5	0	0,2	0,6	0	0,4	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0
54	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,2
55	0,3	0,2	0	0,3	0,5	0,4	0	0,1	0,3	0	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0,1	0
57	0,4	0,3	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0,3	0	0	0	0
58	0,2	0,4	0,3	0,1	0	0,3	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0,3	0	0	0	0
59	0	0,2	0,3	0,1	0	0,2	0	0	0	0	0	0,2	0,1	0,1	0	0	0	0
60	0,1	0,1	0	0,5	0	0,2	0	0	0	0	0,7	0,1	0,2	0,4	0	0	0,1	0

p = portal

l = lobo hepático

Tabela 5 - Densidade das populações celulares no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica

Nº	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
1	2,6	0,3	42,9	4,9	18,8	0,8	2,8	3,1	0,8	0	0,7	1,3
2	17,7	2,4	27,4	4,7	20,8	0,3	4,2	3,7	0,6	0	5	3,1
3	34,3	1	69,4	3,3	22,5	0,7	0,8	0,4	1,6	0	2	1,3
4	33,1	0,6	43,8	4,2	31,5	1	8,2	7,6	1,6	0,2	3,9	0,3
5	14,6	0,6	57	2,1	12,8	0,2	1,1	5	0,2	0	10,8	1,9
6	9,8	0,7	51,4	2,4	21,7	1,5	7,6	11,7	4	0,1	3,5	0,6
7	18,7	1,1	27	3,3	16,4	0,4	4,5	8,1	3,5	1,6	2	1,1
8	12,3	0,4	27,6	1,7	15,3	0,7	1	2,8	1,4	0,1	0,5	0,4
9	23,2	1,4	43,9	5,3	7,2	0	3,5	5,8	1,1	0,4	0,8	1,3
10	26,7	1,1	18,3	0,7	22,6	0,5	3,9	6,8	1,5	0	8,2	1
12	12,2	1,3	24,7	0,7	8,4	0	2,1	4	0	0	0,5	0,3
13	4,3	0	37,7	3,1	13,4	1	2,7	2,5	2	0,3	2,2	0,9
14	21	1,9	72,6	6,2	20,4	4,4	7	8,5	3	0,1	0,7	1,6
15	12,2	0	63,8	2,7	4,4	0,1	7,4	3,4	0,5	0	2,9	1,5
17	9,2	1,1	20,8	2,4	0,2	0	6,1	9,7	1	0	0,5	1
18	10,7	9	42	2,4	15,3	0,4	2,7	3,9	2,6	0	4,1	0,4
19	26,8	1	45,7	1,3	9	0,4	7	2,3	0,9	0	4,2	0,7
20	14,6	1,1	19	0,9	12,4	0,4	1,1	4,7	3,7	1	0,2	1,5
21	4,4	0	33,3	1,8	3,5	0,2	2,1	4,4	0,1	0	1,5	0,2
22	31,4	0,1	40,7	1,6	9,3	0,8	2,6	4,1	0	0	1,9	1
23	22,7	1,6	24,8	2,6	11,8	0,5	4	6,8	0,1	0,2	1,3	0,5
26	0,8	0	17,7	1	2,8	0,3	7,4	7,2	0,6	0	0,2	0,4
28	17,2	0,6	28,9	2,8	17,3	0,3	2,8	8,5	1,7	0	1,4	0,9
29	13,9	1,6	28	2,4	4,7	0,3	0,8	3,8	4,3	0,8	0,7	0,2
30	83,8	3,2	102,5	4,3	12	0,2	1,3	4	1,7	0	1,2	0,3
31	30,8	1,9	37	1,6	16,6	0,9	0,2	1,5	0,9	0,1	1,8	0,3
33	3,5	0,5	44,7	3	7,3	0,2	5,4	5,9	2,7	0,3	0,1	0,3
34	20,5	4,3	45,2	3,5	24,7	2,8	5,4	3,6	0,9	0	1,3	0,5
35	23,7	1,7	60,2	3,6	11,7	1,2	1,9	2,5	1,6	0,1	1,6	0,8

continua

conclusão

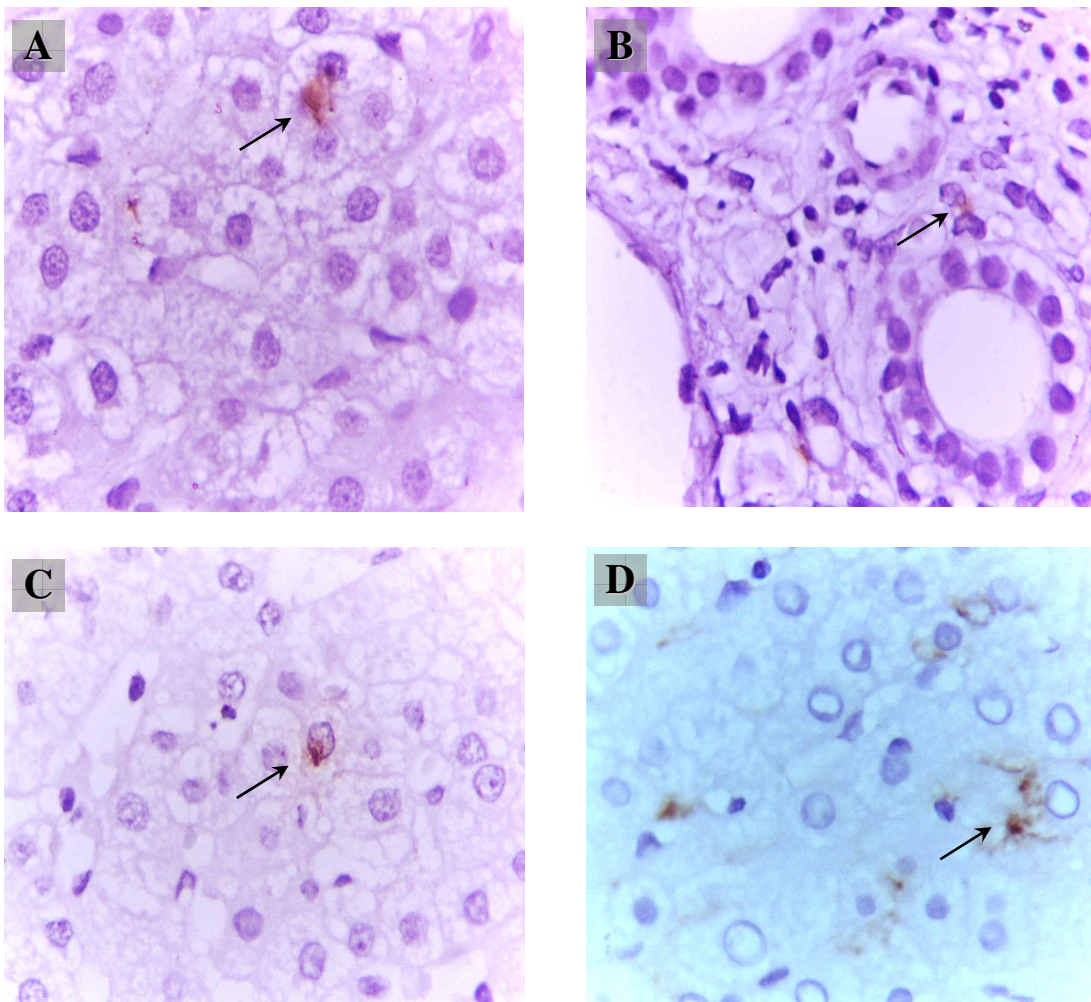
Nº	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
36	2,7	0,1	16,5	0,4	12,7	0,9	5,5	5,3	1,3	0,2	0	0
37	61,3	4,3	79	5,4	18,9	1,2	1,9	0,7	1,1	0	4,6	1,1
39	34,3	3,3	38,6	1,5	10,5	1,2	15,1	12,7	0,5	0,3	0,7	0
40	53,1	2,7	71,2	13,4	22,2	1,7	17,4	21	0,2	0,3	0	0
41	38,7	5,2	28,3	2,4	8,2	1	4,3	4,5	5,1	0,7	0,9	1,1
42	50,8	3,1	65,5	3,1	10,6	1,6	6,1	13,5	0	0	0,4	0,3
43	8,3	0,5	19	3,1	5,6	0	0,5	1,9	1,6	0	0	0,1
44	28,8	1,5	42,7	1,5	1,1	0	9,4	11,9	0	0	0,4	0,3
45	18,4	0,2	17,2	0,7	3,5	2,3	3,9	5,2	0,6	0	0,6	0
46	33,3	4,7	50,7	3,6	6,4	0,3	13,8	10,1	1,1	0,1	0,1	0,2
47	34,4	1,7	79,8	2,8	7,4	0,9	9,9	6,3	0,3	0	2	0,3
49	54,1	2,2	88	3,7	26,2	0,9	2,8	6	1,2	0	0,1	0
50	23,7	0,8	39	0,8	11,8	0,4	9	5,3	0,4	0	0	0,1
51	25	6,3	33,4	3,3	14,3	2,3	11,4	11,6	1,2	0	0,7	1,3
52	55,4	5,7	34,9	1,9	15,8	0,3	2,9	3,5	0,5	0	0	0
53	60,9	10,4	137,2	4	14,4	1,1	20,3	13,6	2,2	0	0	0,9
54	37,9	4,7	31,9	1,8	4,4	0,3	7,3	5	0,5	0,1	0	0,3
55	51,7	1,9	64,4	2,5	12,9	1,4	10,2	12,9	2,1	0	0	0
57	9,2	0,3	22,3	0,8	2,9	0,1	25,8	12,1	3,7	0	0	0
58	19	1,5	21,4	2,9	4,2	0	14,2	7,2	0	0,1	0	0,8
59	12,9	1,1	26	1,9	7,2	0,1	8,1	5,7	0,4	0,1	0,4	0,8
60	43,6	2,9	46,7	6	11,4	1,3	35	11	3	0	0,9	2,2

p = portal

l = lobo hepático

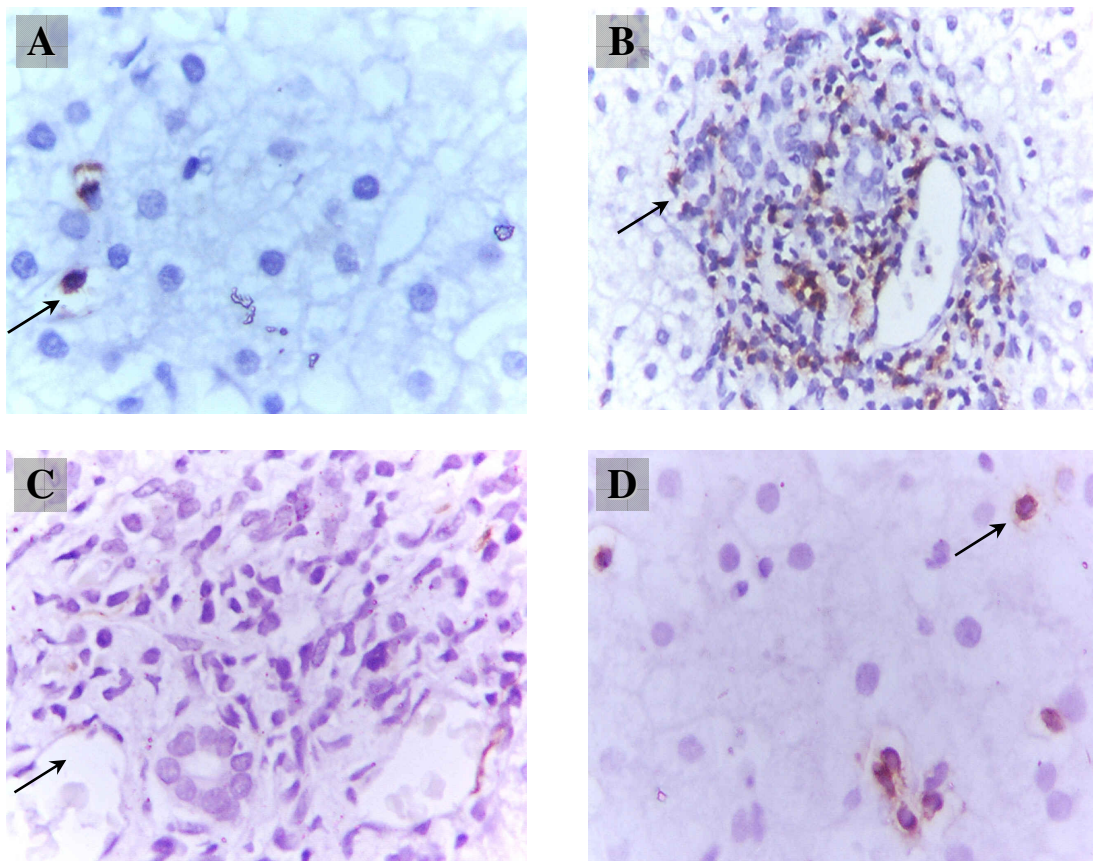
A expressão imuno-histoquímica de algumas citocinas pode ser observada na Figura 4 e a imunomarcção de algumas populações celulares pode ser observada na Figura 5.

Figura 4 - Imuno-histoquímica de citocinas marcadas com coloração castanha (flechas) em pacientes com hepatite C crônica (400x)



- A IFN γ em lobo de caso 18
- B IFN γ em espaço porta de caso 26
- C IL2 em lobo de caso 1
- D IL6 lobo de caso 1

Figura 5 - Imuno-histoquímica de populações celulares marcadas com coloração castanha (flechas) em pacientes com hepatite C crônica



- A células CD4+ no lobo caso 39 (400x)
 B células CD4+ no espaço portal caso 20 (200x)
 C células S100 no espaço porta, caso 60 (400x)
 D células CD45+ no lobo, caso 12 (400x)

As citocinas no tecido hepático dos 51 pacientes com hepatite C crônica foram correlacionadas às mesmas citocinas no sangue periférico, mas não houve correlações significantes entre as mesmas.

Depois disto, as populações celulares foram correlacionadas às citocinas no fígado dos 51 pacientes com hepatite C e houve significância entre: CD45+ portal com $\text{TNF}\alpha$ portal, $\text{IFN}\gamma$ lobular e $\text{IL1}\alpha$ lobular; CD45+ lobular com $\text{IFN}\gamma$ lobular e

IL1 α lobular; CD4+ portal e TNF α portal; CD4+ lobular com TNF α portal e TGF β portal; CD8+ portal com TGF β portal e lobular; CD8+ lobular e IL4 portal; CD68+ portal com TNF α portal, IL4 lobular, IL6 lobular (correlação inversa) e IL10 lobular (correlação inversa); CD68+ lobular com IL6 lobular (correlação inversa) e IL10 lobular (correlação inversa); CD57+ portal com TNF α portal (correlação inversa), IFN γ lobular (correlação inversa), IL10 portal e lobular; CD57+ lobular com TNF α portal (correlação inversa), TGF β portal e lobular, IL2 lobular e IL10 portal; S100 portal com IL1 β lobo (correlação inversa) e IL10 portal; S100 lobular teve correlação inversa tanto com IL1 β portal como com IL2 portal (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre as populações celulares e citocinas no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica

POPULAÇÕES CELULARES		CITOCINAS NO FÍGADO																	
		TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
CD45 porta	rs	0,32	-0,19	0,06	0,07	0,08	0,30	-0,05	0,28	0,06	-0,03	0,10	-0,15	-0,20	0,15	-0,15	-0,18	-0,00	-0,15
	p	0,023*	0,184	0,692	0,642	0,592	0,030*	0,751	0,049*	0,695	0,815	0,483	0,279	0,168	0,306	0,306	0,211	0,981	0,283
CD45 lobo	rs	0,19	0,00	-0,03	-0,08	-0,13	0,29	-0,12	0,33	0,10	0,04	0,20	-0,09	-0,04	0,23	-0,15	-0,04	-0,19	-0,06
	p	0,190	0,992	0,820	0,562	0,356	0,042*	0,396	0,019*	0,501	0,803	0,167	0,521	0,786	0,098	0,293	0,773	0,174	0,648
CD4 porta	rs	0,40	-0,02	0,10	0,14	0,12	0,01	0,25	0,16	0,27	-0,09	0,10	-0,05	-0,16	0,01	0,17	-0,08	0,16	-0,04
	p	0,004*	0,866	0,496	0,315	0,407	0,921	0,076	0,258	0,056	0,532	0,497	0,700	0,255	0,927	0,244	0,590	0,264	0,760
CD4 lobo	rs	0,28	-0,09	0,27	0,23	0,03	-0,17	0,06	0,10	0,01	-0,22	0,06	-0,11	-0,23	0,14	-0,11	0,01	0,13	0,05
	p	0,049*	0,514	0,049*	0,107	0,842	0,220	0,679	0,493	0,937	0,118	0,687	0,430	0,100	0,316	0,427	0,954	0,366	0,737
CD8 porta	rs	0,00	0,08	0,30	0,28	0,13	-0,03	0,12	-0,01	-0,09	-0,07	0,08	0,20	0,07	-0,03	-0,09	0,21	0,23	0,16
	p	0,994	0,558	0,030*	0,043*	0,354	0,855	0,405	0,968	0,530	0,617	0,590	0,157	0,626	0,854	0,544	0,134	0,096	0,248
CD8 lobo	rs	0,21	-0,06	0,08	0,04	0,07	-0,01	-0,11	0,03	0,03	-0,07	0,06	-0,16	0,37	-0,01	-0,07	-0,05	0,07	-0,10
	p	0,136	0,697	0,595	0,796	0,628	0,932	0,446	0,832	0,855	0,638	0,651	0,264	0,008*	0,935	0,600	0,732	0,627	0,495
CD68 porta	rs	0,29	0,10	0,04	0,04	0,07	0,21	0,01	0,14	0,08	0,09	0,00	-0,18	0,22	0,34	0,11	-0,30	-0,13	-0,40
	p	0,042*	0,497	0,797	0,759	0,635	0,145	0,927	0,322	0,553	0,542	1,000	0,212	0,119	0,014*	0,440	0,035*	0,366	0,003*

continua

conclusão

POPULAÇÕES CELULARES		CITOCINAS NO FÍGADO																	
		TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
CD68 lobo	rs	0,24	0,17	0,02	0,17	0,15	0,20	-0,15	0,10	-0,10	-0,04	-0,01	-0,14	0,19	0,22	-0,02	-0,39	-0,04	-0,34
	p	0,087	0,241	0,859	0,227	0,285	0,166	0,297	0,500	0,470	0,767	0,959	0,330	0,186	0,127	0,898	0,005*	0,796	0,014*
S100 porta	rs	0,09	-0,01	-0,06	0,16	0,04	-0,10	0,06	-0,16	-0,14	-0,30	-0,07	0,04	0,20	0,07	-0,14	-0,08	0,34	0,16
	p	0,540	0,924	0,689	0,271	0,766	0,502	0,683	0,274	0,318	0,033*	0,613	0,762	0,160	0,623	0,334	0,583	0,014*	0,259
S100 lobo	rs	-0,04	0,03	0,11	-0,10	0,01	0,04	-0,22	-0,15	-0,29	-0,02	-0,31	0,04	0,21	0,00	-0,13	-0,27	0,17	0,00
	p	0,795	0,854	0,445	0,478	0,924	0,768	0,114	0,308	0,041*	0,888	0,029*	0,798	0,138	0,999	0,373	0,059	0,225	0,982
CD57 porta	rs	-0,28	-0,11	0,17	0,22	0,06	-0,33	0,03	-0,26	-0,04	-0,22	-0,03	0,20	-0,05	-0,25	0,22	0,24	0,37	0,30
	p	0,049*	0,449	0,224	0,128	0,688	0,018*	0,847	0,068	0,756	0,120	0,835	0,159	0,704	0,080	0,127	0,086	0,008*	0,033*
CD57 lobo	rs	-0,47	-0,13	0,28	0,29	-0,04	-0,26	0,26	-0,24	-0,04	-0,16	-0,03	0,28	0,02	-0,16	0,04	0,04	0,28	0,15
	p	< 0,001*	0,358	0,045*	0,040*	0,784	0,064	0,068	0,085	0,768	0,249	0,825	0,048*	0,898	0,258	0,782	0,774	0,049*	0,287

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

4.1.4. Análise das citocinas e populações celulares em relação aos dados demográficos dos pacientes com hepatite c crônica

Os resultados das citocinas e populações celulares foram relacionados aos dados demográficos dos 51 pacientes com hepatite C crônica na tentativa de identificar um padrão de resposta imune.

Na correlação entre as populações celulares por IHQ e a idade dos pacientes com hepatite C crônica no dia da biópsia hepática, o CD45+ portal, CD4+ portal e CD8+ lobular tiveram correlação significativa (Anexo 10), ou seja, valores baixos de idade se correlacionaram a valores baixos das populações celulares citadas e valores altos de idade a valores altos dessas populações celulares.

Na análise entre as citocinas tanto por IHQ como por ELISA e a idade dos pacientes com hepatite C crônica no dia da biópsia hepática, o TNF α portal teve correlação direta enquanto IL1 β do lobo hepático teve correlação indireta com a idade (Anexo 11).

Nos 41 pacientes que se conhecia o tempo de infecção pelo VHC, foi analisado se havia maior ou menor expressão de populações celulares e citocinas em relação ao tempo de exposição ao VHC, mas não houve correlação significativa (Anexos 12 a 13).

Em relação ao gênero dos pacientes com hepatite C crônica, o CD57+ portal foi a única população celular com relação estatisticamente significativa com o gênero masculino (Anexos 14 e 15) e o TNF β no sangue (ELISA) foi a única citocina com relação estatisticamente significativa com o gênero feminino (Anexo 16).

Para avaliar se houve diferença na expressão de citocinas e populações celulares em relação à cor dos pacientes com VHC, as categorias de cor parda e preta foram

agrupadas em uma só categoria de “raça negra” (Travassos e Williams, 2004), pois nesta casuística havia apenas dois pacientes de cor preta. Não houve relação significativa entre a “raça” e as populações celulares (Anexo 17). Na análise entre “raças” e as citocinas por IHQ, a expressão de TNF α portal e IL1 β portal na “raça branca” foram estatisticamente maiores do que na “raça negra” (Anexo 18) assim como de IL1 α e IL8 no sangue por ELISA (Anexo 19).

Na comparação entre grau de fibrose (Ishak et al., 1995) tanto com o gênero como com a raça não houve significância estatística (Anexos 20 e 21).

4.1.5. Análise das citocinas e populações celulares dos casos em relação às transaminases, à carga viral e aos genótipos do VHC

Na correlação entre as transaminases (AST e ALT) e as populações celulares dos pacientes com hepatite C crônica, houve significância estatística apenas entre AST e S100 lobular (Anexo 22). Não houve correlação significativa entre as transaminases e as citocinas no sangue ou no fígado dos pacientes com hepatite C crônica (Anexos 23 e 24).

A carga viral do VHC foi obtida em 49 dos 51 pacientes selecionados (Anexo 6) e apenas nestes 49 pacientes ela pôde ser comparada à expressão das citocinas e populações celulares. No tecido hepático, menores cargas virais do VHC se correlacionaram significativamente a LTCD8+ lobulares, IL2 portal e lobular (Anexos 22 e 23). Por outro lado, maiores cargas virais do VHC se correlacionaram a TGF β lobular e IL4 lobular (Anexo 23). Não houve significância estatística entre a carga viral do VHC e as citocinas no sangue (Anexo 24).

Os genótipos do VHC foram comparados à expressão das citocinas e populações

celulares. Devido ao menor número dos genótipos 2 e 3, eles foram agrupados como genótipo “não 1”, nomenclatura semelhante a outras publicações na literatura (Zein, 2000). Na comparação entre as populações celulares por IHQ e os genótipos, o grupo com genótipo “não 1” apresentou níveis de CD45RO+ portais significativamente mais altos do que o grupo com genótipo 1, enquanto o grupo com genótipo 1 apresentou níveis de CD68+ portal e lobular significativamente mais altos do que o grupo com genótipo “não 1” (Anexo 25). Em relação às citocinas, o grupo com genótipo 1 apresentou maiores níveis de IL4 portal (Anexo 26), além de níveis de TGF β e IL10 séricas significativamente mais altos do que o grupo com genótipo “não 1” (Anexo 27).

Como houve apenas 2 pacientes com genótipo 2 nesta casuística, os dados significantes na comparação entre genótipo 1 e “não 1” (Anexos 25 a 27) pareciam dever-se ao genótipo 3. Assim, os cálculos foram refeitos comparando apenas o genótipo 1 ao 3 e as mesmas diferenças estatisticamente significantes se mantiveram, exceto em relação a IL4 portal que não mostrou diferença entre os genótipos 1 e 3 e a IL10 no sangue com p 0,021 para genótipo 3 (dados não mostrados).

4.1.6. Análise das citocinas e populações celulares dos casos em relação às alterações histológicas

Na correlação entre os dados histopatológicos semi-quantitativos e a densidade das populações celulares por IHQ, a atividade peri-portal correlacionou-se diretamente à expressão dos LTCD4+ portais e inversamente às células S100 lobulares, enquanto que a atividade lobular correlacionou-se significativamente aos LTCD4+ portais e LTCD4+ lobulares (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação entre a expressão das populações celulares no fígado e as alterações histológicas dos 51 pacientes com hepatite C crônica

POPULAÇÕES CELULARES POR IHQ (N=51)		INFLAMAÇÃO PORTA	FIBROSE	HEPATITE INTERFACE	NECROSE FOCAL	ISHAK TOTAL
CD45 porta	rs	-0,01	0,17	0,22	0,13	0,162
	p	0,943	0,230	0,123	0,357	0,255
CD45 lobo	rs	-0,07	0,23	0,04	0,03	0,10
	p	0,622	0,106	0,766	0,816	0,486
CD4 porta	rs	0,08	0,16	0,40	0,32	0,27
	p	0,580	0,262	0,004*	0,021*	0,059
CD4 lobo	rs	-0,18	0,10	0,02	0,33	0,02
	p	0,207	0,471	0,873	0,017*	0,872
CD8 porta	rs	-0,04	0,19	0,08	0,06	0,09
	p	0,779	0,177	0,598	0,683	0,531
CD8 lobo	rs	-0,04	0,18	0,02	-0,00	0,06
	p	0,758	0,205	0,870	0,970	0,665
CD68 porta	rs	-0,02	0,02	-0,05	0,02	-0,02
	p	0,865	0,865	0,729	0,900	0,863
CD68 lobo	rs	-0,18	0,02	-0,21	0,03	-0,13
	p	0,195	0,886	0,148	0,810	0,360
S100 porta	rs	-0,12	-0,11	-0,05	0,03	-0,13
	p	0,418	0,449	0,735	0,818	0,351
S100 lobo	rs	-0,14	-0,09	-0,29	-0,13	-0,18
	p	0,343	0,533	0,039*	0,352	0,193
CD57 porta	rs	-0,16	-0,14	0,03	0,04	-0,06
	p	0,254	0,336	0,821	0,760	0,649
CD57 lobo	rs	-0,15	-0,10	-0,09	0,13	-0,13
	p	0,298	0,462	0,524	0,363	0,377

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

n é o número de pacientes

Na correlação entre os dados histopatológicos semi-quantitativos e a densidade das citocinas no fígado dos pacientes com hepatite C crônica, a hepatite de interface correlacionou-se significativamente à IL1 β portal e a atividade lobular correlacionou-se significativamente com IL10 portal, TNF α portal e TGF β lobular (Tabela 8).

Tabela 8 - Correlação entre citocinas no fígado e as alterações histológicas dos 51 pacientes com hepatite C crônica

CITOCINAS NO FÍGADO (N=51)		INFLAMAÇÃO PORTA	FIBROSE	HEPATITE INTERFACE	NECROSE FOCAL	ISHAK TOTAL
TNFα porta	rs	0,00	0,10	0,19	0,31	0,13
	p	0,971	0,486	0,188	0,027*	0,367
TNFα lobo	rs	-0,10	0,12	0,08	-0,01	0,06
	p	0,482	0,412	0,596	0,957	0,686
TGFβ porta	rs	0,23	0,22	0,20	0,01	0,23
	p	0,102	0,121	0,151	0,959	0,109
TGFβ lobo	rs	-0,09	-0,17	-0,04	0,34	-0,11
	p	0,509	0,244	0,793	0,016*	0,452
IFNγ porta	rs	-0,00	0,18	0,22	0,18	0,18
	p	0,980	0,211	0,118	0,199	0,211
IFNγ lobo	rs	-0,09	-0,07	-0,16	-0,03	-0,15
	p	0,516	0,648	0,269	0,806	0,293
IL1α porta	rs	0,26	-0,14	0,16	0,09	0,04
	p	0,068	0,332	0,270	0,530	0,751
IL1α lobo	rs	-0,02	0,04	-0,05	-0,03	-0,02
	p	0,879	0,770	0,708	0,855	0,884
IL1β porta	rs	0,16	0,06	0,36	0,24	0,24
	p	0,274	0,680	0,009*	0,092	0,091
IL1β lobo	rs	0,21	0,07	-0,02	-0,02	0,06
	p	0,144	0,601	0,905	0,896	0,681
IL2 porta	rs	-0,06	0,00	0,02	-0,04	-0,04
	p	0,665	0,979	0,908	0,802	0,797
IL2 lobo	rs	-0,04	-0,14	0,03	-0,12	-0,07
	p	0,793	0,309	0,855	0,381	0,599
IL4 porta	rs	-0,01	0,09	-0,12	-0,16	-0,01
	p	0,923	0,546	0,397	0,250	0,955
IL4 lobo	rs	0,05	-0,03	-0,01	0,08	-0,01
	p	0,712	0,810	0,940	0,553	0,952

continua

conclusão

CITOCINAS NO FÍGADO (N=51)		INFLAMAÇÃO PORTA	FIBROSE	HEPATITE INTERFACE	NECROSE FOCAL	ISHAK TOTAL
IL6 porta	rs	-0,02	-0,17	-0,04	0,19	-0,04
	p	0,875	0,225	0,804	0,173	0,782
IL6 lobo	rs	-0,13	0,11	0,00	0,07	0,06
	p	0,361	0,458	0,998	0,614	0,688
IL10 porta	rs	-0,23	-0,13	0,08	0,34	-0,04
	p	0,105	0,373	0,578	0,014*	0,777
IL10 lobo	rs	-0,11	-0,04	0,16	-0,02	0,03
	p	0,456	0,753	0,246	0,864	0,855

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

n é o número de pacientes

Analisando a correlação entre os dados histopatológicos semi-quantitativos e a densidade das citocinas no sangue (por ELISA) dos pacientes com hepatite C crônica, a fibrose correlacionou-se com a IL8 e a atividade lobular correlacionou-se significativamente com IL1 α (Tabela 9).

Tabela 9 - Correlação entre citocinas no sangue e alterações histológicas dos 51 pacientes com hepatite C crônica

CITOCINAS POR ELISA		INFLAMAÇÃO PORTA	FIBROSE	HEPATITE INTERFACE	NECROSE FOCAL	ISHAK TOTAL
TNFα	rs	-0,05	0,13	-0,06	-0,03	0,05
	p	0,741	0,350	0,670	0,810	0,736
TFGβ	rs	-0,01	-0,21	-0,23	0,05	-0,17
	p	0,921	0,132	0,102	0,729	0,232
IFNγ	rs	-0,15	-0,02	-0,09	-0,24	-0,13
	p	0,283	0,875	0,512	0,089	0,361
IL1α	rs	-0,12	-0,12	-0,02	-0,29	-0,15
	p	0,417	0,393	0,894	0,040 *	0,303
IL2	rs	0,13	0,07	0,13	0,15	0,18
	p	0,345	0,623	0,377	0,284	0,215
IL4	rs	0,08	0,18	0,09	-0,14	0,12
	p	0,581	0,195	0,540	0,338	0,405
IL6	rs	-0,19	-0,11	-0,18	0,06	-0,17
	p	0,189	0,439	0,199	0,661	0,220
IL8	rs	0,03	0,29	0,24	0,05	0,24
	p	0,832	0,036 *	0,085	0,735	0,083
IL10	rs	0,00	0,05	-0,10	0,22	0,03
	p	0,982	0,723	0,469	0,122	0,835
TNFβ	rs	-0,22	-0,02	-0,07	0,04	-0,08
	p	0,123	0,863	0,631	0,797	0,556

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

Além da análise das alterações segundo classificação de Ishak (1995), os níveis das mesmas citocinas e populações celulares dos pacientes com hepatite C crônica foram comparados aos detalhes das alterações histológicas dos hepatócitos, dos

sinusóides hepáticos e dos espaços portais descritas nos Anexos 7, 8 e 9 respectivamente. Como a maior parte dos casos apresentava alteração nas variáveis de binucleação, hipertrofia e hiperplasia Kupffer, as análises das mesmas não foram feitas, pois uma casuística homogênea quanto à frequência e a intensidade dos eventos inviabiliza a aplicação de teste estatístico comparando os grupos.

Na comparação entre a presença ou ausência de folículo linfóide em biópsia hepática e a expressão das populações celulares por IHQ, citocinas por IHQ e ELISA dos 51 pacientes com hepatite C crônica (Anexos 28 a 30), o grupo com ausência de folículo linfóide apresentou níveis de IL10 portal significativamente maiores do que o grupo com presença de folículo linfóide.

Na comparação entre a inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática e populações celulares e citocinas dos 51 pacientes com hepatite C crônica, apenas o grupo com ausência de inflamação dos ductos biliares apresentou níveis significativamente maiores de: S100 lobulares (Anexo 31), IL2 lobo, IL4 portal (Anexo 32) e IFN γ no sangue (Anexo 33).

O grupo com presença de proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática tinha níveis significativamente maiores de LTCD45RO⁺ portais e lobulares no fígado dos pacientes com hepatite C crônica (Anexo 34), enquanto que o grupo com ausência de proliferação dos ductos biliares expressava níveis significativamente maiores de TGF β no sangue (Anexo 35 e 36).

Na comparação entre a presença de edema no espaço portal da biópsia hepática e a expressão das populações celulares por IHQ (Anexo 37) e citocinas tanto por IHQ como por ELISA (Anexo 38) só houve significância com níveis maiores de TGF β lobular.

A esteatose na biópsia hepática dos 51 pacientes com hepatite C crônica foi encontrada de diversas maneiras, como localizada ou difusa, macrogoticular ou microgoticular (Anexo 7). A esteatose foi agrupada para identificar qualquer uma das alterações citadas e depois foi relacionada à expressão de citocinas e populações celulares dos pacientes com hepatite C crônica. A presença de esteatose na biópsia hepática foi significativa na comparação com CD45 portal (Anexo 37), TNF α portal e IL8 no sangue (Anexo 39).

Na comparação entre o genótipo do VHC e as alterações histológicas pela classificação de Ishak, a inflamação portal e peri-portal correlacionaram-se com genótipo 1 (Anexo 40).

Como houve apenas 7 casos com cirrose (fibrose grau 6 pela classificação de Ishak), eles foram agrupados aos dois casos com lesões pré-cirróticas (fibrose grau 5 pela classificação de Ishak), na tentativa de analisar a influência das citocinas e populações celulares nas lesões histológicas mais avançadas. Assim, os casos foram divididos em dois grupos, de 9 pacientes com cirrose (fibrose graus 5 e 6) e 42 pacientes sem cirrose (fibrose graus 1 a 4 pela classificação de Ishak). Na comparação entre estes dois grupos e a expressão de populações celulares (Anexo 41), de citocinas no fígado (Anexo 42) e citocinas no sangue (Anexo 43) não houve significância estatística.

4.2. Análise dos controles

Como foram selecionados 51 casos (pacientes com hepatite C crônica) para esta pesquisa, dos 60 doadores de sangue entrevistados, 9 foram excluídos aleatoriamente

e desta forma, utilizados 51 controles de sangue. As características demográficas dos doadores de sangue estão descritas no Anexo 44, com 28 (55%) do gênero masculino, 33 (65%) de brancos e idade que variou de 18 a 58 anos (média de 33 anos).

Dos 60 doadores de órgãos, inicialmente selecionados nos prontuários da Central de Transplantes da Secretaria de Saúde de São Paulo, apenas 40 blocos foram encontrados na Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP e 7 destes foram excluídos por apresentar evidência de hepatopatia após revisão no Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da FMUSP. Assim, foram utilizados 33 controles para as análises comparativas com os casos. Neste grupo de controles (doadores de órgãos) houve predomínio do gênero feminino (54%), cor branca (64%) e média de idade 36 anos (variou de 18 a 60 anos), como detalhado no Anexo 46. Em relação à evolução durante a internação, apenas o controle 17 tinha antecedente de uso de medicações de rotina e o controle 11 tinha antecedente de uso de drogas ilícitas (Anexo 45), mas todos tinham sorologias para HIV e hepatites negativas, conforme os critérios de inclusão e exclusão.

Na análise histopatológica dos 33 doadores de órgãos (Anexo 46) nenhum deles apresentou alteração da veia porta, da artéria hepática ou da veia centro-lobular, fibrose, aumento da trama reticulínica, presença de nódulo, hepatite de interface, inflamação dos ductos biliares, proliferação dos ductos biliares, formação de folículos linfóides, necrose focal ou confluyente, degeneração acinar, dupla placa, esteatose difusa, hipertrofia ou hiperplasia das células de Kupffer, ou neutrófilos sinusoidais. Apenas o controle 5 tinha discreta deposição de hemossiderina no

hepatócito e os controles 15 e 16 apresentaram degeneração glicogênica nos hepatócitos.

A contagem da expressão das populações celulares e citocinas em imuno-histoquímica dos 33 doadores de órgãos (Anexos 47 e 48) foi feita pela mesma profissional que contou as citocinas e populações celulares expressas dos 51 pacientes com hepatite C crônica, totalizando 1260 lâminas.

Nos 51 controles doadores de sangue foram analisadas as citocinas por ELISA (Anexo 49).

4.3. Análise entre casos e controles

Os casos (pacientes com hepatite C crônica) e controles (grupo de doadores de sangue e de doadores de órgãos) foram escolhidos de forma sequencial, ao acaso, pois nesta pesquisa não houve necessidade de pareamento das características demográficas. Excetuando-se o gênero dos doadores de órgãos, os grupos foram semelhantes já que as características demográficas dos:

- ✓ 51 pacientes com hepatite C crônica (Anexo 5):
 - 58% do gênero masculino e 42% feminino;
 - média de idade de 38 anos (variou de 20 a 59 anos);
 - 67% brancos, 29% pardos e 4% pretos.

- ✓ 51 doadores de sangue (Anexo 46):
 - 55% do gênero masculino e 45% feminino;

- ↪ 65% de brancos, 25% pardos e 8% pretos;
 - ↪ média de idade de 33 anos (variou de 18 a 58 anos).
- ✓ 33 doadores de órgãos (Anexo 47):
- ↪ 46% gênero masculino e 54% feminino;
 - ↪ 64% brancos, 12% pardos, 18% pretos, 3% amarelo e 3% desconhecido;
 - ↪ média de idade 36 anos (variou de 18 a 60 anos).

As populações celulares no fígado dos pacientes com hepatite C crônica foram comparadas as dos doadores de órgãos e houve maior expressão de LTCD4+ portais e LTCD8+ portais nos casos e maior expressão de S100 portais e lobulares nos controles (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação entre as populações celulares dos 51 pacientes com hepatite C crônica e os 33 doadores de órgãos

GRUPO	FÍGADO	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Controle n=33	Média	304,53	38,21	294,54	36,70	66,28	13,82	64,53	92,36	64,87	8,48	12,51	6,45
	dp	111,79	30,82	129,19	23,18	57,87	17,20	42,68	38,61	42,33	7,57	10,33	3,82
	Mediana	270,40	32,00	308,80	30,40	51,20	9,60	56,00	83,20	56,00	6,40	8,00	4,80
Caso n=51	Média	412,30	33,13	706,41	46,43	196,83	12,49	107,42	104,56	22,46	2,26	24,31	11,10
	dp	290,95	35,70	388,04	32,99	113,83	13,24	106,94	65,60	20,24	4,75	33,89	10,39
	Mediana	363,20	22,40	624,00	41,60	188,80	8,00	72,00	84,80	17,60	0,00	11,20	8,00
Prova de Mann-Whitney		p0,201	p 0,071	p<0,001*	p0,148	p<0,001*	p0,559	p0,119	p0,700	p<0,001*	p<0,001*	p 0,395	p 0,072

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de casos e controles

Na análise comparativa entre as citocinas intra-hepáticas dos casos e controles, houve maior expressão de IL4 lobular, IFN γ lobular, TNF α portal e lobular, TGF β portal e lobular nos pacientes com hepatite C e maior expressão de IL1 β lobular e IL 10 lobular nos doadores de órgãos (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação entre as citocinas no fígado dos 51 pacientes com hepatite C crônica e os 33 doadores de órgãos

GRUPO	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Controle n=33	Média	1,600	0,921	0,824	1,697	1,454	0,485	0,630	0,630	0,727	0,824	0,921	1,454	0,776	1,067	0,048	0,824	0,533	2,715
	dp	2,466	1,651	1,393	1,439	2,310	1,232	1,439	1,997	1,206	1,067	2,192	2,014	1,272	1,244	0,278	0,990	1,244	2,698
	Mediana	1,600	0,000	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	3,200
Caso n=51	Média	3,608	3,827	3,639	5,114	3,074	2,792	1,067	0,314	1,318	0,157	1,035	1,694	1,725	2,478	0,157	0,722	0,549	1,286
	dp	3,033	2,863	3,854	3,906	5,188	2,787	1,938	0,717	2,613	0,480	2,236	1,877	2,823	2,032	0,577	1,477	1,156	1,632
	Mediana	3,200	3,200	3,200	3,200	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000
Prova de Mann-Whitney		p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*	p <0,001*	p 0,136	p <0,001*	p 0,288	p 0,672	p 0,738	p <0,001*	p 0,778	p 0,455	p 0,061	p 0,001*	p 0,360	p 0,168	p 0,573	p 0,007*

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de casos e controles

Analisando as citocinas séricas, houve maior quantidade de IL2, IL10, TNF β e TGF β nos pacientes com hepatite C crônica e maior quantidade de IL1 α , IL4, IL6, IL8 e INF γ nos doadores de sangue (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação entre as citocinas no sangue dos 51 pacientes com hepatite C crônica e os 51 doadores de sangue

GRUPO	ELISA	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
Controle n=51	Média	24473,50	1333,90	25568,97	5640,49	90636,67	61583,82	47593,67	262941,50	37744,21	6866,28
	dp	41016,13	904,02	73027,78	21594,51	123531,88	92659,24	69181,43	336897,03	140680,73	10858,95
	Mediana	6516,00	1157,81	3712,00	1163,00	43522,00	33370,00	10070,00	134229,00	6703,00	2810,00
Caso n=51	Média	64437,14	897553,50	4186,89	1280,25	426373,89	27178,31	10742,36	57817,74	294444,86	16804,21
	dp	149211,16	347819,75	9216,82	3325,05	361594,56	20612,44	30466,86	84190,78	289346,11	34934,79
	Mediana	14719,00	1062511,00	1316,00	0,00	446098,00	22967,00	3821,00	19801,00	182871,00	8698,00
Prova de Mann-Whitney		p0,070	p<0,001*	p0,018*	p<0,001*	p<0,001*	p0,022*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*	p<0,001*

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de casos e controles

4.4. Resumo dos resultados significantes

Devido ao grande número de análises relatadas, aqui foi feito um resumo de todos os resultados significantes tanto dos 51 pacientes com hepatite C crônica (casos) como das comparações entre esses casos e os dois grupos controles (33 doadores de órgãos e os 51 doadores de sangue).

Na comparação de citocinas e populações celulares entre os pacientes com hepatite C crônica e os doadores de órgãos e de sangue, houve aumento significativo dos seguintes eventos (Tabelas 10 a 12):

- ✓ LTCD4+ portais e LTCD8+ portais no fígado dos casos;
- ✓ S100 portais e lobulares no fígado dos controles;
- ✓ IL4 lobular, IFN γ lobular, TNF α portal e lobular, TGF β portal e lobular no fígado dos casos;
- ✓ IL1 β lobular e IL 10 lobular no fígado dos controles;
- ✓ IL2, IL10, TNF β e TGF β no sangue dos casos;
- ✓ IL1 α , IL4, IL6, IL8 e IFN γ no sangue dos controles.

As seguintes correlações entre as alterações da biópsia hepática e as populações celulares e citocinas foram significantes nos pacientes com hepatite C crônica (Tabelas 7 a 9 e Anexos 29 a 40):

- ✓ CD4+ portal com a atividade peri portal;
- ✓ CD4+ lobular com a atividade lobular;

- ✓ CD45RO+ portal com a proliferação dos ductos biliares e a esteatose;
- ✓ CD45RO+ lobular com a proliferação dos ductos biliares;
- ✓ S100 lobular com ausência de inflamação dos ductos biliares;
- ✓ TNF α portal com a esteatose;
- ✓ TGF β lobular com a atividade lobular;
- ✓ IL1 β portal com hepatite de interface;
- ✓ IL2 lobo com a ausência de inflamação dos ductos biliares;
- ✓ IL4 portal a ausência de inflamação dos ductos biliares;
- ✓ IL10 portal com a ausência de folículo linfóide;
- ✓ IFN γ no sangue com a ausência de inflamação dos ductos biliares;
- ✓ IL1 α do sangue com a atividade lobular;
- ✓ TGF β no sangue com a ausência de proliferação dos ductos biliares;
- ✓ IL8 do sangue com a fibrose e esteatose.

As populações celulares foram correlacionadas às citocinas no fígado dos pacientes com hepatite C e houve significância direta entre (Tabela 6):

- ✓ CD45RO+ portal e TNF α portal;
- ✓ CD45RO+ lobular com: IFN γ lobular e IL1 α lobular;
- ✓ CD4+ portal e TNF α portal;
- ✓ CD8+ portal e TGF β portal;
- ✓ CD68+ portal e TNF α portal;
- ✓ CD57+ portal e IL10 portal;
- ✓ CD57+ lobular com: TGF β lobular, IL2 lobular;

- ✓ S100 portal e IL10 portal.

As populações celulares foram correlacionadas às citocinas no fígado dos pacientes com hepatite C e houve significância indireta entre (Tabela 6):

- ✓ CD68+ lobular com: IL6 lobular e IL10 lobular;
- ✓ CD57+ portal e TNF α portal.

Não houve correlação significativa entre as citocinas do fígado e as citocinas do sangue nos pacientes com hepatite C crônica.

Na correlação entre carga viral de 49 pacientes com hepatite C e populações celulares e citocinas, foram significantes (Anexos 22 e 23):

- ✓ Correlação direta com: TGF β lobular e IL4 lobular;
- ✓ Correlação indireta com: LTCD8+ lobulares, IL2 portal e lobular.

Os genótipos do VHC foram comparados à expressão das citocinas e populações celulares (Anexo 27 e 28) e significantes:

- ✓ genótipo “não 1” e: CD45+ portais;
- ✓ genótipo 1 com:
 - CD68+ portal e lobular;
 - IL4 portal;
 - TGF β e IL10 séricas.

Os genótipos do VHC foram comparados às alterações histológicas dos pacientes com hepatite C crônica (Anexo 40) e os pacientes com genótipo 1 do VHC apresentaram maiores níveis de:

- ✓ inflamação portal;
- ✓ inflamação peri portal.

Nas análises dos dados demográficos dos pacientes com hepatite C crônica no dia da biópsia hepática houve significância entre:

- ✓ A idade e (Anexos 10 e 11):
 - ↳ CD45+ portal, CD4+ portal e CD8+ lobular;
 - ↳ TNF α portal;
 - ↳ IL1 β do lobular (correlação indireta).
- ✓ O gênero e (Anexos 14 e 16):
 - ↳ Masculino e CD57+ portal;
 - ↳ Feminino e TNF β no sangue.
- ✓ A “raça branca” e (Anexos 18 e 19):
 - ↳ TNF α portal e IL1 β portal;
 - ↳ IL1 α e IL8 no sangue.

5. DISCUSSÃO

Poucos estudos têm analisado de modo sistematizado um grande número de citocinas e populações celulares em uma casuística com mais de 30 pacientes com hepatite C crônica. Este trabalho avaliou as citocinas e populações celulares obtidas tanto do fígado como do sangue periférico de 51 pacientes com hepatite C crônica comparando-os com os mesmos parâmetros em indivíduos sem hepatopatia. Deve-se considerar que tal avaliação representou a expressão momentânea do ocorrido evolutivamente no organismo infectado cronicamente pelo VHC. No intuito de aprofundar a análise da resposta mediada pelas populações celulares, foram feitas diversas associações entre as mesmas e as citocinas expressas, que são os mediadores “chave” na resposta imune adaptativa à infecção pelo VHC (Heydtmann et al., 2001; Antonaci et al., 2001). Desta forma, procurou-se interpretar os achados à luz do conhecimento atual sobre a imunopatogenia da infecção crônica pelo VHC.

A casuística desta pesquisa foi composta por pacientes que apresentavam principalmente alterações histológicas leves determinadas pelo vírus da hepatite C, com 86 % com fibrose graus 1 e 2 e 78 % dos pacientes com inflamação portal graus 1 e 2. Mas houve 9 pacientes com lesões pré-cirróticas e cirróticas (F5 e F6), que foram utilizados para comparar aos outros com fibrose menos intensa (F1 a F4).

A histopatologia hepática na hepatite C crônica é caracterizada por infiltração de numerosas células mononucleares, que desencadeiam alargamento e fibrose do espaço portal, além de focos de inflamação, apoptose e necrose em lise de hepatócitos em graus variados (Scheuer, 1994; Ishak, 2000). Acredita-se que as

reações inflamatórias são causadas principalmente pela resposta imuno-mediada, já que fígado é considerado um órgão do sistema imune e que diversas células efetoras e moléculas de comunicação entre células da resposta inata e adaptativa estão presentes ou são sintetizadas por ele (Martins, 2001; Racanelli e Rehermann, 2006).

Sabe-se que a frequência global de LTCD4+ e LTCD8+ é maior no fígado do que no sangue periférico, tanto no fígado normal como em algumas infecções virais; além disto, a quantidade de LTCD8+ é maior do que LTCD4+ no fígado normal (Racanelli e Rehermann, 2006; Janeway, 2007b). No fígado dos pacientes com hepatite C crônica estudados, o número de LTCD4+ foi maior do que dos LTCD8+, provavelmente indicando uma resposta imune mais polarizada comandada pelos LTCD4 em resposta ao VHC, em detrimento da resposta citotóxica. Nesses pacientes, os LTCD4+ portaes mostraram correlação com a atividade inflamatória peri portal e lobular e os LTCD4+ lobulares com a atividade lobular. Por outro lado, os LTCD8+ não se correlacionaram com as alterações histopatológicas. Os LTCD4+ têm sido relatados na literatura como o principal componente da atividade necro-inflamatória peri portal do fígado infectado pelo VHC e sua modulação determina a progressão da hepatite C crônica (Mosnier et al., 1993; Ishak, 2000). Os LTCD4+ e LTCD8+ foram as populações celulares dentre as pesquisadas que expressaram significativo aumento no fígado (espaço portal) dos pacientes com hepatite C crônica em relação aos doadores de órgãos. Assim, pode-se supor que a resposta imune nesta casuística foi orquestrada por esses LT (Winnok et al., 1993) e que o principal local dos eventos de resposta imune foi o espaço portal, como também evidenciado por outros autores (Mosnier et al., 1993; Ishak, 2000).

Nos pacientes com hepatite C crônica desse estudo foram analisadas as

populações celulares e as citocinas que poderiam estar interagindo no mesmo sítio hepático. Nesta análise, os LT expressaram citocinas predominantemente de perfil Th1 moduladas por TGF β intra-hepática, como relatado por Taylor et al. (2006). Isto foi evidente devido às correlações significantes entre: LT CD4+ portais com TNF α portal; dos LTCD8+ portais com TGF β portal; dos LT de memória (CD45RO+) portais com TNF α portal e os LT de memória lobulares com IFN γ lobular. Estas últimas correlações dos LT de memória sugerem uma contínua ativação da resposta celular imune nos pacientes cronicamente infectados, à semelhança do que encontraram Murata et al. (2002) no sangue periférico. Estes autores encontraram significativo aumento da produção de IFN γ tanto por LTCD4+ como LTCD8+ no sangue periférico em pacientes com hepatite C crônica em relação a controles saudáveis, prevalecendo a resposta Th1 (Murata et al. 2002). Inclusive, o IFN γ produzido pelos LTCD8+ tinha a capacidade de estimular a produção de TNF α (Murata et al., 2002).

A produção de TNF α é um dos eventos mais precoces da lesão hepática, é o “gatilho” da produção das outras citocinas (Tilg et al., 2006), além de estar implicado na indução de apoptose dos hepatócitos nas hepatites virais (Ding e Yin, 2004). Pode-se inferir que o TNF α detectado nesta pesquisa foi modulado pelos LTCD4+ e, provavelmente, perpetuado pelos LT de memória (Hassan e Reen, 1993). O TNF α nos espaços portais teve participação na lesão hepática em resposta ao VHC, já que foi correlacionado com a atividade inflamatória lobular, como relatado em outros estudos (Brow e Neuman, 2001).

A expressão aumentada de TNF α portal e lobular e de IFN γ lobular nos pacientes com hepatite C em relação aos doadores sem hepatopatia reforça a

implicação destas citocinas na lesão hepática de padrão Th1 na hepatite C crônica.

Por sua vez, a IL2 não se destacou de modo significativo no fígado dos pacientes com hepatite C em relação aos controles e todavia esteve aumentada no sangue periférico. A IL2 lobular dos pacientes com hepatite C crônica teve correlação significativa com as células NK lobulares.

A IL10 portal correlacionou-se com NK portais e o aumento desta citocina pode ter ocorrido na tentativa de inibir a morte celular, como inibição da apoptose relatada em outros trabalhos (Zang e Wang, 2006) além de inibir os fenômenos inflamatórios.

Sabe-se que as células NK atuam através da morte celular por necrose ou apoptose da célula (Winnock et al., 1993) em decorrência da presença do VHC. Todos os pacientes com hepatite C crônica desta pesquisa apresentaram Corpúsculos de Councilman ou corpos acidófilos na biópsia hepática, o que caracteriza a apoptose, fenômeno que pode decorrer da hepatopatia ou do ciclo biológico normal dos hepatócitos. A presença dos LTCD8+ e das células NK não foram expressivas nos pacientes com hepatite C crônica, pois não tiveram correlação com as alterações histopatológicas. Isto ocorreu provavelmente devido à ação das células NK ser mais importante na fase aguda do que na fase crônica da hepatite C e, nesta fase, ela pode ter sido ineficiente para controle do processo (Winnock et al., 1993), permitindo a sobrevivência das células parasitadas pelo VHC.

Tanto os LTCD8+ portais como as células NK lobulares tiveram relação significativa a TGF β do espaço portal e do lobo nos pacientes com hepatite C crônica. De maneira semelhante aos achados de Ray (2003), houve diferença significativa entre o TGF β dos casos e controles tanto no espaço porta como no lobo e também no sangue periférico. Nesta pesquisa, a presença desta citocina no fígado dos pacientes

com VHC não foi relacionada à fibrose o que corrobora os achados de Roulot et al. (1995). Podemos interpretar que como nossa casuística era composta por pacientes que apresentavam lesões histológicas predominantemente leves não houve correlação estatística suficiente entre a fibrose e o TGF β intra-hepático.

Tanto o TGF β como a IL10 têm sido analisados como moléculas imunomodulatórias, que atuam como imunossupressores no fígado (Knolle e Gerken, 2000). Além disto, ambas têm sido descritas como inibidoras da resposta imune e reguladoras da ação de células dendríticas (Racanelli e Rehermann, 2006), tentando estabelecer o equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2 nas doenças crônicas (Yazdanbakhsh et al., 2002). A TGF β portal e lobular pode ter atuado como citocina regulatória nos pacientes com hepatite C crônica (Taylor et al., 2006), tentando estabelecer o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 ao invés de induzir à progressão da fibrose, como relatado por outros autores (Roulot et al., 1995; Nelson et al., 1997).

Nesta pesquisa, a IL10 expressa no espaço porta foi menor do que no lobo nos pacientes com hepatite C crônica, o pode ter sido devido a maior ação anti-inflamatória (Zang e Wang, 2006) no lobo que no espaço porta. Teoricamente a IL10 poderia facilitar a evasão do VHC pela regulação negativa da resposta Th1, além de exercer propriedade anti-fibrogênica resultando em doença hepática com menos fibrose (Minton et al., 2005). Pode-se atribuir à ação anti-inflamatória da IL10 a comparação significativa entre essa citocina no espaço portal e a ausência do folículo linfóide, revelando um menor grau de atividade inflamatória nos pacientes com maior expressão dessa citocina. Nelson et al. (2000; 2003) evidenciaram a redução da fibrose hepática ao administrar esta citocina como tratamento da hepatite C

crônica, mas este tipo de correlação não foi evidenciada nesta pesquisa. A menor expressão da IL10 lobular nos pacientes com hepatite C do que nos doadores de órgãos evidencia a menor ação desta citocina nesta casuística como haviam relatado outros autores (Cacciarelli et al., 1996).

As células NK também têm a capacidade de aumentar as funções das células dendríticas na presença de células hepáticas, mas alguns autores relataram que essa capacidade está comprometida em células NK derivadas de pacientes com hepatite C crônica, onde a produção de IL10 e de TGF β poderia inibir a ação das células dendríticas (Jinushi et al., 2004; Racanelli e Rehermann, 2006). Nesta pesquisa, as células apresentadoras de antígeno, representadas por S100 no espaço porta, tiveram correlação direta com IL10 do espaço portal, ou seja, quanto maior quantidade de IL10, maior a expressão das células apresentadoras de antígeno nesta casuística (Taylor et al., 2006). Como a IL10 tem importante ação inibitória, ela pode ter inibido a função das células S100. Além disto, estas células tiveram uma correlação inversa à hepatite de interface, o que provavelmente determinou menor reação inflamatória no espaço portal dos pacientes com hepatite C crônica.

As S100 se expressaram menos nos pacientes do que nos doadores de órgãos, tanto no espaço portal como no lobo hepático, o que pode sugerir que a falta de reconhecimento do VHC por essas células contribuiu para a persistência da hepatite C, como discutido por vários autores previamente (Longman et al., 2004; Bain et al., 2001; Sarobe et al., 2002; Jinushi et al., 2004). A reduzida apresentação de antígeno aos LT pode ter contribuído para que a maioria das lesões hepáticas dos pacientes com hepatite C desta casuística fossem leves, provavelmente devido a perda ou uma função efetora pobre das APCs (Racanelli e Rehermann, 2006). Discute-se a

possibilidade de que a resposta mediada pelos LTCD4+ possa ser prejudicada pela infecção do VHC nas células dendríticas (Pawlotsky, 2004) e, desta forma, as células apresentadoras de antígenos podem contribuir para a cronicidade da hepatite C (Longman et al., 2004), pois tanto células dendríticas como macrófagos estão diminuídas na infecção pelo VHC (Bain et al., 2001; Sarobe et al., 2002), devido a algumas proteínas virais que inibem a apresentação do antígeno (Taylor et al., 2000).

As células de Kupffer, representadas pelos CD68+ nesta pesquisa, não estiveram aumentadas de forma significativa nos pacientes com hepatite C crônica em relação aos doadores de órgãos, nem se correlacionaram às alterações histológicas nos indivíduos cronicamente infectados. Essas células tiveram correlação direta com TNF α portal e IL4 lobular, citocinas tanto da resposta Th1 como Th2, sendo que nos espaços portais a Th1 que se destacou. Por outro lado, houve uma correlação inversa das células de Kupffer tanto do espaço-portal, como do lobo hepático com a IL10 e a IL6 do lobo hepático, o que poderia refletir a inibição destas células pelas citocinas citadas. Zang e Wang (2006) sugeriram que a IL10 pode inibir as células de Kupffer, dando conta de suas inúmeras ações como citocina anti-inflamatória na hepatite C crônica. Como as células de Kupffer também podem atuar como células apresentadoras de antígenos (Racanelli e Rehermann, 2006), provavelmente o mecanismo de inibição pela IL10 foi semelhante à inibição das S100 acima relatadas.

Entretanto, outra pesquisa evidenciou correlação direta entre a expressão intra-hepática da IL6 e CD68 em indivíduos com hepatite C crônica (Oyanagi et al., 1999). Além disto, maiores níveis de IL6 foram encontrados tanto no fígado (Oyanagi et al., 1999) como no sangue de indivíduos com hepatite C crônica em relação a controles (Cacciarelli et al., 1996; Malaguarnera et al., 1997; Biró et al., 2000; Lapinski, 2001),

sendo que Malaguarnera et al. (1997) correlacionaram a IL6 sérica com o grau de inflamação do fígado em pacientes com VHC crônica. Frente a estas evidências e a falta de correlação da IL6 entre casos e controles, esta citocina não se destaca na participação da resposta imune desta casuística.

A IL4 pode modular a resposta imune em indivíduos com VHC (Cacciarelli et al., 1996), principalmente pela ação Th2. Ela teve maior expressão no lobo dos pacientes com hepatite C crônica do que nos doadores de órgãos. Já no sangue periférico, esta citocina foi menos expressa nos indivíduos com VHC do que nos doadores de sangue, o contrário do que referido por outros autores (Cacciarelli et al., 1996; Malaguarnera et al., 1997; Biró et al., 2000; Lapinski, 2001). Nesta casuística, a IL4 portal pode ter inibido a inflamação dos ductos biliares nos pacientes com hepatite C crônica devido à correlação inversa encontrada, sendo a única associação histológica significativa. É difícil definir quais populações celulares foram envolvidas nesta ação já que as células de Kupffer do espaço portal se correlacionarem a IL4 do lobo; enquanto os LTCD8+ do lobo se correlacionarem a IL4 portal, ou seja, não houve correlação significativa no mesmo local do fígado.

Na comparação entre os pacientes com hepatite C crônica e os doadores de órgãos, encontrou-se significativa expressão de diversas citocinas Th1 (IFN γ lobular, TNF α lobular e portal), Th2 (IL4 lobular) e citocinas regulatórias (IL10 lobular, TGF β portal e lobular). Isto sugere uma complexa interação dessas citocinas no fígado na determinação do processo inflamatório com participação de ambos vértices da resposta imune na hepatite C crônica.

Em relação ao sangue periférico, também houve participação de ambos os vértices da resposta imune nos pacientes com hepatite C, ou seja, maior quantidade

de IL2, IL10, TNF β e TGF β , enquanto menor quantidade de IL4, IL6, IL8, IL1 α e IFN γ do que nos controles. Cacciarelli et al. (1996) encontraram tanto citocinas Th1 como Th2 no sangue periférico de pacientes com hepatite C em comparação com doadores saudáveis, além disto a quantidade das citocinas Th2 era maior do que Th1 nos pacientes com hepatite C.

O aumento da expressão IFN γ , TNF α e IL4 no lobo hepático e TNF α no espaço-porta dos casos quando comparada aos controles, deve-se provavelmente a compartimentalização do sistema imune, uma vez que isto não se repete no sangue periférico. Analisando apenas os pacientes com hepatite C crônica, não houve correlações significantes entre as citocinas do sangue e do tecido hepático nos pacientes com hepatite C crônica, o que corrobora a favor da compartimentalização da resposta nesta casuística. Assim, a resposta intra-hepática comanda o padrão de evolução da doença e indica que a resposta imune no fígado espelha a injúria hepática nos pacientes com hepatite C crônica, diferente do que ocorre no sangue periférico (Minutello et al., 1993; Cerny e Chisari, 1999; Sakai et al., 1999; Exley et al., 2002).

Houve uma correlação direta entre a carga viral do VHC tanto com IL4 como TGF β lobulares, enquanto que houve correlação inversa entre carga viral do VHC e IL2 portal e lobular, sugerindo que a IL2 atuaria no controle da viremia, enquanto que a polarização Th2 aumentaria a carga viral do VHC. Nesta casuística o IFN γ não teve correlação direta com a carga viral do VHC, a semelhança de outras pesquisas desta citocina no sangue (Murata et al., 2002). Cacciarelli et al. (1996) encontraram correlação direta entre os níveis séricos de IL4 e IL10 com a carga viral, ou seja, ambas citocinas diminuía após o tratamento do VHC, sugerindo que o tratamento

reduz a resposta Th2, o que diminui a carga viral do VHC. Porém, não houve significância estatística entre a carga viral do VHC e as citocinas no sangue dos pacientes com hepatite C crônica na pesquisa atual, o que fala a favor da compartimentalização da resposta imune na hepatite C crônica. Além disto, menores cargas virais do VHC se correlacionaram significativamente a maior expressão dos LTCD8+ lobulares, evidenciado a ação citotóxica destas células na inibição da multiplicação do VHC, na tentativa de controlar a infecção (Brown e Neuman, 2001). Para alguns autores os LTCD8+ são a principal célula envolvida na eliminação do VHC (Missale et al., 1996), sua ação defeituosa na fase aguda seria um dos fatores responsáveis pela cronificação da doença (Timme et al. 2001) ou ainda, a imunotolerância ou a exaustão da resposta TCD8+ à alta carga viral do VHC persiste nos indivíduos cronicamente infectados (Cerny e Chisari, 1999). Mosnier et al. (1993), encontraram significante correlação entre LTCD3+, LTCD8+ e viremia. Outros autores correlacionaram a resposta dos LTCD4+ a diminuição da carga viral do VHC (Gerlach et al., 1999), o que não foi evidenciado nesta casuística.

A diferença entre genótipo 1 e não1 (2 e 3) parece influir na resposta Th, já que houve maior expressão de IL4 no espaço portal, além das citocinas regulatórias IL10 e TGF β no sangue dos pacientes com genótipo 1. Das populações celulares envolvidas, as células de Kupffer, tanto no espaço portal como no lobo tiveram maior expressão em pacientes com genótipo 1, o que poderia indicar que esta célula atua como mediador da resposta imune. Os LTCD45RO+ portais tiveram maior expressão nos pacientes com genótipo “não 1”, embora nenhuma citocina tenha se destacado nos indivíduos com genótipos 2 e 3 do VHC.

Houve maior número de pacientes com genótipo 1 que apresentaram lesões

histológicas com menores atividades portais e peri-portais do que o genótipo não 1, já que esta casuística foi composta predominantemente por lesões leves. A fibrose não teve significância com os genótipos do VHC, a semelhança de outras pesquisas (Poynard et al., 1997). Importante destacar, que nesta casuística dos 9 pacientes com genótipo 3, 44% apresentavam lesões pré-cirróticas e cirróticas (F5-F6); nenhum paciente com genótipo 2 tinha lesões F5-F6 e apenas 13% com genótipo 1 apresentaram lesão F5-F6.

Para dar maior consistência à análise dos dados demográficos, as citocinas e populações celulares dos pacientes com hepatite C foram comparadas às dos controles e somente foram levados em conta aqueles em que houve diferença significativa entre os dois grupos.

A IL8 esteve aumentada nos pacientes brancos quando comparada aos negros, o que sugere que ela possa ter prevalecido na resposta imune ao VHC do primeiro grupo. Esse aumento de IL8 teve consistência, pois houve diferença desta citocina que foi menos expressa nos pacientes com hepatite C crônica do que nos controles. Mas sua implicação na progressão da doença como relatado em outras pesquisas (Polyak et al., 2001a) não pode ser interpretado como sendo maior nos brancos do que nos negros apenas com estas informações. Houve também maior expressão de TNF α portal nos brancos do que nos negros, o que pode estar associado a resposta Th1 nesse grupo. A IL1 α no sangue também teve maior expressão nos brancos, assim como nos controles em relação aos pacientes com hepatite C, indicando que sua participação poderia tender a uma resposta favorável na progressão da doença. Mas, como as populações celulares analisadas não se expressaram significativamente, estes dados são insuficientes para afirmar o tipo de modulação da

resposta em relação à “raça”. Não houve associação significativa entre a etnia e a fibrose ou Ishak total como evidenciado em outros trabalhos (Sugimoto et al., 2003), provavelmente devido à reduzida casuística para este tipo de análise. Esses resultados entre os brancos e negros podem decorrer das diferenças biológicas onde os brancos teriam maior resposta Th1. Por outro lado, eles podem refletir informações que partem de uma realidade social, mas que foi concluída como realidade biológica, como discutido por Laguardia (2007), o que invalidaria qualquer interpretação. Apenas trabalhos futuros poderão dar respostas definitivas a esta questão.

Nas mulheres, apenas o $TNF\beta$ no sangue teve expressão singular em relação aos homens, que poderia influir na modulação da resposta ao VHC. Como esta foi a única citocina significativa e seu “rs” foi baixo, não há como definir esta célula como diferencial na resposta imune desta representação de mulheres com hepatite C crônica, mas Gerlach et al. (1999) sugerem que as mulheres tem maior tendência à eliminação espontânea do VHC do que progressão para doença crônica. A citotoxicidade expressa pelas células NK foi maior no gênero masculino, que era maioria nesta casuística, mas estas células não foram significativamente diferentes nos pacientes com hepatite C crônica do que nos doadores de órgãos, e este resultado não nos assegura sobre a importância da citotoxicidade que seria maior nos homens. Não houve associação significativa entre o gênero e a fibrose ou Ishak total.

A idade pode influir na resposta imune frente à infecção pelo VHC (Poynard et al., 1997) e nesta casuística, nos indivíduos de maior idade houve maior expressão de $TNF\alpha$ portal revelando resposta Th1 mais vigorosa ao VHC, provavelmente mediada por linfócitos T CD4+ intra-hepáticos, células que se expressaram de maneira

significante nestes pacientes, e poderiam estar implicadas na progressão da doença, ou seja, valores baixos na idade dos pacientes se correlacionaram a menor expressão de LTCD4+ e valores altos de idade a maior expressão dessas populações celulares. Gerlach et al. (1999) evidenciaram que pacientes com maior idades (41 vs. 30 anos) tinham uma tendência a maior eliminação espontânea do VHC na infecção aguda (discussão sem ser estatisticamente significativa) e esta maior eliminação provavelmente deveu-se a ação efetiva dos LT. A IL1 β no lobo teve correlação inversa à idade, ou seja, quanto maior a idade, menor sua expressão, que também estava diminuída nos pacientes como um todo em relação aos doadores de órgãos evidenciando que esta citocina teria uma relação com a evolução mais benigna da doença.

A IL1 β portal se correlacionou com a hepatite de interface, evidenciando sua ação de mediadora de lesão hepática (Hassan et al., 1997). Por outro lado, a IL1 β lobular estava diminuída nos indivíduos com hepatite C em relação aos doadores de órgãos, podendo refletir que o aumento neste último grupo possa ter sido consequência do trauma sofrido e suas consequências até a retirada do órgão, já que esta citocina responde pela ação inflamatória de fase aguda (Dinarello, 1984). Ela pode também ter sido inibida por outras citocinas nos pacientes com hepatite C, favorecendo a evasão viral e infecção crônica.

Estes dados apontam uma tendência da resposta do hospedeiro com hepatite C crônica ser do tipo Th1, mas ainda são necessárias mais pesquisas dos dados demográficos que são importante ferramenta para compreensão da patogenia da hepatite C crônica.

A despeito da presença das respostas dos LT CD4+ e CD8+ aos antígenos do

VHC, houve a paradoxal persistência do VHC, provavelmente devido à modulação dos sinais que resultaram em maior tolerância imunológica do que destruição do vírus, com a participação de citocinas tanto do perfil Th1 como Th2 (Wang et al., 2003). Na literatura, a expressão de citocinas Th1 como IL2 e TNF α está relacionada com a expressão de doença hepática mais agressiva, enquanto que a expressão de citocinas Th2 como IL10, está relacionada à doença hepática mais branda (Napoli et al., 1996). Nesta pesquisa encontramos a participação das duas respostas, onde o Th1 causa lesão inflamatória do fígado e contribui com a morte celular, enquanto Th2 tenta inibir o dano hepático causado pelas citocinas Th1 (Brown e Neuman, 2001). Pode-se supor que tenha ocorrido uma imunotolerância na resposta dos LT (Crispe e Mehal, 1996) e que ela seja responsável pela ausência da correlação entre as citocinas e a fibrose hepática, pois a maioria da casuística analisada tinha poucos índices de fibrose.

Os resultados acima contribuem para o entendimento da patogênese do VHC na infecção crônica e apontam que os caminhos do estudo da imunidade têm muito a acrescentar. Certamente as conclusões não são respostas plenas, mas hipóteses frente aos resultados e associações obtidas.

6. CONCLUSÕES

Com base em na casuística estudada, conclui-se que na fisiopatologia da hepatite C crônica:

✓ A compartimentalização da resposta imune ao VHC foi evidenciada devido a:

- ➔ o aumento da expressão $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ e IL4 no lobo hepático e $\text{TNF}\alpha$ no espaço porta dos casos quando comparada aos controles, que não se repete no sangue periférico;
- ➔ ausência de correlações significantes entre as citocinas do tecido hepático e do sangue dos pacientes com hepatite C crônica.

✓ o comando da resposta imune na hepatite C crônica nesta casuística foi orquestrado pelos LT CD8+ e principalmente pelos LTCD4+;

✓ o principal local dos eventos de resposta imune foi o espaço portal;

✓ LT CD4+ foram o principal componente da atividade necro-inflamatória peri portal do fígado infectado pelo VHC e sua modulação determinou a progressão da hepatite C crônica;

✓ A maior expressão de LTCD8+ lobulares foi relacionada com menores cargas virais do VHC nesta casuística;

✓ Nas correlações entre citocinas e populações celulares dos pacientes com

hepatite C, foi evidenciada a resposta Th1 mediada por IFN γ e TNF α e modulada pelos LT CD4+, CD8+ e CD45RO+;

- ✓ Células apresentadoras de antígeno (S100) provavelmente inibiram (correlação inversa):

- ➔ Hepatite de interface;
- ➔ Inflamação dos ductos biliares.

- ✓ A correlação das células de Kupffer e o genótipo 1 tanto no espaço-portal como no lobo hepático poderia indicar que esta célula pode ser um mediador da resposta imune;

- ✓ Pacientes com lesões histológicas predominantemente leves tiveram resposta modulada principalmente por citocinas de padrão Th1 representadas por TNF α e reguladas por IL10 e TGF β ;

- ✓ Os pacientes com de genótipo 1 do VHC expressam mais citocinas de padrão Th2 (IL4 no espaço portal) e sofrem a ação das citocinas regulatórias (IL10 e TGF β) do sangue;

- ✓ A TGF β estava aumentada significativamente nos pacientes com hepatite C em relação aos controles, tanto no fígado como no sangue com provável ação imunoregulatória nesta casuística;

- ✓ IL10 revelou ações como citocina anti-inflamatória na hepatite C crônica:

- ➔ inibiu as células de Kupffer (correlação inversa da IL10 no lobo hepático);

↳ inibiu a formação dos folículos linfóides (correlação inversa da IL10 portal).

7. ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento dos Casos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/INFORMADO

TÍTULO: “HEPATITE C CRÔNICA E CITOCINAS – ESTUDO NO SORO E NO FÍGADO, ATRAVÉS DE TÉCNICAS IMUNOHISTOLÓGICAS”

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome:.....

Endereço:.....nº.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:DDD(.....).....

2. NATUREZA E OBJETIVO DO ESTUDO

Estamos estudando a hepatite C porque é uma doença que acontece em todo o mundo, que no Brasil existe em 3 milhões de pessoas e porque ainda não se sabe como esse vírus funciona dentro do corpo humano. Além disso a doença pode ficar grave e levar até a cirrose e ao câncer de fígado. Nós vamos estudar as citocinas, que são substâncias que ajudam o corpo a se defender contra as doenças para tentar descobrir qual delas pode ajudar a destruir o vírus dessa hepatite. Por isto precisamos de você para comparar o grupo com a hepatite C e outro sem a hepatite, para termos certeza de qual substância muda no paciente com a doença.

3. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você tem hepatite C deverá fazer exames de sangue da mesma forma que acontece no Ambulatório de Hepatites, e para esta pesquisa precisaremos de mais 20ml de sangue. A biópsia de fígado, que é a retirada de 2 ou 3 cm do fígado através de uma agulha com anestesia local, seria feita de qualquer jeito para saber se você vai precisar de tratamento ou não, assim não faremos nada além do que é nossa rotina.

4. DESCONFORTOS E RISCOS

Os desconfortos e riscos esperados serão os mesmos de qualquer exame de sangue como dor no local ou inchaço. A biópsia de fígado seria feita mesmo sem esta pesquisa e a chance de ter problemas é muito pequena; mas na hora do exame a agulha pode ir para outro lugar como um vaso de sangue, o pulmão ou a vesícula biliar e complicar o paciente. Se isto acontecer o paciente pode precisar de tratamento internado e até ser operado. É por isto que sempre deixamos em observação no hospital depois de todas as biópsias.

5. BENEFÍCIOS

Você estará ajudando no entendimento do vírus da hepatite C que hoje é um problema de saúde em todo o mundo. Poderemos descobrir qual a substância defende o corpo contra esse vírus e, mais para frente ter a esperança de tratar milhões de pessoas. Ajudando neste estudo você ou seu dependente não terão nenhuma vantagem a mais. O paciente do ambulatório será tratado normalmente nos setores do Hospital das Clínicas que forem precisos.

6. TERMO DE PARTICIPAÇÃO DO PACIENTE

Eu li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas sobre os procedimentos a serem realizados e seus riscos. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Tendo lido cuidadosamente, entendido, e recebido a explicação completa das informações precedentes, a minha assinatura a seguir indica que eu consenti voluntariamente minha participação neste estudo.

Nome do Paciente (letra de forma): _____

Assinatura do Paciente: _____ Data: ____/____/____

Assinatura do Investigador: _____ Data: ____/____/____

Anexo 2 - Ficha de atendimento de doadores de sangue

PESO: _____ Kg ALTURA: _____ m PA: _____ mmHg

CÓDIGO: S=SIM N=NÃO

IDENTIFICAÇÃO:

Data entrevista: _____ Cód. Triagem _____
Nome: _____ Idade: _____ Sexo ()F ()M
Cor ()branca ()preta ()pardo ()amarela ()indígena
Estado civil: _____ Escolaridade: _____
Profissão: _____
Naturalidade: _____
Procedência: _____

ANTECEDENTES

Mórbidos: ()HAS _____ ()DM _____ ()cardiopatia _____ ()CA _____
()tuberculose _____ ()doenças mentais _____ ()DST _____
()etilismo _____ parou há _____
()outros _____

Epidemiológicos: (N) UDEV () outras drogas _____
() preservativo (N) parceiro(a) c/ hepatite () parceiro único _____
(N) múltiplos parceiros: número no último ano _____; na vida _____
() heterossexual (N) homossexual (N) bissexual (N) hemofílico
() parceiro(a) UDEV () acupuntura em _____
() transfusão sg em _____ () cirurgia _____
() tatuagem em _____ () piercing em _____

HÁBITOS

Esporte () _____
Tabagismo () _____
Etilismo () _____
Drogas ilícitas (N) _____
Medicações () _____
Ervas / Chás () _____

EXAMES

Anti-HCV _____
Anti-HBct _____
Ag-HBS _____
Anti-HIV _____
VDRL _____
HTLV I-II _____

Anexo 3 - Termo de Consentimento dos doadores de sangue

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO/INFORMADO

TÍTULO: “HEPATITE C CRÔNICA E CITOCINAS – ESTUDO NO SORO E NO FÍGADO, ATRAVÉS DE TÉCNICAS IMUNOHISTOLÓGICAS”

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome:.....

Endereço:.....nº..

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:DDD(.....).....

2. NATUREZA E OBJETIVO DO ESTUDO

Estamos estudando a hepatite C porque é uma doença que acontece em todo o mundo, que no Brasil existe em 3 milhões de pessoas e porque ainda não se sabe como esse vírus funciona dentro do corpo humano. Além disso a doença pode ficar grave e levar até a cirrose e ao câncer de fígado. Nós vamos estudar as citocinas, que são substâncias que ajudam o corpo a se defender contra as doenças para tentar descobrir qual delas pode ajudar a destruir o vírus dessa hepatite. Por isto precisamos de você para comparar o grupo com a hepatite C e outro sem a hepatite, para termos certeza de qual substância muda no paciente com a doença.

3. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você é doador de sangue sem nenhuma doença no fígado poderá participar desta pesquisa. Nós precisaremos apenas de mais 20ml de sangue para podermos estudar as substâncias chamadas citocinas, que são responsáveis pela resposta inflamatória do fígado na presença de agentes agressores. O sangue colhido será utilizado exclusivamente para esta finalidade e será garantido o sigilo absoluto dos resultados dos exames.

4. DESCONFORTOS E RISCOS

Os desconfortos e riscos esperados serão os mesmos de qualquer exame de sangue como dor no local ou inchaço.

5. BENEFÍCIOS

Você estará ajudando no entendimento da doença causada pelo vírus da hepatite C que hoje é um problema de saúde em todo o mundo. Poderemos descobrir qual a substância defende o corpo contra esse vírus e, mais para frente ter a esperança de tratar milhões de pessoas. Ajudando neste estudo você ou seu dependente não terão nenhuma vantagem a mais.

6. TERMO DE PARTICIPAÇÃO DO DOADOR

Eu li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas sobre os procedimentos a serem realizados e seus riscos. Todas as minhas perguntas foram respondidas.

Tendo lido cuidadosamente, entendido, e recebido a explicação completa das informações precedentes, a minha assinatura a seguir indica que eu consenti voluntariamente minha participação neste estudo.

Nome do Paciente (letra de forma): _____

Assinatura do Paciente: _____ Data: ____/____/____

Assinatura do Investigador: _____ Data: ____/____/____

Anexo 4 - Ficha de levantamento dos doadores de órgãos

Nome do doador:_____RG:_____Idade:_____

Cor / raça ()branca ()preta ()amarela ()parda ()indígena
Gênero ()feminino ()masculino Peso____kg Altura_____m

Nome receptor:_____RG:_____

EXAMES	DATA	EXAMES	DATA
HBSag:		TGO:	
Anti-HBS:		TGP:	
Anti-HBCt:		GGT:	
Anti-VHC:		F. alc.:	
Anti-HIV:		BT: BD:	
HTLV I e II:		Hb: Ht:	
VDRL:		Leuc.:	
Chagas:		Plaq.:	
Toxo IgG:____IgM:____		CPK:	
CMV IgG:____IgM:____		Amilase:	

Anátomo-patológico fígado:_____

Causa da morte:_____

Dias de UTI:_____

Teve parada cardíaco-respiratória: ()não ()sim_____

Uso atual de medicações: ()não ()sim_____

Doenças associadas: ()não ()sim_____

Uso de álcool: ()não ()sim_____

Uso de drogas ilícitas: ()não ()sim_____

Anexo 5 - Tabela de dados demográficos, fatores de risco para aquisição do VHC e tempo de infecção dos 51 pacientes com hepatite C crônica

CASO	IDADE	SEXO ¹	COR ²	UDI ³	COCAÍNA ⁴	TRANSFUSÃO	CIRURGIA	TATUAGEM	TEMPO ⁵
1	27	F	branco	não	não	não	não	não	6
2	25	M	branco	não	não	não	não	não	3?
3	45	M	pardo	não	não	sim	sim	não	20
4	45	M	branco	não	não	sim	sim	não	23
5	22	M	branco	não	não	não	sim	não	5?
6	23	F	branco	não	não	não	não	não	5?
7	52	F	branco	não	não	sim	sim	não	18
8	47	M	preto	não	sim	não	não	não	15
9	24	M	pardo	não	sim	sim	sim	sim	12
10	44	M	pardo	não	não	não	sim	não	20
12	22	F	pardo	não	não	sim	não	não	22
13	25	M	pardo	não	não	sim	não	não	21
14	39	M	pardo	não	não	não	não	não	1?
15	38	M	branco	não	sim	não	não	sim	18
17	32	F	branco	não	não	não	sim	não	14
18	23	M	branco	não	não	não	não	não	4?
19	48	M	pardo	não	não	não	não	não	6?
20	47	F	branco	não	não	não	não	não	14
21	29	M	branco	não	não	não	não	não	6?
22	37	M	branco	sim	sim	não	não	sim	31
23	30	M	pardo	não	não	sim	não	não	30
26	41	F	preto	não	não	sim	sim	não	14
28	22	M	branco	não	não	não	sim	não	11
29	36	M	branco	sim	sim	não	não	não	20
30	42	M	branco	não	sim	não	não	não	10
31	41	M	branco	não	não	não	sim	não	18
33	46	F	pardo	não	não	sim	sim	não	26

continua

conclusão

CASO	IDADE	SEXO ¹	COR ²	UDI ³	COCAÍNA ⁴	TRANSFUSÃO	CIRURGIA	TATUAGEM	TEMPO ⁵
34	52	F	branco	não	não	não	sim	não	26
35	53	F	branco	não	não	sim	sim	não	20
36	50	F	branco	não	não	não	sim	não	30
37	48	M	branco	não	sim	não	não	não	15
39	25	M	branco	não	não	não	não	não	1?
40	59	F	pardo	não	não	não	não	não	6
41	38	M	pardo	não	não	sim	sim	não	13
42	48	M	pardo	não	não	não	sim	não	3
43	31	F	pardo	não	não	não	sim	não	11
44	56	F	branco	não	não	sim	não	não	22
45	20	M	branco	não	não	não	sim	não	21
46	25	M	branco	não	não	sim	não	não	20
47	49	F	pardo	não	sim	sim	sim	não	13
49	27	M	branco	não	não	sim	não	não	26
50	35	M	branco	sim	não	não	sim	não	20
51	46	F	branco	não	não	não	sim	não	16
52	49	F	branco	não	não	sim	sim	não	18
53	56	F	branco	não	não	sim	sim	não	26
54	24	F	branco	não	não	sim	sim	não	23
55	52	F	branco	não	não	sim	sim	não	14
57	45	F	branco	não	não	sim	sim	não	11
58	21	M	branco	não	não	sim	não	não	22
59	28	M	pardo	não	não	não	não	não	1?
60	40	M	branco	não	sim	não	sim	sim	20

1 F: feminino, M: masculino

2 classificação de cor segundo IBGE

3 UDI: usuário de drogas intravenosas

4 uso de cocaína inalatória

5 tempo de infecção pelo VHC estimado em anos

Anexo 6 - Tabela de genótipos do VHC, carga viral do VHC, transaminases e histologia dos 51 pacientes com VHC crônica

CASO	GENÓTIPO VHC	CARGA VIRAL VHC	AST ¹	ALT ²	FIBROSE	INFLAMAÇÃO PORTAL	INFLAMAÇÃO PERI-PORTAL	INFLAMAÇÃO LOBULAR	ISHAK TOTAL
1	1b	551.068	197	399	2	3	1	1	6
2	1b	>850.000	51	66	1	2	0	1	4
3	1b	>850.000	45	62	1	3	3	2	9
4	1b	400.367	76	96	2	2	1	1	6
5	1b	>850.000	33	87	1	1	0	1	3
6	1b	170.762	30	32	2	2	1	1	6
7	1b	124.132	36	52	1	1	0	1	3
8	1b	>850.000	32	50	2	2	1	1	6
9	1b	>850.000	44	60	2	1	1	1	6
10	1b	>850.000	51	54	2	2	1	1	6
12	1b	828.855	39	52	1	2	0	1	4
13	1b	78.414	34	42	1	1	0	1	5
14	1b	120.296	51	84	1	2	1	1	6
15	1b	>850.000	40	80	1	2	1	2	6
17	1b	>850.000	44	52	1	2	1	1	5
18	1b	419.676	45	75	3	2	1	1	7
19	3a	454.501	70	155	1	2	0	0	5
20	3a	49.345	32	43	1	1	0	0	3
21	1b	>850.000	41	38	1	2	1	1	5
22	3a	367.086	32	47	1	2	1	1	5
23	1b		37	62	6	2	1	1	10
26	1a	848	128	231	5	3	1	1	10
28	1a	>850.000	34	69	1	1	0	1	3
29	3a	>850.000	35	54	1	2	1	1	5
30	3a	>850.000	138	175	6	3	2	1	12
31	3a	329.619	37	67	1	2	1	1	5

continua

conclusão

CASO	GENÓTIPO VHC	CARGA VIRAL VHC	AST ¹	ALT ²	FIBROSE	INFLAMAÇÃO PORTAL	INFLAMAÇÃO PERI-PORTAL	INFLAMAÇÃO LOBULAR	ISHAK TOTAL
33	1a	>850.000	52	68	1	2	1	1	5
34	1a	>850.000	195	204	1	2	1	1	8
35	3a	559.136	85	199	6	3	2	2	12
36	1b	>850.000	86	109	6	3	1	1	11
37	3a	595.992	64	69	5	2	2	1	10
39	1a	806.837	33	40	1	2	0	1	4
40	1b	>850.000	142	186	1	1	0	1	3
41	1b	>850.000	43	71	1	2	0	1	4
42	1b	>850.000	100	127	6	2	1	1	10
43	1a	>850.000	46	49	1	1	0	1	3
44	3a	>850.000	48	46	6	3	2	1	12
45	1b	371.134	37	77	1	2	0	1	4
46	1a	>850.000	43	83	1	2	0	1	4
47	1a	>850.000	38	53	1	2	1	1	5
49	2b	>850.000	51	81	3	3	1	1	8
50	1a	562.121	104	97	6	4	3	1	14
51	1b	>850.000	52	72	2	1	0	1	4
52	3a	>850.000	70	67	3	2	1	1	7
53	2a	>850.000	34	37	4	4	2	2	12
54	1b	>850.000	45	78	3	2	1	1	7
55	1b	296.308	52	70	1	1	1	1	4
57	1b	>850.000	51	57	1	2	0	1	5
58	1b	249.030	43	118	1	2	1	1	6
59	1b	>850.000	38	98	1	3	0	0	4
60	1a		44	61	1	1	0	1	3

1 ALT=alanina aminotransferase, VR: 10-35 U/L

2 AST=aspartato aminotransferase, VR: 9-43 U/L

Anexo 7 - Tabela das alterações nos hepatócitos dos 51 pacientes com hepatite C crônica

Nº	DIFUSA	ESTEATOSE LOCALIZADA	MACRO	MICRO	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	REGENERATIVAS		HEMOSSIDERINA	DEGENERACÃO GLICOGÊNICA
						acinar	nódulos		
1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2	0	2	1	0	1	0	0	0	1
3	0	2	1	0	1	1	0	0	1
4	1	3	2	1	1	0	0	0	0
5	0	1	0	1	1	0	0	0	0
6	0	1	1	1	1	0	0	0	0
7	0	1	1	1	1	0	0	0	0
8	0	1	1	1	1	0	0	0	0
9	0	1	0	1	1	0	0	0	0
10	0	1	1	1	1	0	0	0	0
12	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	0	0	0	0	2	0	0	0	0
14	0	1	1	1	1	0	0	0	0
15	0	1	1	0	1	0	0	0	1
17	0	1	0	1	1	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19	0	0	0	0	1	0	0	0	1
20	0	0	0	0	1	0	0	0	0
21	0	0	0	0	1	0	0	1	1
22	0	0	0	0	1	0	0	0	1
23	0	0	0	0	1	0	1	1	0
26	0	1	1	0	1	0	1	0	0
28	0	0	0	0	2	0	0	0	0
29	0	1	0	1	1	0	0	0	0
30	0	1	1	0	1	0	1	0	0
31	0	1	0	1	1	0	0	1	0
33	0	1	1	0	1	0	0	0	0

continua

conclusão

CASO Nº	DIFUSA	ESTEATOSE LOCALIZADA	MACRO	MICRO	ALTERAÇÕES BINUCLEAÇÃO	REGENERATIVAS		HEMOSSIDERINA	DEGENERAÇÃO GLICOGÊNICA
						acinar	nódulos		
34	0	1	1	0	1	0	0	0	0
35	0	2	2	1	1	0	1	0	0
36	1	3	3	1	1	1	1	0	1
37	1	3	1	0	1	0	1	0	0
39	0	1	0	1	1	0	0	0	1
40	1	2	1	0	1	0	0	0	0
41	0	1	1	0	1	0	0	0	0
42	0	1	1	1	1	0	1	0	0
43	0	1	1	0	1	0	0	0	1
44	1	1	1	1	1	0	1	0	0
45	0	1	0	1	1	0	0	0	0
46	0	1	1	0	1	0	0	0	0
47	0	1	1	0	1	0	0	0	0
49	0	0	0	0	1	0	0	0	0
50	1	2	1	1	1	0	1	0	0
51	0	1	1	1	1	0	0	0	0
52	1	2	1	1	1	1	0	0	1
53	1	2	1	1	1	1	0	0	0
54	0	1	1	1	1	0	0	0	1
55	0	1	0	1	1	0	0	0	0
57	0	1	1	1	1	0	0	0	0
58	0	1	1	1	1	0	0	0	0
59	0	1	1	1	1	0	0	0	0
60	0	1	1	1	1	0	0	0	0

Graduação das lesões: 0 ausente, 1 leve, 2 moderado e 3 intenso

Anexo 8 - Tabela das alterações nos sinusóides hepáticos dos 51 pacientes com hepatite C crônica

CASO Nº	HIPERTROFIA KUPFFER	HIPERPLASIA KUPFFER	HEMOSSIDERINA	DILATAÇÃO SINUSOIDAL	NEUTRÓFILOS SINUSOIDAIS
1	1	1	0	1	1
2	1	1	0	1	0
3	1	1	0	1	0
4	1	1	0	2	0
5	1	1	0	1	0
6	2	2	0	1	0
7	1	1	0	1	0
8	1	1	0	1	0
9	1	1	0	1	0
10	1	1	0	1	0
12	1	1	0	1	0
13	1	1	0	1	0
14	1	1	0	1	0
15	1	1	0	1	0
17	1	1	0	1	0
18	1	1	0	1	0
19	1	1	0	1	0
20	1	1	0	1	0
21	1	1	1	1	0
22	1	1	0	1	0
23	1	1	1	1	0
26	1	1	0	1	0
28	1	1	0	1	0
29	1	1	0	1	0
30	1	1	0	1	0

continua

conclusão

CASO Nº	HIPERTROFIA KUPFFER	HIPERPLASIA KUPFFER	HEMOSSIDERINA	DILATAÇÃO SINUSOIDAL	NEUTRÓFILOS SINUSOIDAIS
31	1	1	1	1	0
33	1	1	0	1	0
34	1	1	0	1	0
35	1	1	0	1	0
36	1	1	0	1	0
37	1	1	0	1	0
39	1	1	0	1	0
40	1	1	0	1	0
41	1	1	0	1	0
42	1	1	0	1	0
43	1	1	0	1	0
44	1	1	0	1	0
45	1	1	0	1	0
46	1	1	0	1	0
47	1	1	0	1	0
49	1	1	0	1	0
50	2	2	0	1	0
51	1	1	0	1	0
52	1	1	0	1	0
53	1	1	0	1	0
54	1	1	0	1	0
55	1	1	0	1	0
57	1	1	0	1	0
58	1	1	0	1	0
59	1	1	0	1	0
60	1	1	0	1	0

Graduação das lesões: 0 ausente, 1 leve e 2 moderado

Anexo 9 - Tabela das alterações do espaço-portal dos 51 casos com hepatite C crônica

CASO Nº	PROLIFERAÇÃO DUCTO	NECROSE BILIAR	EDEMA	HEMOSSIDERINA	FOLÍCULO LINFÓIDE
1	0	1	1	0	1
2	0	0	1	0	1
3	0	0	1	0	1
4	0	0	1	0	1
5	0	0	1	0	0
6	0	0	1	0	1
7	0	0	1	0	0
8	0	0	0	0	1
9	0	0	1	0	0
10	1	0	2	0	1
12	0	0	1	0	1
13	0	0	1	0	1
14	0	0	1	0	1
15	0	0	1	0	0
17	0	0	1	0	1
18	0	0	1	0	1
19	0	0	1	0	1
20	0	0	1	0	1
21	0	0	1	1	1
22	0	0	1	0	1
23	1	0	1	1	1
26	0	0		0	1
28	0	0	1	0	1
29	0	0	1	0	0
30	1	0	2	0	1

continua

conclusão

CASO Nº	PROLIFERAÇÃO DUCTO	NECROSE BILIAR	EDEMA	HEMOSSIDERINA	FOLÍCULO LINFÓIDE
31	0	0	1	1	1
33	0	0	1	0	1
34	0	0	1	0	0
35	1	0	1	0	1
36	0	0	2	0	1
37	0	0	1	0	0
39	0	0	1	0	1
40	0	0	1	0	0
41	0	0	2	0	1
42	0	0	2	0	1
43	0	0	1	0	0
44	1	0	1	0	1
45	0	0	1	0	1
46	0	0	1	0	1
47	0	0	1	0	1
49	1	0	1	0	1
50	0	0	2	0	1
51	0	0	1	0	0
52	1	0	1	0	1
53	1	0	2	0	1
54	0	0	1	0	0
55	0	0	0	0	0
57	0	0	1	0	1
58	0	0	1	0	1
59	0	0	1	0	1
60	0	0	1	0	1

Graduação das lesões: 0 ausente, 1 leve e 2 moderado

Anexo 10 - Tabela de correlação entre a expressão das populações celulares no fígado e a idade dos 51 pacientes com hepatite C crônica

POPULAÇÕES CELULARES POR IHQ		IDADE
CD45 porta	rs	0,35
	p	0,012*
CD45 lobo	rs	0,19
	p	0,187
CD4 porta	rs	0,29
	p	0,042*
CD4 lobo	rs	0,12
	p	0,400
CD8 porta	rs	0,20
	p	0,150
CD8 lobo	rs	0,33
	p	0,020*
CD68 porta	rs	0,17
	p	0,231
CD68 lobo	rs	0,10
	p	0,501
S100 porta	rs	0,15
	p	0,296
S100 lobo	rs	0,00
	p	1,000
CD57 porta	rs	-0,14
	p	0,334
CD57 lobo	rs	-0,10
	p	0,496

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

Anexo 11 - Tabela de correlação entre os níveis das citocinas no fígado e no sangue e a idade dos 51 pacientes com hepatite C crônica

IHQ		IDADE	ELISA		IDADE
TNFα porta	rs	0,28	TNFα	rs	0,153
	p	0,047*		p	0,285
TNFα lobo	rs	0	TGFβ	rs	-0,231
	p	0,986		p	0,104
TGFβ porta	rs	0,18	IFNγ	rs	0,234
	p	0,204		p	0,099
TGFβ lobo	rs	0,17	IL1α	rs	0,219
	p	0,229		p	0,123
IFNγ porta	rs	0,12	IL2	rs	-0,019
	p	0,407		p	0,894
IFNγ lobo	rs	-0,01	IL4	rs	0,096
	p	0,964		p	0,505
IL1α porta	rs	0,07	IL6	rs	0,162
	p	0,62		p	0,255
IL1α lobo	rs	0,04	IL8	rs	0,373
	p	0,804		p	0,007
IL1β porta	rs	0,15	IL10	rs	0,075
	p	0,306		p	0,599
IL1β lobo	rs	-0,32	TNFβ	rs	0,117
	p	0,024*		p	0,413
IL2 porta	rs	-0,08			
	p	0,597			
IL2 lobo	rs	-0,2			
	p	0,164			
IL4 porta	rs	0,17			
	p	0,221			
IL4 lobo	rs	0,23			
	p	0,108			
IL6 porta	rs	-0,13			
	p	0,366			
IL6 lobo	rs	-0,05			
	p	0,745			
IL10 porta	rs	0,09			
	p	0,521			
IL10 lobo	rs	-0,05			
	p	0,734			

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

Anexo 12 - Tabela de correlação entre o tempo de infecção pelo VHC e as populações celulares no fígado

POPULAÇÕES CELULARES POR IHQ (N=41)		TEMPO DE INFECÇÃO PELO VHC
CD45 porta	rs	0,13
	p	0,434
CD45 lobo	rs	-0,01
	p	0,958
CD4 porta	rs	0,08
	p	0,638
CD4 lobo	rs	-0,13
	p	0,415
CD8 porta	rs	0,06
	p	0,709
CD8 lobo	rs	0,13
	p	0,421
CD68 porta	rs	0,08
	p	0,631
CD68 lobo	rs	0,01
	p	0,966
S100 porta	rs	-0,15
	p	0,362
S100 lobo	rs	0,18
	p	0,255
CD57 porta	rs	-0,08
	p	0,606
CD57 lobo	rs	-0,24
	p	0,133

rs representa Correlação de Spearman
p<0,05

Anexo 13 - Tabela de correlação entre o tempo de infecção pelo VHC e as citocinas no fígado e no sangue

CITOCINAS POR IHQ (N=41)		TEMPO DE INFECÇÃO PELO VHC	CITOCINAS POR ELISA (N=41)		TEMPO DE INFECÇÃO PELO VHC
TNF α porta	rs	0,18	TNF α	rs	-0,14
	p	0,262		p	0,386
TNF α lobo	rs	0,06	TFG β	rs	-0,09
	p	0,733		p	0,582
TGF β porta	rs	-0,08	IFN γ	rs	-0,21
	p	0,617		p	0,194
TGF β lobo	rs	-0,16	IL1 α	rs	-0,20
	p	0,315		p	0,209
IFN γ porta	rs	-0,12	IL2	rs	-0,01
	p	0,451		p	0,982
IFN γ lobo	rs	0,20	IL4	rs	0,09
	p	0,217		p	0,573
IL1 α porta	rs	-0,12	IL6	rs	-0,18
	p	0,475		p	0,262
IL1 α lobo	rs	0,08	IL8	rs	0,26
	p	0,640		p	0,101
IL1 β porta	rs	0,11	IL10	rs	-0,03
	p	0,490		p	0,876
IL1 β lobo	rs	0,05	TNF β	rs	-0,26
	p	0,745		p	0,095
IL2 porta	rs	-0,02			
	p	0,880			
IL2 lobo	rs	-0,21			
	p	0,198			
IL4 porta	rs	0,04			
	p	0,814			
IL4 lobo	rs	0,05			
	p	0,767			
IL6 porta	rs	-0,04			
	p	0,803			
IL6 lobo	rs	-0,13			
	p	0,430			
IL10 porta	rs	-0,04			
	p	0,814			
IL10 lobo	rs	-0,14			
	p	0,376			

rs representa Correlação de Spearman
p<0,05

Anexo 14 - Tabela de comparação entre as populações celulares no fígado e o gênero dos 51 pacientes com hepatite C crônica

GÊNERO	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Feminino n=21	Média	368	36,49	690,97	46,63	181,41	12,65	125,64	126,17	24,69	2,82	10,44	8,38
	dp	305,48	41,89	454,55	43,02	114,45	12,73	103,91	77,39	20,82	6,36	14,88	7,8
	Mediana	299,2	20,8	558,4	40	198,4	6,4	97,6	100,8	19,2	0	3,2	4,8
Masculino n=30	Média	443,31	30,77	717,23	46,29	207,63	12,37	94,67	89,44	20,91	1,87	34,03	13,01
	dp	281,39	31,2	341,79	24,49	114,08	13,79	108,91	52,1	20,03	3,26	39,88	11,61
	Mediana	375,2	23,2	637,6	42,4	188,8	8	62,4	81,6	17,6	0	20	12
Prova de Mann-Whitney		p0,210	p0,871	p0,444	p0,592	p0,534	p0,946	p0,110	p0,123	p0,527	p0,855	p0,002*	p0,178

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 15 - Tabela de comparação entre as citocinas no fígado e o gênero dos 51 pacientes com hepatite C crônica

GÊNERO	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Feminino n=21	Média	4,495	3,733	3,886	4,952	3,886	3,276	1,295	0,457	1,6	0,229	0,99	1,524	2,209	2,514	0,229	0,99	0,4	1,371
	dp	3,635	2,832	4,19	3,538	5,956	3,097	2,459	0,741	2,147	0,574	1,925	2,115	3,935	1,931	0,574	1,99	0,894	1,773
	Mediana	4,8	3,2	3,2	3,2	1,6	3,2	0	0	0	0	0	0	1,6	1,6	0	0	0	0
Masculino n=30	Média	2,987	3,893	3,467	5,227	2,507	2,453	0,907	0,213	1,12	0,107	1,067	1,813	1,387	2,453	0,107	0,533	0,653	1,227
	dp	2,404	2,932	3,665	4,2	4,597	2,547	1,496	0,695	2,916	0,406	2,462	1,719	1,667	2,131	0,584	0,97	1,314	1,554
	Mediana	3,2	3,2	3,2	3,2	0	1,6	0	0	0	0	0	1,6	0,8	1,6	0	0	0	0,8
Prova de Mann-Whitney		p 0,103	p 0,876	p 0,654	p 0,819	p 0,167	p 0,376	p 0,689	p 0,108	p 0,082	p 0,373	p 0,685	p 0,345	p 0,733	p 0,795	p 0,175	p 0,732	p 0,451	p 0,876

dp é o desvio padrão

p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 16 - Tabela de comparação entre os níveis de citocinas no sangue e o gênero dos 51 pacientes com hepatite C crônica

GÊNERO	ELISA	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
Feminino n=21	Média	76473,43	866402,76	5303,27	1229,65	417199,81	26090,23	10552,78	76396,28	312760,14	19259,62
	dp	142031,52	335864,53	11186,20	1996,99	358397,12	21450,40	25151,05	89545,40	295890,23	36970,93
	Mediana	30196,00	1055833,00	1448,00	0,00	446098,00	26556,00	3821,00	29053,00	376425,00	10571,00
Masculino n=30	Média	56011,73	919359,02	3405,42	1315,66	432795,75	27939,97	10875,07	44812,77	281624,17	15085,43
	dp	155869,92	359989,79	7657,25	4038,38	369788,23	20341,04	34118,80	79158,18	289056,87	33972,48
	Mediana	11979,50	1116691,50	1228,00	0,00	443282,50	22070,00	3425,50	13762,00	143575,00	6690,50
Prova de Mann-Whitney		p0,238	p0,235	p0,508	p0,221	p0,886	p0,694	p0,476	p0,425	p0,503	p0,044*

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de casos e controles

Anexo 17 - Tabela de comparação entre as populações celulares no fígado e a “raça” dos 51 pacientes com hepatite C crônica

RAÇA	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Branca n=34	Média	436,80	38,16	722,26	43,48	200,23	12,14	118,26	107,01	23,11	2,21	24,99	11,34
	dp	309,01	40,60	411,41	22,56	120,22	11,24	121,85	59,60	19,95	5,41	34,89	11,66
	Mediana	353,60	24,80	637,60	39,20	200,80	6,40	79,20	84,00	17,60	0,00	11,20	7,20
Negra n=17	Média	363,29	23,06	674,73	52,33	190,02	13,18	85,74	99,67	21,18	2,35	22,96	10,63
	dp	252,53	20,56	346,20	47,91	103,00	16,91	66,07	77,99	21,36	3,16	32,79	7,50
	Mediana	363,20	17,60	603,20	44,80	144,00	8,00	68,80	92,80	17,60	1,60	11,20	8,00
Prova de Mann-Whitney		p0,523	p0,298	p0,772	p0,952	p0,734	p0,833	p0,555	p0,576	p0,631	p0,204	p0,944	p0,623

dp é o desvio padrão

p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 18 - Tabela de comparação entre as citocinas no fígado e a “raça” dos 51 pacientes com hepatite C crônica

RAÇA	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Branca n=34	Média	3,953	3,859	3,435	5,506	3,435	3,200	1,176	0,376	1,835	0,188	1,129	1,506	1,647	2,635	0,141	0,423	0,482	1,318
	dp	2,590	3,054	4,058	4,059	5,975	3,076	2,204	0,7936	3,029	0,523	2,281	1,714	3,236	2,153	0,606	0,907	0,857	1,549
	Mediana	4,000	3,200	1,600	3,200	0,800	2,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	1,600
Negra n=17	Média	2,918	3,765	4,047	4,329	2,353	1,976	0,847	0,188	0,282	0,094	0,847	2,070	1,882	2,165	0,188	1,318	0,682	1,223
	dp	3,762	2,526	3,492	3,567	3,104	1,921	1,280	0,531	0,846	0,388	2,199	2,174	1,810	1,783	0,531	2,134	1,623	1,836
	Mediana	1,600	3,200	3,200	3,200	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000
Prova de Mann-Whitney		p 0,045*	p 0,878	p 0,359	p 0,184	p 0,830	p 0,206	p 0,990	p 0,424	p 0,021*	p 0,510	p 0,268	p 0,408	p 0,199	p 0,510	p 0,493	p 0,097	p 0,937	p 0,602

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 19 - Tabela de comparação entre as citocinas no sangue e a “raça” dos 51 pacientes com hepatite C crônica

RAÇA	ELISA	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
Branca n=34	Média	77470,15	868888,99	4590,98	1721,40	368506,42	28909,24	12883,37	65685,09	291103,26	19528,50
	dp	177973,36	358054,49	9132,42	3962,18	374971,13	20277,08	36896,86	83826,21	300510,91	42067,65
	Mediana	14719,00	1032410,00	1579,50	0,00	139787,00	28857,00	3672,50	27624,50	92823,50	8832,00
Negra n=17	Média	38371,12	954882,53	3378,70	397,94	542108,82	23716,46	6460,36	42083,06	301128,06	11355,65
	dp	56243,80	329243,49	9613,12	964,45	311855,24	21461,81	7978,25	85222,34	274407,87	10797,31
	Mediana	14719,00	1098126,00	1141,00	0,00	582960,00	17659,00	3821,00	1411,00	300229,00	7761,00
Prova de Mann-Whitney		p0,607	p0,328	p0,190	p0,038*	p0,142	p0,406	p0,748	p0,017*	p0,952	p0,757

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de casos e controles

Anexo 20 - Tabela de comparação dos graus de fibrose entre homens e mulheres com hepatite C crônica

FIBROSE	SEXO				TOTAL	
	Feminino		Masculino			
1	10	47,6%	16	53,3%	26	51,0%
2	3	14,3%	7	23,3%	10	19,6%
3	3	14,3%	2	6,7%	5	9,8%
4	1	4,8%	0	0,0%	1	2,0%
5	1	4,8%	1	3,3%	2	3,9%
6	3	14,3%	4	13,3%	7	13,3%
TOTAL	21	100,0%	30	100,0%	51	100,0%
Prova de Mann-Whitney	p0,535					

Anexo 21 - Tabela de comparação da fibrose e a raça dos 51 pacientes com hepatite C crônica

FIBROSE	RAÇA				TOTAL	
	Branca		Negra			
1	17	50,0%	9	52,9%	26	51,0%
2	5	14,7%	5	29,4%	10	19,6%
3	5	14,7%	0	0,0%	5	9,8%
4	1	2,9%	0	0,0%	1	2,0%
5	1	2,9%	1	5,9%	2	3,9%
6	5	14,7%	2	11,8%	7	13,3%
TOTAL	34	100,0%	17	100,0%	51	100,0%
Prova de Mann-Whitney	p0,612					

Anexo 22 - Tabela de correlação das populações celulares com as trasaminases e a carga viral do VHC dos pacientes com hepatite C crônica

POPULAÇÕES CELULARES POR IHQ		CARGA VIRAL VHC N=49	AST ¹ N=51	ALT ² N=51
CD45 porta	rs	0,06	0,16	0,1
	p	0,686	0,25	0,484
CD45 lobo	rs	0,13	0,17	0,11
	p	0,381	0,229	0,447
CD4 porta	rs	0,01	0,21	0,19
	p	0,924	0,148	0,171
CD4 lobo	rs	0,07	0,27	0,22
	p	0,653	0,055	0,114
CD8 porta	rs	-0,18	0,16	0,11
	p	0,221	0,253	0,429
CD8 lobo	rs	-0,33	0,13	0,15
	p	0,020*	0,376	0,303
CD68 porta	rs	0	0,18	0,13
	p	0,976	0,203	0,348
CD68 lobo	rs	0,04	-0,02	-0,08
	p	0,774	0,876	0,591
S100 porta	rs	-0,12	-0,08	-0,19
	p	0,408	0,57	0,183
S100 lobo	rs	-0,18	-0,28	-0,1
	p	0,222	0,044 *	0,473
CD57 porta	rs	-0,2	-0,21	-0,1
	p	0,174	0,134	0,479
CD57 lobo	rs	-0,09	-0,2	-0,05
	p	0,52	0,148	0,716

1 ALT=alanina aminotransferase

2 AST=aspartato aminotransferase

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

Anexo 23 - Tabela de correlação das citocinas no fígado com as transaminases e a carga viral do VHC dos pacientes com hepatite C crônica

CITOCINAS POR IHQ		CARGA VIRAL VHC (N=49)	AST ¹ (N=51)	ALT ² (N=51)
TNF α porta	rs	0,08	0,16	0,08
	p	0,602	0,253	0,59
TNF α lobo	rs	0,17	-0,04	-0,02
	p	0,244	0,792	0,873
TGF β porta	rs	0,01	0,1	0,16
	p	0,95	0,468	0,253
TGF β lobo	rs	0,35	0,09	-0,07
	p	0,013*	0,519	0,625
IFN γ porta	rs	-0,26	0,03	-0,09
	p	0,075	0,813	0,523
IFN γ lobo	rs	-0,08	-0,23	-0,19
	p	0,607	0,104	0,172
IL1 α porta	rs	0,11	-0,01	-0,06
	p	0,441	0,927	0,655
IL1 α lobo	rs	-0,03	0,11	0,13
	p	0,864	0,44	0,375
IL1 β porta	rs	-0,05	0,09	-0,06
	p	0,731	0,535	0,686
IL1 β lobo	rs	-0,13	0,07	0,04
	p	0,359	0,606	0,755
IL2 porta	rs	-0,28	0,08	0,12
	p	0,049*	0,564	0,41
IL2 lobo	rs	-0,4	-0,12	-0,02
	p	0,004*	0,406	0,891
IL4 porta	rs	0,04	-0,03	-0,09
	p	0,805	0,827	0,514
IL4 lobo	rs	0,3	0,14	-0,03
	p	0,037*	0,337	0,811
IL6 porta	rs	-0,04	-0,26	-0,21
	p	0,777	0,067	0,148
IL6 lobo	rs	0,13	-0,02	-0,11
	p	0,39	0,905	0,428
IL10 porta	rs	-0,1	-0,21	-0,16
	p	0,513	0,137	0,275
IL10 lobo	rs	0,03	-0,03	-0,05
	p	0,867	0,818	0,709

1 ALT=alanina aminotransferase

2 AST=aspartato aminotransferase

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

Anexo 24 - Tabela de correlação das citocinas no sangue com as transaminases e a carga viral do VHC dos pacientes com hepatite C crônica

CITOCINAS POR ELISA		CARGA VIRAL VHC	AST ¹ (N=51)	ALT ² (N=51)
TNF α	rs	0,11	0,19	0,1
	p	0,46	0,171	0,482
TFG β	rs	-0,06	-0,21	0,08
	p	0,686	0,146	0,561
IFN γ	rs	-0,01	-0,07	-0,03
	p	0,98	0,615	0,813
IL1 α	rs	-0,07	-0,03	-0,03
	p	0,64	0,806	0,851
IL2	rs	0,05	0,09	0,12
	p	0,757	0,509	0,385
IL4	rs	-0,06	-0,01	0,11
	p	0,68	0,932	0,425
IL6	rs	0,11	0,11	0,01
	p	0,456	0,43	0,487
IL8	rs	-0,03	0,27	0,23
	p	0,836	0,057	0,101
IL10	rs	0,24	-0,18	-0,16
	p	0,102	0,203	0,267
TNF β	rs	0,16	0,12	-0,01
	p	0,274	0,399	0,935

1 ALT=alanina aminotransferase

2 AST=aspartato aminotransferase

rs representa Correlação de Spearman

Anexo 25 - Tabela de comparação entre as populações celulares no fígado e os genótipos 1 e “não 1” dos 51 pacientes com hepatite C crônica

GENÓTIPO	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
1 n=39	Média	339,98	29,09	630,48	47,51	194,99	13,17	119,06	112,70	21,95	2,13	24,94	11,61
	dp	230,04	31,89	284,64	35,65	117,66	14,67	109,80	64,91	20,13	4,54	36,42	11,13
	Mediana	299,20	17,60	603,20	43,20	188,80	8,00	88,00	94,40	17,60	0,00	11,20	8,00
“não 1” n=12	Média	647,33	46,27	953,20	42,93	202,80	10,27	69,60	78,13	24,13	2,67	22,27	9,47
	dp	350,96	45,10	563,61	23,20	105,00	6,73	91,05	63,32	21,41	5,56	25,12	7,64
	Mediana	497,60	28,80	707,20	34,40	195,20	9,60	36,00	62,40	18,40	0,00	15,20	8,00
Prova de Mann-Whitney		p0,004*	p0,091	p0,067	p0,885	p0,657	p0,973	p0,023*	p0,046*	p0,697	p0,635	p0,920	p0,663

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 26 - Tabela de comparação entre as citocinas no fígado e os genótipos 1 e “não 1” dos 51 pacientes com hepatite C crônica

GENÓTIPO	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
1 n=39	Média	3,405	3,979	3,651	5,575	3,528	2,544	0,779	0,246	1,108	0,205	1,026	1,764	2,051	2,544	0,205	0,861	0,636	1,231
	dp	2,824	2,816	3,577	4,294	5,724	2,740	1,317	0,585	2,297	0,542	2,336	1,935	3,092	2,067	0,654	1,635	1,271	1,534
	Mediana	3,200	3,200	3,200	4,800	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000
“não 1” n=12	Média	4,267	3,333	3,600	3,600	1,600	3,600	2,000	0,533	2,000	0,000	1,067	1,467	0,667	2,267	0,000	0,267	0,267	1,467
	dp	3,695	3,086	4,830	1,544	2,460	2,904	3,136	1,042	3,487	0,000	1,969	1,734	1,269	1,984	0,000	0,623	0,623	1,984
	Mediana	3,200	3,200	2,400	3,200	0,000	3,200	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,800	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,800
Prova de Mann-Whitney		p0,667	p0,503	p0,667	p0,159	p0,444	p0,201	p0,294	p0,392	p0,418	p0,196	p0,740	p0,689	p 0,044*	p0,736	p0,253	p0,281	p0,366	p0,856

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 27 - Tabela de comparação entre citocinas no sangue e os genótipos 1 e “não 1” dos 51 pacientes com hepatite C crônica

GENÓTIPO	ELISA	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
1 n=39	Média	79322,90	949933,53	4207,12	1289,50	449811,21	26257,00	13034,25	55959,26	323562,31	19334,54
	dp	168095,47	351583,47	9745,48	3663,23	365258,08	19037,34	34558,46	90816,50	270668,31	39622,35
	Mediana	14719,00	1135257,00	1228,00	0,00	566073,00	22967,00	3821,00	13407,00	324992,00	8832,00
“não 1” n=12	Média	16058,42	727318,42	4121,15	1250,16	350202,60	30172,58	3293,75	63857,83	199813,17	8580,67
	dp	15780,66	285553,76	7618,10	1973,71	353781,10	25815,73	3789,09	60619,30	338660,56	5251,88
	Mediana	15268,50	607027,50	1667,00	0,09	225393,00	28757,00	2833,00	43778,00	12576,50	7560,50
Prova de Mann-Whitney		p0,419	p0,021*	p0,739	p0,377	p0,491	p0,781	p0,180	p0,160	p0,035*	p0,418

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 28 - Tabela de comparação entre as populações celulares e a presença de folículo linfóide em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

FOLÍCULO LINFÓIDE	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Ausente n=12	Média	453,87	39,20	751,73	65,07	198,00	14,27	95,20	110,40	22,93	4,27	31,73	12,40
	dp	288,96	31,99	315,07	50,35	115,19	15,46	81,78	91,91	20,64	7,79	49,74	10,61
	Mediana	349,60	28,00	712,80	51,20	205,60	5,60	79,20	80,00	17,60	0,00	12,00	12,80
Presente n=39	Média	399,51	31,26	692,47	40,70	196,47	11,94	111,18	102,77	22,32	1,64	22,03	10,71
	dp	294,11	36,96	410,54	23,55	114,92	12,65	114,24	56,60	20,38	3,23	27,78	10,42
	Mediana	363,20	17,60	617,60	38,40	188,80	8,00	68,80	91,20	17,60	0,00	11,20	6,40
Prova de Mann-Whitney		p0,564	p0,296	p0,345	p0,057	p0,850	p0,964	p0,781	p0,689	p0,876	p0,566	p0,956	p0,569

dp é o desvio padrão

n é o número de paciente

Anexo 29 - Tabela de comparação entre as citocinas e a presença de folículo linfóide em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

FOLÍCULO LINFÓIDE	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Ausente n=12	Média	4,400	4,667	2,533	4,533	4,133	3,333	0,533	0,267	1,733	0,133	0,267	1,200	1,067	2,133	0,267	1,067	0,833	1,467
	dp	1,821	3,887	3,086	2,444	7,519	3,304	1,246	0,623	3,304	0,462	0,623	1,688	1,969	1,717	0,924	1,969	0,877	1,440
	Mediana	4,800	3,200	1,600	4,000	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	0,000	0,000	0,800	1,600
Presente n=39	Média	3,364	3,569	3,979	5,292	2,749	2,626	1,231	0,328	1,190	0,164	1,272	1,846	1,928	2,585	0,123	0,615	0,461	1,231
	dp	3,299	2,475	4,035	4,267	4,311	2,634	2,091	0,750	2,399	0,492	2,494	1,926	3,031	2,128	0,432	1,304	1,226	1,700
	Mediana	3,200	3,200	3,200	3,200	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000
Prova de Mann-Whitney		p 0,062	p 0,586	p 0,217	p 0,890	p 0,933	p 0,545	p 0,212	p 0,893	p 0,541	p 0,846	p 0,203	p 0,294	p 0,183	p 0,634	p 0,886	p 0,523	p 0,046*	p 0,432

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 30 - Tabela de comparação entre citocinas no sangue e a presença de folículo linfóide em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

FOLÍCULO LINFÓIDE	ELISA	TNFα	TFGβ	IFNγ	IL1α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNFβ
Ausente n=12	Média	77284,75	839030,33	6645,96	1372,90	308334,37	25451,33	15430,92	60926,83	281530,42	25798,25
	dp	172686,27	337165,59	13103,86	1964,00	427263,07	16519,52	32648,71	73679,08	299257,15	48520,32
	Mediana	21904,00	952966,00	1974,00	0,39	36977,00	22978,50	5431,50	20867,00	94306,50	11575,00
Presente n=39	Média	60484,03	915560,63	3430,25	1251,74	462693,74	27709,69	9299,73	56861,10	298418,54	14036,82
	dp	143507,04	353355,95	7718,35	3664,31	336811,45	21881,86	30061,87	88039,76	290115,13	29848,82
	Mediana	14719,00	1076141,00	1228,00	0,00	566073,00	22967,00	3326,00	19801,00	242212,00	8163,00
Prova de Mann-Whitney		p0,946	p0,386	p0,221	p0,277	p0,091	p0,807	p0,156	p0,781	p0,982	p0,103

dp é o desvio padrão

n é o número de pacientes

Anexo 31 - Tabela de comparação entre populações celulares e inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

INFLAMAÇÃO DUCTO BILIAR	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Ausente n=36	Média	406,00	33,64	661,64	48,27	198,76	13,47	116,67	109,64	25,78	2,98	23,20	11,42
	dp	278,79	32,39	314,23	36,29	111,85	15,11	116,10	69,26	22,06	5,45	33,97	11,71
	Mediana	332,00	23,20	620,80	40,80	190,40	6,40	87,20	88,00	18,40	0,80	11,20	7,20
Presente n=15	Média	427,41	31,89	813,87	42,03	192,21	10,13	85,23	92,37	14,51	0,53	26,99	10,35
	dp	328,15	43,89	522,87	23,77	122,35	6,81	79,97	56,14	12,25	1,31	34,71	6,42
	Mediana	427,20	20,80	651,20	44,80	187,20	12,80	44,80	80,00	12,80	0,00	22,40	12,80
Prova de Mann-Whitney		p0,836	p0,836	p0,396	p 0,549	p0,748	p0,901	p0,336	p0,556	p0,128	p0,037*	p0,500	p0,787

dp é o desvio padrão

*p< 0,05

n é o número de pacientes

Anexo 32 - Tabela de comparação entre citocinas e inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

INFLAMAÇÃO DUCTO BILIAR	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Ausente n=36	Média	3,422	3,911	3,422	4,844	3,289	2,756	0,978	0,222	1,067	0,089	0,933	2,000	2,089	2,756	0,133	0,533	0,689	1,333
	dp	2,512	2,796	3,731	3,678	5,912	2,928	1,635	0,561	2,388	0,372	2,242	1,849	3,103	2,081	0,589	1,325	1,310	1,600
	Mediana	3,200	3,200	2,400	3,200	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	0,800
Presente n=15	Média	4,053	3,627	4,160	5,760	2,560	2,880	1,280	0,533	1,920	0,320	1,280	0,960	0,853	1,813	0,213	1,173	0,213	1,173
	dp	4,096	3,111	4,224	4,477	2,888	2,508	2,580	0,987	3,095	0,662	2,279	1,794	1,801	1,801	0,563	1,760	0,563	1,760
	Mediana	3,200	3,200	3,200	3,200	1,600	3,200	0,000	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000
Prova de Mann-Whitney		p 0,992	p 0,680	p 0,405	p 0,675	p 0,398	p 0,663	p 0,961	p 0,248	p 0,093	p 0,118	p 0,545	p 0,038*	p 0,035*	p 0,115	p 0,375	p 0,063	p 0,171	p 0,620

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 33 - Tabela de comparação entre citocinas no sangue e inflamação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

INFLAMAÇÃO DUCTO BILIAR	ELISA	TNFα	TFGβ	IFNγ	IL1α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNFβ
Ausente n=36	Média	81059,64	917864,07	5595,04	1535,96	435588,17	26168,17	13345,41	64460,50	298919,92	20150,58
	dp	174470,26	347066,56	10679,77	3869,12	371608,54	18711,99	35876,19	93667,31	277830,93	41175,19
	Mediana	15818,50	1103112,00	1557,50	0,00	455752,00	22967,00	3870,50	19090,50	212541,50	8096,00
Presente n=15	Média	24543,13	848808,13	807,33	666,53	404259,61	29602,65	4495,07	41875,13	283704,73	8772,93
	dp	31603,50	356821,74	955,08	1220,11	347838,97	25162,18	6173,56	54725,64	325352,16	4724,27
	Mediana	14169,00	1055833,00	0,79	0,00	281013,00	18530,00	1845,00	19801,00	104279,00	8832,00
Prova de Mann-Whitney		p0,616	p0,374	p0,013*	p0,849	p0,780	p0,836	p0,441	p0,701	p0,549	p0,749

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 34 - Tabela de comparação entre populações celulares e proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

PROLIFERAÇÃO DUCTO BILIAR	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Ausente n=43	Média	356,50	29,10	648,59	46,77	190,44	13,06	110,10	103,52	23,37	2,57	24,07	11,76
	dp	243,21	31,30	286,58	34,95	112,65	14,08	108,82	66,67	21,32	5,10	32,34	10,91
	Mediana	299,20	17,60	617,60	40,00	182,40	6,40	86,40	84,80	17,60	0,00	11,20	8,00
Presente n=8	Média	712,20	54,80	1017,20	44,60	231,20	9,40	93,00	110,20	17,60	0,60	25,60	7,60
	dp	357,55	50,88	672,19	21,03	121,72	6,97	101,72	63,44	12,91	1,19	43,87	6,27
	Mediana	663,20	31,20	823,20	49,60	211,20	8,00	54,40	102,40	21,60	0,00	12,80	6,40
Prova de Mann-Whitney		p0,006*	p0,042*	p0,214	p0,688	p0,306	p0,805	p0,604	p0,679	p0,785	p0,256	p0,630	p0,369

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 35 - Tabela de comparação entre citocinas e proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

PROLIFERAÇÃO DUCTO BILIAR	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
Ausente n=43	Média	3,312	3,944	3,386	5,172	3,237	2,679	0,930	0,223	1,302	0,186	1,079	1,898	1,898	2,381	0,186	0,707	0,577	1,302
	dp	2,736	3,031	3,495	4,129	5,537	2,809	1,570	0,561	2,688	0,519	2,386	1,920	3,009	2,076	0,625	1,534	1,223	1,532
	Mediana	3,200	3,200	3,200	3,200	0,000	1,600	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,600	1,600	1,600	0,000	0,000	0,000	1,600
Presente n=8	Média	5,200	3,200	5,000	4,800	2,200	3,400	1,800	0,800	1,400	0,000	0,800	0,600	0,800	3,000	0,000	0,800	0,400	1,200
	dp	4,168	1,710	5,505	2,566	2,696	2,763	3,360	1,209	2,332	0,000	1,209	1,190	1,209	1,801	0,000	1,209	0,741	2,222
	Mediana	4,000	3,200	4,000	3,200	1,600	2,400	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	2,400	0,000	0,000	0,000	0,000
Prova de Mann-Whitney		p 0,256	p 0,812	p 0,391	p 0,851	p 0,738	p 0,387	p 0,676	p 0,089	p 0,745	p 0,315	p 0,711	p 0,062	p 0,263	p 0,303	p 0,374	p 0,530	p 0,865	p 0,499

dp é o desvio padrão

n é o número de pacientes

Anexo 36 - Tabela de comparação entre citocinas no sangue e proliferação dos ductos biliares em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

PROLIFERAÇÃO DUCTO BILIAR	ELISA	TNFα	TFGβ	IFNγ	IL1α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNFβ
Ausente n=43	Média	69927,79	947749,34	4756,68	1518,41	422764,03	26842,44	12249,00	54122,81	297182,74	17865,58
	dp	161283,85	331693,78	9945,65	3576,54	377455,39	20009,8201	33003,07	87000,31	275959,70	37935,16
	Mediana	13619,00	1098126,00	1316,00	0,00	446098,00	22967,00	3821,00	14117,00	242212,00	8296,00
Presente n=8	Média	34924,88	627750,88	1124,25	0,12	445776,88	28983,63	2644,21	77678,00	279728,75	11099,38
	dp	42105,77	324558,02	757,24	0,27	280334,22	25060,52	2470,32	68412,18	375222,97	6233,36
	Mediana	22437,00	540627,00	1272,50	0,00	439076,50	18096,50	2833,00	65094,50	97760,00	9099,50
Prova de Mann-Whitney		p0,402	p0,036*	p0,337	p0,215	p0,717	p0,917	p0,285	p0,135	p0,534	p0,595

dp é o desvio padrão

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 37 - Tabela de comparação entre as populações celulares e a presença de edema e esteatose em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

POPULAÇÕES CELULARES IHQ (N=51)		EDEMA	ESTEATOSE
CD45 porta	rs	0,26	0,32
	p	0,065	0,020*
CD45 lobo	rs	0,22	0,23
	p	0,119	0,11
CD4 porta	rs	0,08	0,18
	p	0,561	0,218
CD4 lobo	rs	-0,01	0,23
	p	0,946	0,111
CD8 porta	rs	0,09	0,19
	p	0,535	0,185
CD8 lobo	rs	0,08	0,19
	p	0,598	0,169
CD68 porta	rs	0,05	0,25
	p	0,727	0,082
CD68 lobo	rs	0,08	0,08
	p	0,576	0,591
S100 porta	rs	0,04	0,06
	p	0,76	0,69
S100 lobo	rs	-0,02	0,06
	p	0,912	0,666
CD57 porta	rs	-0,01	-0,14
	p	0,944	0,316
CD57 lobo	rs	0,01	-0,09
	p	0,958	0,514

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 38 - Tabela de comparação entre citocinas no fígado e no sangue com a presença de edema no espaço portal de biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

CITOCINAS POR IHQ (N=51)		EDEMA	CITOCINAS POR ELISA (N=51)		IDADE
TNF α porta	rs	0,05	TNF α	rs	-0,02
	p	0,746		p	0,881
TNF α lobo	rs	-0,01	TGF β	rs	-0,13
	p	0,918		p	0,349
TGF β porta	rs	0,08	IFN γ	rs	-0,05
	p	0,573		p	0,734
TGF β lobo	rs	0,28	IL1 α	rs	-0,20
	p	0,043*		p	0,156
IFN γ porta	rs	-0,25	IL2	rs	-0,03
	p	0,081		p	0,850
IFN γ lobo	rs	-0,10	IL4	rs	-0,19
	p	0,487		p	0,192
IL1 α porta	rs	0,09	IL6	rs	-0,10
	p	0,514		p	0,468
IL1 α lobo	rs	-0,20	IL8	rs	-0,09
	p	0,160		p	0,542
IL1 β porta	rs	-0,04	IL10	rs	0,05
	p	0,779		p	0,750
IL1 β lobo	rs	0,09	TNF β	rs	0,11
	p	0,527		p	0,420
IL2 porta	rs	-0,12			
	p	0,411			
IL2 lobo	rs	-0,18			
	p	0,202			
IL4 porta	rs	0,24			
	p	0,083			
IL4 lobo	rs	0,12			
	p	0,398			
IL6 porta	rs	-0,05			
	p	0,690			
IL6 lobo	rs	-0,09			
	p	0,541			
IL10 porta	rs	-0,21			
	p	0,129			
IL10 lobo	rs	-0,15			
	p	0,308			

rs representa Correlação de Spearman

*p< 0,05

n é o número de pacientes

Anexo 39 - Tabela de correlação entre citocinas no fígado e sangue a presença de esteatose em biópsia hepática de 51 pacientes com hepatite C crônica

CITOCINAS POR IHQ		ESTEATOSE EM BIÓPSIA HEPÁTICA	CITOCINAS POR ELISA		ESTEATOSE EM BIÓPSIA HEPÁTICA
TNF α porta	rs	0,36	TNF α	rs	0,02
	p	0,010*		p	0,865
TNF α lobo	rs	-0,14	TGF β	rs	-0,02
	p	0,339		p	0,898
TGF β porta	rs	0,19	IFN γ	rs	0,24
	p	0,187		p	0,091
TGF β lobo	rs	0,19	IL1 α	rs	0,05
	p	0,177		p	0,743
IFN γ porta	rs	0,10	IL2	rs	-0,07
	p	0,475		p	0,620
IFN γ lobo	rs	-0,06	IL4	rs	0,24
	p	0,679		p	0,088
IL1 α porta	rs	0,02	IL6	rs	0,24
	p	0,877		p	0,087
IL1 α lobo	rs	-0,01	IL8	rs	0,35
	p	0,934		p	0,011*
IL1 β porta	rs	0,04	IL10	rs	0,19
	p	0,794		p	0,172
IL1 β lobo	rs	-0,10	TNF β	rs	0,20
	p	0,480		p	0,159
IL2 porta	rs	-0,21			
	p	0,145			
IL2 lobo	rs	-0,08			
	p	0,582			
IL4 porta	rs	0,00			
	p	0,985			
IL4 lobo	rs	0,21			
	p	0,142			
IL6 porta	rs	-0,10			
	p	0,480			
IL6 lobo	rs	-0,24			
	p	0,095			
IL10 porta	rs	0,23			
	p	0,100			
IL10 lobo	rs	-0,01			
	p	0,919			

rs representa Correlação de Spearman

*p<0,05

Anexo 40 - Tabela de comparação entre os genótipos 1 e “não 1” e as alterações da biópsia hepática segundo a classificação de Ishak dos 51 pacientes com hepatite C crônica

FIBROSE	GENÓTIPO VHC				TOTAL	
	1		Não 1			
1	21	53,8%	5	41,7%	26	51,0%
2	10	25,6%	0	0,0%	10	19,6%
3	3	7,7%	2	16,7%	5	9,8%
4	0	0,0%	1	8,3%	1	2,0%
5	1	2,6%	1	8,3%	2	3,9%
6	4	10,3%	3	25,0%	7	13,7%
TOTAL	39	100,0%	12	100,0%	51	100,0%
Prova de Mann-Whitney	p0,131					
INFLAMAÇÃO PORTAL	GENÓTIPO VHC				TOTAL	
	1		Não 1			
1	9	23,1%	0	0,0%	9	17,6%
2	24	61,5%	7	58,3%	31	60,8%
3	5	12,8%	4	33,3%	9	17,6%
4	1	2,6%	1	8,3%	2	3,9%
TOTAL	39	100,0%	12	100,0%	51	100,0%
Prova de Mann-Whitney	p0,018*					
INFLAMAÇÃO PERIportal	GENÓTIPO VHC				TOTAL	
	1		Não 1			
1	15	38,5%	1	8,3%	16	31,4%
2	21	53,8%	5	41,7%	26	51,0%
3	1	2,6%	6	50,0%	7	13,7%
4	2	5,1%	0	0,0%	2	3,9%
TOTAL	39	100,0%	12	100,0%	51	100,0%
Prova de Mann-Whitney	p0,004*					
INFLAMAÇÃO LOBULAR	GENÓTIPO VHC				TOTAL	
	1		Não 1			
0	1	2,6%	2	16,7%	3	5,9%
1	35	89,7%	9	75,0%	44	86,3%
2	3	7,7%	1	8,3%	4	7,8%
TOTAL	39	100,0%	12	100,0%	51	100,0%
Prova de Mann-Whitney	p0,281					

*p< 0,05

Anexo 41 - Tabela de comparação entre a expressão de populações celulares e pacientes com fibrose avançada (F5/F6) e sem fibrose avançada (F1-F4)

ISHAK	IHQ	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
F1-F4 n=42	Média	24,188	2,126	42,948	2,983	12,714	0,798	7,045	6,574	1,543	0,160	1,614	0,752
	dp	15,609	2,374	23,242	2,137	7,425	0,880	7,210	4,140	1,322	0,322	2,238	0,686
	Mediana	19,750	1,200	38,150	2,600	12,600	0,450	4,400	5,450	1,150	0,000	0,700	0,650
F5-F6 n=9	Média	33,144	1,811	49,767	2,522	10,378	0,700	5,167	6,356	0,756	0,060	1,078	0,422
	dp	27,271	1,465	29,402	1,724	5,362	0,545	3,087	4,143	0,684	0,088	1,447	0,342
	Mediana	23,700	1,600	42,700	2,600	11,800	0,500	5,500	5,300	0,600	0,000	0,400	0,300
Prova de Mann-Whitney		p0,444	p0,921	p0,693	p0,647	p0,401	p0,823	p0,843	p0,941	p0,113	p0,505	p0,503	p0,269

dp é o desvio padrão

p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 42 - Tabela de comparação entre a expressão de citocinas e pacientes com fibrose avançada (F5/F6) e sem fibrose avançada (F1-F4)

ISHAK	IHQ	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
		p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
F1-F4 n=42	Média	0,220	0,250	0,205	0,338	0,183	0,180	0,076	0,020	0,093	0,010	0,071	0,119	0,090	0,160	0,010	0,050	0,040	0,086
	dp	0,190	0,186	0,209	0,263	0,332	0,154	0,128	0,047	0,177	0,030	0,150	0,121	0,110	0,134	0,040	0,099	0,078	0,095
	Mediana	0,200	0,200	0,200	0,200	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,050	0,100	0,000	0,000	0,000	0,100
F5-F6 n=9	Média	0,260	0,189	0,333	0,233	0,233	0,160	0,022	0,010	0,033	0,011	0,033	0,044	0,190	0,133	0,000	0,022	0,010	0,056
	dp	0,194	0,136	0,350	0,087	0,300	0,260	0,067	0,033	0,050	0,033	0,071	0,073	0,352	0,087	0,000	0,044	0,033	0,133
	Mediana	0,200	0,200	0,200	0,200	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
Prova de Mann-Whitney		p 0,677	p 0,528	p 0,332	p 0,411	p 0,318	p 0,148	p 0,148	p 0,563	p 0,690	p 0,886	p 0,580	p 0,086	p 0,709	p 0,786	p 0,340	p 0,592	p 0,257	p 0,132

dp é o desvio padrão

p< 0,05

n é o número de pacientes

Anexo 43 - Tabela de comparação entre as citocinas no sangue e pacientes com fibrose avançada (F5/F6) e sem fibrose avançada (F1- F4)

ISHAK	ELISA	TNF α	TFG β	IFN γ	IL1 α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNF β
F1-F4 n=42	Média	60873,12	919867,85	4714,30	1394,25	447718,62	25003,90	12131,13	57699,71	282675,98	18483,74
	dp	157841,19	357598,09	10078,11	3602,30	366965,18	19849,48	33426,26	89942,75	270604,80	38300,58
	Mediana	12252,50	1121677,50	1294,00	0,00	515739,50	18965,50	3672,50	13762,00	174728,50	8765,00
F5-F6 n=9	Média	81069,22	793419,89	1725,64	748,22	326765,13	37325,56	4261,45	58368,56	349366,33	8966,44
	dp	105301,90	293148,69	1457,18	1485,95	336878,64	22260,60	4221,05	53295,61	379273,75	5078,38
	Mediana	30196,00	950156,00	1404,00	0,00	148349,00	42576,00	4927,00	44103,00	182871,00	8296,00
Prova de Mann-Whitney		p0,170	p0,126	p0,843	p0,820	p0,561	p0,092	p0,941	p0,210	p0,786	p0,665

dp é o desvio padrão

p<0,05

n é o número de pacientes

Anexo 44 - Tabela de dados demográficos dos 51 doadores de sangue e IMC

Nº	GÊNERO¹	IDADE	COR²	IMC³
1	M	22	branco	ignorado
2	M	25	pardo	ignorado
3	M	43	branco	ignorado
4	M	33	pardo	ignorado
5	M	23	pardo	ignorado
6	F	28	ignorado	ignorado
7	M	54	branco	ignorado
8	F	22	branco	24
10	F	23	branco	23
11	F	35	branco	20
12	F	36	branco	23
13	F	30	pardo	22
14	M	41	branco	26
15	M	24	branco	23
16	M	27	branco	21
17	F	25	branco	26
18	F	32	branco	25
19	M	36	pardo	27
20	M	27	branco	24
21	M	38	branco	ignorado
22	M	18	pardo	25
23	M	32	preto	22
24	F	53	branco	26
25	M	33	branco	28
26	M	37	pardo	30
29	M	45	branco	ignorado
30	F	39	branco	25

continua

conclusão

Nº	GÊNERO ¹	IDADE	COR ²	IMC ³
31	F	35	preto	24
32	F	33	branco	23
33	M	45	branco	27
34	F	37	preto	ignorado
35	M	52	branco	24
36	M	32	branco	30
38	F	22	pardo	25
39	M	49	pardo	31
40	F	21	pardo	21
41	F	21	preto	25
43	M	23	branco	26
44	M	22	branco	24
45	M	39	pardo	28
46	F	58	branco	33
47	F	31	branco	26
48	F	22	branco	21
49	F	25	pardo	22
50	F	32	branco	21
52	M	48	branco	25
53	M	36	branco	29
54	F	22	pardo	24
55	F	20	branco	19
57	M	42	branco	27
58	M	18	branco	25

1 gênero: F feminino e M masculino

2 cor conforme classificação do IBGE

3 IMC: índice de massa corpórea

Anexo 45 - Tabela de dados demográficos e evolução durante internação na UTI dos 33 doadores de órgãos

Nº	GÊNERO ¹	IDADE	COR ²	IMC ³	DIAS UTI	PCR ⁴	USO DROGA VASOATIVA ⁵	ATB ⁶	TX SG ⁷	CAUSA MORTE ⁸	AST ⁹	ALT ¹⁰
1	F	31	branco	2	9	9	9	9	9	3	1	1
2	F	21	branco	1	6	2	1	1	2	2	1	1
3	M	23	pardo	2	2	2	1	1	2	1	3	1
4	F	33	branco	1	14	2	1	2	2	4	1	1
5	F	59	branco	3	8	1	1	1	1	1	1	1
6	M	24	branco	3	1	2	1	2	2	3	1	1
7	M	39	branco	1	7	2	1	2	2	2	1	1
8	M	28	preto	2	4	9	1	2	1	3	1	1
9	F	20	branco	1	1	2	2	2	1	3	1	1
10	M	30	amarelo	2	3	2	1	2	2	3	1	1
11	F	38	branco	1	2	2	1	1	1	1	2	1
12	F	34	branco	5	7	2	1	2	2	4	1	1
13	M	28	branco	1	9	9	9	9	9	2	9	9
15	F	45	preto	1	2	2	1	1	2	1	1	1
16	F	40	preto	1	11	2	1	2	2	1	1	1
17	F	60	branco	2	1	1	1	2	2	1	1	1
18	F	38	branco	9	?	2	9	9	2	1	1	1
19	M	60	preto	1	4	2	1	1	2	1	1	1
20	F	52	branco	2	2	2	9	9	2	1	1	1

continua

conclusão

Nº	GÊNERO ¹	IDADE	COR ²	IMC ³	DIAS UTI	PCR ⁴	USO DROGA VASOATIVA ⁵	ATB ⁶	TX SG ⁷	CAUSA MORTE ⁸	AST ⁹	ALT ¹⁰
21	F	18	pardo	9	7	2	9	9	2	2	1	1
22	M	32	branco	1	3	2	9	9	2	2	1	1
23	M	46	ignorado	9	?	2	2	9	9	1	1	1
24	M	50	pardo	1	10	2	1	1	2	5	1	4
25	M	22	pardo	1	4	2	9	9	2	2	1	1
26	M	53	preto	2	2	2	1	1	2	1	2	2
27	F	41	branco	2	8	2	1	2	9	1	1	1
28	M	31	branco	1	2	2	1	1	2	1	1	3
29	M	20	branco	2	5	2	9	9	2	2	4	1
30	F	43	branco	1	2	2	2	2	2	1	2	1
31	F	44	branco	2	3	1	1	1	2	1	1	4
32	F	34	branco	1	2	2	1	2	9	2	2	1
33	M	44	preto	1	3	2	1	2	2	1	1	1
34	F	18	branco	3	7	2	1	1	1	3	1	1

1 gênero: F feminino e M masculino

2 cor conforme classificação do IBGE

3 IMC: índice de massa corpórea

4 PCR parada cardíaca respiratória: 1=sim, 2= não, 9=ignorado

5 uso de droga vasoativa durante internação: 1=sim, 2= não, 9=ignorado

6 uso de antibiótico durante internação: 1=sim, 2= não, 9=ignorado

7 recebeu transfusão de sangue: 1=sim, 2= não, 9=ignorado

8 Causa morte: 1 = acidente vascular cerebral, 2 = trauma crânio-encefálico, 3 =ferimento de arma fogo, 4 = aneurisma, 5 = meningite

9 e 10: 1= normal ou menor de 1,5 vezes o LSN; 2= 1,5 LSN; 3=1,6 a 2,0 LSN; 4=2,1 a 3vezes o LSN

Anexo 46 - Tabela de anátomo patológico dos 33 doadores de órgãos

Nº	HEPATÓCITO					SINUSÓIDE		ESPAÇO PORTA	
	Esteatose		Binucleação	Bilirrubina	Corpúsculo Councilman	Dilatação Sinusoidal	Linfocitose Sinusoidal	Inflamação	Edema
	macro	micro							
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1	1	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	1	1	0	0	1	1
5	1	1	1	0	1	1	0	1	1
6	0	0	0	1	0	0	0	1	1
7	0	0	0	1	0	1	0	1	0
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0	0	1	1	1	0
10	1	0	0	1	0	0	0	1	0
11	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12	1	1	1	0	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0	0	1	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	1	0	0	0	0	1	1	0
17	1	0	1	0	0	0	1	1	0
18	1	1	0	0	0	0	0	0	0
19	1	0	1	0	0	1	1	1	1

continua

conclusão

Nº	HEPATÓCITO					SINUSÓIDE		ESPAÇO PORTA	
	Esteatose		Binucleação	Bilirrubina	Corpúsculo Councilman	Dilatação Sinusoidal	Linfocitose Sinusoidal	Inflamação	Edema
	macro	micro							
20	1	0	0	1	1	0	0	1	0
21	2	2	0	0	0	0	0	1	0
22	0	0	0	0	0	0	1	0	0
23	1	1	0	0	0	1	1	1	1
24	0	0	0	0	0	0	0	1	0
25	0	0	0	0	0	0	0	1	0
26	0	0	0	0	0	0	1	2	0
27	0	0	0	0	0	0	1	1	0
28	1	0	0	0	0	0	0	1	0
29	0	0	0	0	0	0	0	1	0
30	1	1	0	0	0	0	0	1	0
31	0	0	0	0	0	0	0	1	0
32	0	0	0	0	0	0	0	1	0
33	0	0	0	0	0	0	0	1	0
34	1	1	0	0	0	1	1	1	0

Graduação da intensidade das alterações anátomo-patológicas: 0=ausente; 1=leve; 2=moderada

Anexo 47 - Tabela de densidade das populações celulares no fígado dos 33 doadores de órgãos

Nº	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
1	13,1	2,5	11,7	2,7	4,6	0,8	1,6	5,6	1,8	0,8	0,1	0,1
2	25	0,7	29,7	1,6	10,6	0,4	3,1	4	2,7	0,4	0,5	0,6
3	10,8	0,8	8,4	2,6	9,9	2,5	1,2	2,4	4,9	0,5	0	0,2
4	10,4	0,8	23,1	1,9	5,2	1,7	4	3,8	7,8	1,2	0	0,2
5	29,5	2,2	24,2	2,7	5,2	0,3	3	3,7	3,8	0,5	1,6	0,3
6	25,5	6,6	28,1	4,7	6,6	1,9	2,1	5,6	3,5	0,4	1,7	0,6
7	28,6	2,5	32,3	3,3	4,6	0,1	11,2	9	3,5	1,2	0,6	0,5
8	14,2	1,9	25,2	2,5	8	2,1	2,5	5,2	1,8	0,3	0,1	0,4
9	16,5	2,7	24,4	1,8	3,2	0	2,7	6,7	3	0,1	0,2	0,3
10	21	1,2	21,4	2,7	0,4	0	6,3	6,2	2,2	0,4	0,6	0,3
11	16,9	1,3	11,5	2,8	0	0	3,2	4,2	1,9	0,2	0,7	0,3
12	26,5	4,6	38,5	3,2	8,9	0,6	12	9,1	5	0,6	2,5	0,4
13	9,1	1,7	4,1	0,4	0,7	0	0,1	3,2	1,3	0,5	0,5	0,3
15	12,9	2,5	19	2,7	2,3	0	5	3,2	6,7	0,5	1,2	0,2
16	25,2	1	13	1,2	9	1,4	4,7	5,4	6,6	1	0,4	0,2
17	34	2,8	26,2	3,9	0	0	6,7	11	6,1	0,4	1,6	0,7
18	19,5	1,5	12,2	1,2	1,7	0	1,9	4	2,9	0,3	0,4	0,2

continua

conclusão

Nº	CD45		CD4		CD8		CD68		S100		CD57	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
19	19,4	3,6	24,5	4,9	1,4	0,7	0,8	3,4	4	0,9	1,8	0,2
20	30,1	1,3	14,7	4,7	2,9	1,5	3,5	5	2,5	0,1	1,4	0,9
21	8,9	1,1	6,7	1,4	1,6	0	1,2	4,6	6,9	0,5	0,4	0,4
22	23	10,5	11,5	2,7	0,8	0	4,5	2,9	5,7	0,8	0,3	0,3
23	15,9	3,1	12,6	1,4	1,5	0,1	2,9	4,8	2,4	0	0,9	0,3
24	19,4	1,1	19,3	1,7	9,3	1,5	2,9	8,3	12	2,3	0,2	0,2
25	14,3	2,4	12,9	1,8	5	1,5	3,5	6,5	8,6	0,6	0,5	0,2
26	15,6	2,5	7,6	0	4,8	0,6	4,8	8,1	0,8	0	2	0,7
27	27,7	1	23,8	0,2	0	0	3,4	6,8	7,2	1,3	0,7	0,2
28	12,9	1,2	13	1,1	1,1	0	4,1	6,8	3,4	0,6	1,2	0,1
29	28,8	3,6	22,1	6,3	13,6	4,3	7,4	7,5	0,6	0	0,9	0,8
30	10,6	2	19,8	0,4	0,2	0,1	1,3	3,6	0,4	0,1	0	0,2
31	16,2	1,7	20,2	1,7	1,5	0,8	7,1	4,3	3,9	0,3	0,5	0,8
32	15	2	21,4	3,1	5,3	1	4,8	8,6	6,1	0,1	0,5	0,7
33	14,4	0,8	9,5	1,1	4,2	3,5	5,8	12,4	2,4	0,3	1,3	0,7
34	17,2	3,6	14,9	1,3	2,6	1,1	3,8	4,6	1,4	0,3	0,5	0,8

Anexo 48 - Tabela de densidade das citocinas no fígado dos 33 doadores de órgãos

Nº	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
1	0,2	0,3	0	0	0,3	0,1	0	0	0	0	0,1	0,3	0	0,1	0	0,1	0	0,2
2	0,7	0,4	0	0,1	0,3	0,1	0,4	0,1	0	0,1	0	0,4	0,1	0,1	0	0	0	0,2
3	0,2	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
4	0,2	0	0,1	0,1	0	0,4	0,1	0,7	0,1	0	0	0,5	0,1	0,3	0	0,2	0	0,1
5	0,5	0	0	0,1	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0,2	0,2	0	0,1	0,1	0
6	0	0,1	0	0,2	0,3	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0
7	0	0	0	0,1	0,3	0	0,3	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0	0,1	0	0,1	0	0,3
8	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0,1
9	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0	0	0,1	0	0,2
10	0	0,1	0	0	0,2	0,1	0	0,1	0	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0	0,1	0	0,1
11	0,3	0,1	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,2
12	0,1	0,2	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0,2
13	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2
15	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0,3	0,1	0,1	0	0	0,3
16	0,1	0	0,2	0,1	0,4	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,2	0,2	0	0	0,2	0,2
17	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0,1	0,1	0,1	0	0,2	0,2	0,2
18	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0,1	0	0,1	0,3	0,5

continua

conclusão

Nº	TNF α		TGF β		IFN γ		IL1 α		IL1 β		IL2		IL4		IL6		IL10	
	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l	p	l
19	0,1	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0	0	0,1	0	0	0	0,2
20	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,1	0	0
21	0	0	0	0,3	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0
22	0,2	0	0,1	0,1	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0,1	0	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,2
24	0,1	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1	0	0	0	0,2	0
25	0,1	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0,1	0	0	0,2	0	0	0	0	0,1	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0	0,2	0	0,1	0	0,2
28	0	0,3	0	0,2	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
29	0	0	0	0,2	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0,1		
30	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4
31	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,3	0	0	0,1	0	0	0	0,1	0	0,2
32	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1
33	0	0,1	0	0,2	0	0	0	0	0,1	0,1	0,5	0	0	0,1	0	0	0	0,7
34	0	0	0,2	0,3	0,4	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0,1	0,5

Anexo 49 - Tabela de concentração das citocinas no sangue dos 51 doadores de sangue

Nº	TNFα	TFGβ	IFNγ	IL1α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNFβ
1	25.196	317.886	0	0	10.578	16.018	11.706	1.135.522	439.933	22.807
2	0	1.050.861	0	0	11.586	126.806	0	41.764	42.348	0
3	0	1.155.790	13.179	0	560.065	85.427	261.967	463.600	0	0
4	15.819	500.957	0	0	141.294	21.357	165.696	313.539	0	0
5	0	254.676	0	0	90.929	12.013	0	166.711	0	0
6	73.331	253.595	0	0	198.248	0	96.997	285.938	0	0
7	81.466	242.782	0	0	0	0	0	60.081	0	0
8	15.819	230.690	0	0	42.513	0	0	160.175	30.320	11.374
10	37.456	551.193	0	0	18.596	137.484	30.640	49.726	0	36.860
11	132.155	524.335	0	0	22.086	32.035	17.390	67.703	0	14.093
12	0	527.207	0	0	53.742	26.696	0	103.467	19.582	0
13	133.374	539.662	0	0	38.511	13.348	0	64.296	16.759	0
14	92.601	550.229	0	0	161.474	21.357	213.687	298.320	18.977	0
15	0	518.126	0	0	158.734	20.022	156.557	478.360	0	0
16	0	548.788	0	0	19.777	58.731	21.869	39.540	0	11.107
17	0	194.785	0	0	21.535	585.977	0	55.538	0	24.950
18	0	521.468	0	0	87.479	307.003	0	164.095	0	0
19	0	519.081	0	0	49.627	33.370	0	97.105	13.332	0

continua

continuação

Nº	TNFα	TFGβ	IFNγ	IL1α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNFβ
20	13.619	1.157.806	0	0	43.522	20.022	0	39.359	0	0
21	85.557	1.158.814	0	0	601.194	0	0	705.496	0	0
22	0	1.121.040	0	0	49.112	16.018	0	88.230	0	0
23	135.820	330.410	0	0	16.628	21.357	0	899.277	0	0
24	136.433	522.900	0	0	20.856	89.431	11.313	52.001	0	21.950
25	25.196	134.231	0	0	0	113.458	0	44.039	0	0
26	0	500.957	0	0	0	89.431	11.546	32.424	0	0
29	0	178.692	0	0	181.574	0	68.874	215.510	0	12.177
30	0	0	0	0	0	0	10.070	107.731	0	0
31	0	0	0	0	137.226	17.352	150.874	156.634	0	0
32	0	0	0	0	105.940	49.387	66.235	163.031	0	0
33	0	0	0	0	19.175	76.083	0	392.468	0	0
34	0	0	0	0	92.653	69.409	0	238.360	0	0
35	0	0	0	0	30.716	30.700	72.830	819.112	915.385	16.163
36	88.486	0	0	85.716	44.531	148.162	0	269.518	0	61.956
38	0	0	0	0	0	142.823	32.808	47.451	0	0
39	0	0	0	0	166.337	60.066	240.293	277.717	10.921	0
40	0	0	0	0	14.529	25.361	109.170	1.843.489	0	0
41	11.433	0	15.720	0	101.423	0	0	193.005	34.285	0

continua

conclusão

Nº	TNFα	TFGβ	IFNγ	IL1α	IL2	IL4	IL6	IL8	IL10	TNFβ
43	0	0	34.359	131.614	42.008	82.757	0	98.378	154.596	0
44	48.152	15.385	0	0	29.679	52.057	0	68.055	0	10.091
45	0	0	0	0	91.504	12.013	0	102.195	0	0
46	0	0	147.242	0	18.243	37.374	0	48.063	0	0
47	0	0	99.072	0	109.807	65.405	0	109.843	14.844	0
48	11.979	0	433.767	0	11.208	21.357	100.740	44.892	10.821	0
49	0	0	0	0	276.386	50.722	216.018	441.610	0	0
50	0	0	0	0	94.386	61.401	58.164	134.229	0	0
52	0	0	11.631	0	11.082	34.705	20.763	777.398	0	0
53	0	0	85.045	0	34.552	13.348	0	122.649	0	0
54	0	0	248.612	0	165.642	46.718	65.056	208.918	12.729	0
55	0	0	94.392	0	332.099	82.757	46.559	492.570	0	0
57	10.886	0	0	0	0	0	0	0.524	0	0
58	0	0	0	0	60.393	105.449	34.307	130.884	0	0

8. REFERÊNCIAS

Abrignani S. Bystander activation by cytokines of intrahepatic T cells in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis.* 1997;17(4):319-22.

Agnello V. Mixed cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Hosp Pract.* 1995;30(3):35-42.

Alberti A, Benvegnu L, Boccato S, Ferrari A, Sebastiani G. Natural history of initially mild chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis.* 2004;36:646-54.

Alberti A, Bortolotti F. Hepatitis C. In: Rodes J, Benhamou J-P, Bircher J, McIntyre N, Rizzetto M. *Tratado de hepatología clínica.* 2ª ed. Barcelona: Masson; 2001. p.1014-36.

Amoroso P, Rapicetta M, Tosti ME, Mele A, Spada E, Buonocore S, Lettieri G, Pietri P, Chionne P, Ciccaglione AR, Sagliocca L. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *J Hepatology* 1998;28:936-44.

Andrade DR, Andrade Junior DR. Imunopatogenia das Hepatites virais. In Veronesi R, Foccacia R., *Tratado de Infectologia* Ed. Atheneu, 1997, pg335-45.

Antonaci S, Piazzolla G, Napoli N, Vella FS, Fiore G, Schiraldi O. Relationship between T lymphocyte responsiveness and T-helper1/T-helper2 type cytokine release in chronic hepatitis C: a critical reappraisal. *Microbios.* 2001;106(415):203-12.

Apolinario A, Majano PL, Alvarez-Perez E, Saez A, Lozano C, Vargas J, Garcia-Monzon C. Increased expression of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relationship with the histological activity of liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(11):2861-70.

Azoscar J, Clavijo OP, Yunis EJ. MHC Class II genes in HCV viral clearance of hepatitis C infected Hispanic patients. *Hum Immunol.* 2003;64:99-102.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705.

Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepó C, Inchauspé G. Impaired Antipresenting function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology.* 2001;120(2):512-24.

Barone AA, Cavaleiro NP, Suematsu S. Response in patients with chronic HCV hepatitis to treatment with interferon-alpha. *Braz J Infect Dis.* 1999;3(3):118-28.

Basic Local Alignment Search Tool. *BLAST search on nucleic acid sequence data bank.* [cited 2003 Jan]. Available from: <http://hepatitis.ibcp.fr>.

Bassit L, Mendes LCA, Silva LC, Carrilho FJ, Fonseca LEP, Pereira AN, Alquezar AS, Alves VAF, Gayotto LCC, Vanderborgh B. Genotipagem do vírus da hepatite C (VHC) em 60 pacientes com hepatite crônica (HC-C) submetidos a tratamento com interferon alfa recombinante (INF). *GED.* 1995;14(4):137.

Bellentani S, Pozzato G, Saccoccio G, Crovatto M, Croce LS, Mazzoran L, Masutti F, Cristianini G, Tiribelli C. Clinical course and risk factors of hepatitis C virus

related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut*. 1999;44(6):874-80.

Bertoletti A, Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology*. 2003;38:4-13.

Bhattacharya R, Shuhart MC. Hepatitis C and alcohol: interactions, outcomes, and implications. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36(3):242-52.

Biró L, Varga L, Pár A, Nemesánsky E, Csepregi A, Telegdy L, Ibrányi E, David K, Horváth G, Szentgorgyi L, Nagy I, Dalmi L, Abonyi M, Fust G, Horányi M. Changes in the acute phase complement component and IL-6 levels inpatients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b. *Immunol Lett*. 2000;72:69-74.

Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Untmaz D, Weiner AJ, Choo Q-L, Shuster J, Kuo G, Bonino F, Houghton M, Abrignani S. T-Lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology*. 1993;104:580-7.

Bozkaya H, Bozdayi AM, Aslan N, Türkay C, Sarioglu M, Cetinkaya H, Akdogan M, Cinar K, Erden E, Köse K, Sentür H, Akkiz H, Sarayalcin S, Yurdaydin C, Uzunalimoglu Ö. Circulationg IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. *Infection*. 2000; 28:309-13.

Brillanti S, Folli M, Gaiani S, Masci C, Miglioli M, Barbara L. Persistent hepatitis C viraemia without liver disease. *Lancet*. 1993;341(8843):464-5.

Brown PMJ, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection:

Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem.* 2001;34:167-71.

Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology.* 1996;24:6-9.

Cacoub P, Poynard T, Ghillani Charlotte F, Olivi M, Piette JC, Opolon P (Multivirc Group). Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2204-12.

Campollo RO. Hepatitis C virus infection and alcohol. *Rev Gastroenterol Mex.* 2002;67(Suppl 2):S80-3.

Carucci P, Gane EJ, Riordan S, Rossol S, Houghton M, Naoumov NV, Williams R. Hepatitis C virus-specific T helper cell responses in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatol.* 1997; 26(Suppl):145.

Cerny A, Chisari FV. Hepatitis C and autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2000;31(3):811-2.

Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology.* 1999;30:595-601.

Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH. Direct interaction of hepatitis C virus core protein with the cellular lymphotoxin-beta receptor modulates the signal pathway of the lymphotoxin-beta receptor. *J Virol.* 1997;71(12):9417-26.

Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1997;100:S19-S24.

Chitturi S, George J. Predictors of liver-related complications in patients with chronic hepatitis C. *Ann Med.* 2000;32:588-91.

Cholet F, Nousbaum JB, Richecoeur M, Oger E, Cauvin JM, Lagarde N, Robaszkiewicz M, Gouerou H. Factors associated with liver steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol Clin Biol.* 2004;28:272-8.

Cohen J. Sixth International Symposium on Hepatitis C and related virus, National Institute of Health. The scientific challenge of hepatitis C. *Science.* 1999;285:26-30.

Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(3):373-9.

Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor- α gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver.* 2002;22(5):404-12.

Cribier B, Schmitt C, Rey D, Lang JM, Kirn A, Stoll-Keller F. Production of cytokines in patients infected by hepatitis C virus. *J Med Virol.* 1998;55(2):89-91.

Crispe IN, Mehal WZ. Strange brew: T cells in liver. *Immunol Today.* 1996;17(11):522-5.

Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, Mosca M, Filliponi F, Brunetto RM, Bonino F, Abrignani S, Valiante NM. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp*

Med. 2002;195(1):35-41.

Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):742-80.

Davis G. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36(Suppl 1):S145-S51.

Delladetsima JK, Makris F, Psychogiou M, Kostakis A, Hatzakis A, Boletis JN. Cholestatic syndrome with bile duct damage and loss in renal transplant recipients with HCV infection. *Liver.* 2001;21(2):81-8.

Diebold SS, Montoya M, Unger H, Alexopoulou L, Roy P, Haswell LE, Al-Shamkhani A, Flavell R, Borrow P, Reis e Sousa C. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature.* 2003;424(6946):324-8.

Dinareello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med.* 1984;311(22):1413-8.

Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* 2004;8(4):445-54.

Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH. Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology.* 2004;126(1):263-77.

Dusheiko G, Schilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap P-L, Sherlock S, McIntyre N, Simmonds P. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of typo-

specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*. 1994;19:13-8.

Einav S, Koziel MJ. Immunopathogenesis of hepatitis C virus in the immunosuppressed host. *Transpl Infect Dis*. 2002;4(2):85-92.

El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2001;5:87-107.

El-Zayadi AR. Heavy smoking and liver. *World J Gastroenterol*. 2006;12(38):6098-101.

EPI Info, version 6.04 [software]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention-Division of Public Health Surveillance and Informatics [cited 2007 May]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm>.

Exley MA, He Q, Cheng O, Wang RJ, Cheney CP, Balk SP, Koziel MJ. Cutting edge: compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J Immunol*. 2002;168(4):1519-23.

Ferri C, Caracciolo F, LaCivita L, Monti M, Longombardo G, Greco F, Zignego AL. Hepatitis C virus infection and B-cell lymphomas. *Eur J Cancer*. 1994;30A(10):1591-2.

Focaccia R, Conceição OJG, Sette-Junior H, Sabino E, Bassot L, Lomar AV, Lorenço R, Souza FV, Kiffer CRV, Santos EB, Gonzales MP, Sáez-Alquezar A, Riscal JR, Chamone D. Estimated prevalence of viral hepatitis in general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz J Infect Dis*. 1998;2:269-84.

Friedman LS. Controvérsias em biópsia hepática: quem, onde, quando, como e por quê. *Curr Gastroenterol Rep Bras*. 2004;2:73-9.

Gane EJ, Naoumov NV, Qian KP, Mondelli MU, Maertens G, Portmann BC, Lau JY, Williams R. A longitudinal analysis of hepatitis C virus replication following liver transplantation. *Gastroenterology*. 1996;110(1):167-77.

Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4+ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999;117:933-41.

Giannini C, Bréchet C. Hepatitis C virus biology. *Cell Death Differ*. 2003(10):S27-38.

Girard S, Shalhoub P, Lescure P, Sabile A, Misek DE, Hanash S, Brechet C, Beretta L. An altered cellular response to interferon and up-regulation of interleukin-8 induced by the hepatitis C viral protein NS5A uncovered by microarray analysis. *Virology*. 2002;295(2):272-83.

Gonzalez-Peralta RP, Davis GL, Lau JY. Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 1994;21:255-9.

Gowans EJ. Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis*. 2000;20:85-102.

Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol*. 2005;15(4):235-68.

Gruner NH, Gerlach TJ, Jung MC. Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1528-36.

Haruna Y, Hayashi N, Hiramatsu N, Takehara T, Hagiwara H, Sasaki Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Detection of hepatitis C virus RNA in liver tissues by an in situ hybridization technique. *J Hepatol.* 1993;18(1):96-100.

Hassan G, Moreno S, Massimi M, Di Biagio P, Stefanini S. Interleukin-1-producing plasma cells in close contact with hepatocytes in patients with chronic active hepatitis. *J Hepatol.* 1997;27(1):6-17.

Hassan J, Reen DJ. Neonatal CD4+ CD45RA+ T cells: precursors of adult CD4+ CD45RA+ T cells? *Res Immunol.* 1993;144(2):87-92.

Heydtmann M, Shields P, McCaughan G, Adams D. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14:279-87.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico 2000. População residente por cor ou raça, segundo a situação de domicílio e os grupos de idade - Brasil [citado jan 2007]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default_censo_2000.shtm

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. População estimada município de São Paulo em 1/07/2005. [citado jan 2007]. Disponível em: <http://www.ibge.org.br/cidades/default.phd>.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Grudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1995;22:696-9.

Ishak KG. Pathologic features of chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:40-55.

Janeway CA, Tavares P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. Tradução Ana Cristina Arámburu da Silva, Cristina Bonorino, Denise Cantarelli Machado, Gaby Renard, Isabel Cristina Ribas Werlang, Moisés Evandro Bauer. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007a. Cap. 1, p.37-101: Imunidade Inata.

Janeway CA, Tavares P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. Tradução Ana Cristina Arámburu da Silva, Cristina Bonorino, Denise Cantarelli Machado, Gaby Renard, Isabel Cristina Ribas Werlang, Moisés Evandro Bauer. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007b. Cap. 1, p.1-36: Conceitos básicos em Imunologia.

Janeway CA, Tavares P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. Tradução Ana Cristina Arámburu da Silva, Cristina Bonorino, Denise Cantarelli Machado, Gaby Renard, Isabel Cristina Ribas Werlang, Moisés Evandro Bauer. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007c. Cap. 10, p.409-31: Imunidade Adaptativa contra a infecção.

Janeway CA, Tavares P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. Tradução Ana Cristina Arámburu da Silva, Cristina Bonorino, Denise Cantarelli Machado, Gaby Renard, Isabel Cristina Ribas Werlang, Moisés Evandro Bauer. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007d. Cap. 8, p.319-61: Imunidade Mediada por Células T.

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2004;15;173(10):6072-81.

Kaasprzak A, Zabel M, Biczysko W, Wysocki J, Adamek A, Spachacz R, Surdyk-Zasada J. Expression of cytokines (TNF- α , IL-1 α , and IL-2) in chronic hepatitis C: comparative hybridocytochemical and immunocytochemical study in children and adult patients. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52:29-38.

Kamal SM, Graham CS, He Q, Bianchi L, Tawil AA, Rasenarch JW, Khalifa KA, Massoud MM, Koziel MJ. Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responder in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. *J infect Dis.* 2004;189:1140-50.

Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45(4):183-91.

Kerr JFR, Searle J, Halliday WJ, Roberts I, Cooksley WGE, Halliday JW, Holder L, Burnett W, Powell LW. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet.* 1979;20:827-8.

Kishihara Y, Furusyo N, Kashiwagi K, Mitsutake A, Kashiwagi S, Hayashi J. Human T lymphotropic virus type I infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis.* 2001;184:1114-9.

Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev.* 2000;174:21-34.

Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology.* 1996;23(4):695-9.

Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Hiugton M, Ralston R, Walker BD. Intrahepatic cytotoxic T Lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol.* 1992;149(10):3339-44.

Koziel MJ. Cytokine in viral Hepatitis. *Semin Liver Dis.* 1999;19(2):157-69.

Kumar D, Farrll GC, Fung C, George J. Hepatitis C virus genotype 3 is cytopathic to hepatocytes: reversal of hepatic steatosis after sustained therapeutic response. *Hepatology.* 2002;36:1466-72.

Laguardia J. Race and epidemiology: strategies to build on biological differences. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2007;12(1):253-61.

Lapinski TW. The levels of IL-1 beta, IL-4 and IL-6 in the serum and the liver tissue of chronic HCV-infected patients. *Arch Immunol Ther Exp. (Warsz)* 2001;49(4):311-6.

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000;191(9):1499-512.

Lepe R, Layden-Almer JE, Layden TJ, Cotler S. Ethnic differences in the

presentation of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2006;13(2):116-20.

Lindenbach BD, Rice CM. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature.* 2005;436(18):933-8.

Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood.* 2004;103(3):1026-9.

MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKierman S, William H, Hegarty J, Curry M, Mills KHG. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis.* 2002;185:720-7.

Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Giorgi M, Morrica A, Pistello M, Cammarota G, Marchi S, Ciccorossi P, Bionda A, Bendinelli M. Differences in hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gen Virol.* 1997;78(Pt 7):1521-5.

Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology.* 1997;25:1527-38.

Malaguarnera M, Di Fazio I, Laurino A, Ferlito L, Romano M, Trovato BA. Serum interleukin 6 concentrations in chronic hepatitis C patients before and after interferon-alpha treatment. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1997;35(9):385-8.

Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Pazienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection.

Cytokine. 2004;25:103-9.

Marcellin P, Alberti A, Dusheido G, Esteban R, Manns M, Shouval D, Weiland O, Williams R. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C: Paris; 1999. Consensus Statement. *J Hepatol*. 1999;30:956-61.

Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36:S47-S56.

Martins EBG. O fígado e o sistema imunológico. In: Gayotto LCC, Alves VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Atheneu; 2001. p.93-101.

McGarvey MJ, Houghton M, Weiner AJ. Structure and molecular virology. In: Zuckerman AJ, Toma HC, editors. *Viral hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998. p.253-70.

Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C vírus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant vírus supergroups. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:2057-61.

Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC, Underwood JC, Cannings C, Wilson AG; Trent Hepatitis C Study Group. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. *Hum Immunol*. 2005;66(2):127-32.

Minutello MA, Pileri P, Unutmaz D, Censini S, Kuo G, Houghton M, Brunetto MR, Bonino F, Abrignani S. Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4+ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in

patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med.* 1993;178(1):17-25.

Missale G, Bertoni R, Lamonarca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi GM, Houghton M, Ficcadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest.* 1996;98:706-14.

Mizukoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol.* 2001;36:799-808.

Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchison JG, Wright TL. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis c-related fibrosis. *Hepatology.* 2004;39:826-34.

Mosnier JF, Degott C, Marcellin P, Hénin D, Erlinger S, Behamou JP. The intraportal lymphoid nodule and its environment in chronic active hepatitis C: an immunohistochemical study. *Hepatology.* 1993;17:366-71.

Mosnier JF, Pham BN, Scoazec JY, Dubois S, Marcellin P, Martinot-Peignoux M, Degos F, Erlinger S, Degott C. Relationship between the effector T-cell response and viremia in symptomatic chronic hepatitis C. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:416-22.

Murata M, Nabeshima S, Maeda N, Nakashima H, Kashiwagi S, Hayashi J. Increased frequency of IFN-gamma-producing peripheral CD8+ T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2002;67(2):162-70.

Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, Gao FX, Xia G, McQuillan G, Margolis

HS. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology*. 2006;131(2):478-84.

Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific CD4+ T cells: do they help or damage? *Gastroenterology*. 1999;117(4):1012-4.

Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GN. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology*. 1996;24:749-65.

Negro F. Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2006;12(42):6756-65.

Nelson DR, Gonzales-Peralta RP, Qian K, Xu Y, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. Transforming growth factor-beta 1 in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 1997;4(1):29-35.

Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis LG. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology*. 2000; 118:655-60.

Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, Cabrera R, Liu C, Davis GL. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology*. 2003;38(4):859-68.

Neuman, MG, Benhamou JP, et al. Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. *J Viral Hepat*. 2002;9:134-140.

Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal BB, Oppenheim JJ. Human Interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol.* 1985;135: 3962-8.

Oyanagi Y, Takahashi T, Matsui S, Takahashi S, Boku S, Takahashi K, Furukawa K, Arai F, Asakura H. Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C. *Liver* 1999;19(6):464-72.

Pawlowsky JM. Pathophysiology of hepatitis C infection and related liver disease. *Trends Microbiol.* 2004; 12(2): 96-102.

Pessione F, Ramond M-J, Njapoum C, Duchatelle V, Degot C, Erlinger S, Rueff B, Valla D-C, Degos F. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2001;34:121-5.

Peters M. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology.* 1996;23(4):909-16.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petrarca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998;282:938-41.

Polyak SJ, Khabar KS, Paschal DM, Ezelle HJ, Duverlie G, Barber GN, Levy DE, Mukaida N, Gretch DR. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. *J Virol.* 2001a;75(13):6095-106.

Polyak SJ, Khabar KS, Rezeiq M, Gretch DR. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon

therapy. *J Virol.* 2001b;75(13):6209-11.

Polyak SJ. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. *Clin Liver Dis.* 2003;7:67-88.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet.* 1997;22:825-32.

Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006;43:S54-62.

Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sarkar C, Girish R, Dar L, Seth P, Boor S. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: In vivo and in vitro findings. *J Gastroent Hepatol.* 2003;18:393-403.

Reddy KR, Hoofnagle JH, Tong MJ, Lee WM, Pockros P, Heathcote EJ, Albert D, Joh T. Racial differences in responses to therapy with interferon in chronic hepatitis C. Consensus Interferon Study Group. *Hepatology.* 1999;30(3):787-93.

Rehermann B, Chang K-M, McHutchison JG, Kokka R, Houghton M, Chisari F. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 1996; 98:1432-40.

Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis.* 2000;20:127-41.

Roque-Afonso AM, Ducoulombier D, Di Liberto G, Kara R, Gigou M, Dussaix E, Samuel D, Feray C. Compartmentalization of hepatitis C virus genotypes between plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.* 2005;79(10):6349-57.

Roulot D, Durand H, Coste T, Rautureau J, Strosberg AD, Benarous R, Marullo S. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 messenger RNA in the liver of patients with chronic hepatitis C. Absence of correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology*. 1995;21:298-304.

Rubia-Brandt L, Fabris P, Pasganin S, Leandro G, Male P-J, Giostra E, Carlotto A, Bozzola L, Smedile A, Negro F. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut* 2004;53:406-12.

Sakai A, Kaneko S, Honda M, Matsushita E, Kobayashi K. Quasispecies of hepatitis C virus in serum and in three different parts of the liver of patients with chronic hepatitis. *Hepatology*. 1999;30(2):556-61.

Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbil Rev*. 2001;14(4):778-809.

Sanchez Avila JF. Hepatitis C and addictions. *Rev Gastroenterol Mex*. 2002;67(Suppl 2):S84-7.

Sarobe P, Lasarte JJ, Zabaleta A, Arribillaga L, Arina A, Melero I, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. *J Virol*. 2003;77(20):10862-71.

Scheuer PJ. Viral hepatitis. In: Mac Sween RNM, Antoni PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portman BC, editors. *Pathology of the liver*. 3rd ed. Madrid: Churchill Livingstone; 1994, cap. 6, p.243-67.

Schiff E. The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am J Med*.

1999;107(6B):95S-9.

Sharma P, Balan V, Hernandez J, Rosati M, Williams J, Rodriguez-Luna H, Schwartz J, Harrison E, Anderson M, Byrne T, Vargas HE, Douglas DD, Rakela J. Hepatic steatosis in hepatitis C virus genotype 3 infection: does it correlate with body mass index, fibrosis, and HCV risk factors? *Dig Dis Sci*. 2004;49(1):25-9.

Shimoda K, Begum NA, Shibuta K, Mori M, Bonkovsky HL, Banner BF, Barnard GF. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1998;28(1):108-15.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfone P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky J-M, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Heinz-Jürgen T, Winer AJ, Widell A. Consensus Proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):963-73.

Simmonds P, Holmes EC, Cha T-A, Chan S-W, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*. 1993;74:2391-9.

SPSS Incorporation. SPSS for Windows. *Statistical Package for the Social Sciences*. Release 12.0 Chicago: SPSS Inc; 2002.

Sugimoto k, Stdanlick J, Ikeda F, Brensinger C, Furth EE, Halter HJ, Chang K-M. Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response. *Hepatology*. 2003;37:590-9.

Takaki A, Wiese M, Geert M, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med*. 2000;6(5):578-82.

Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*. 2006;117(4):433-42.

Taylor DR, Shia ST, Lai MMC. Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes Infect*. 2000;2:1743-56.

Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res*. 2006;69(3):129-41.

Thimme R, Oldach D, Chang K-M, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2001;19:1395-406.

Thung SN, Gerber MA. Liver. In: Sternberg SS, editor. *Histology for pathologists*. 2nd ed. Philadelphia: Lippicott-Raven; 1997. p.575-91.

Thursz MR, Thomas HC, Path FRC. Host factors in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis*. 1997;17:345-50.

Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int*. 2006;26(9):1029-39.

Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serun

levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103:264-74.

Travassos C, Williams D R. The concept and measurement of race and their relationship to public health: a review focused on Brazil and the United States. *Cad Saúde Pública*. 2004;20(3):660-78.

Tsukamoto H. Cytokine regulation of hepatic stellate cells in liver fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23:911-6.

Vento S, Cainelli F. Does hepatitis C virus cause severe liver disease only in people who drink alcohol? *Lancet Infect Dis*. 2002;2(5):303-9.

Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol*. 2003;64(7):662-73.

Weibel ER. *Stereological methods*. Practical methods for biological morphometry. London: Academic Press, 1979. v. 1.

Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology*. 2003;37:577-89.

Winnock M, Barcina MG, Lukomska B, Bioulac-Sage P, Balabaud C. Liver-associated lymphocytes: role in tumor defense. *Semin Liver Dis*. 1993;13(1):81-92.

Yamashiki M, Nishimura A, Takase K, Nakano T, Kosaka Y. Effects of the streptococcal preparation OK-432 on in vitro cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic viral hepatitis. *J Clin Lab Immunol*.

1992;38:73-82.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002;296(5567):490-4.

Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology*. 2001;33:708-12.

Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):223-35.

Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(11):1681-5.

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](#)