



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**PERFIL DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM HEPATITE C
E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA**

JANAINA LEITÃO VILAR

FORTALEZA
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**PERFIL DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM HEPATITE C
E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara

Mestranda: Janaina Leitão Vilar

**FORTALEZA
2006**

V747p Vilar, Janaina Leitão

Perfil de autoanticorpos em pacientes com hepatite C e a influência do tratamento com interferon-alfa e ribavirina/
Janaina Leitão Vilar. 2006.

100 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina.

1. Hepatite C Crônica. 2. Auto-Imunidade. 3. Auto-Anti-
corpos. 4. Interferon Alfa. 5. Ribavirina. I. Título.

CDD 616.3623

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**PERFIL DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM HEPATITE C
E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA**

JANAINA LEITÃO VILAR

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em 30 de novembro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Soraya de Farias Sales
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. José Milton de Castro Lima
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara (Orientadora)
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – Universidade Federal do Ceará

*Aos meus filhos,
Clara e Arthur.*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve, realmente, grandes parceiros, sem os quais sua execução seria impossível. Por isso, os agradecimentos nesta dissertação são, além de sinceros, indispensáveis!

A Deus, que se faz presente em todos os âmbitos da minha vida e que é a explicação para muitos dos mistérios do mundo que não conseguimos compreender.

Aos pacientes, que mesmo passando por um momento difícil e desgastante, extrapolaram o exercício de seu papel e foram, além de pacientes, amigos e incentivadores. Torço por uma melhora da qualidade de vida de todos eles!

A todas as outras personagens que fizeram parte desse cenário, meu muito obrigada:

À minha família...





À minha orientadora Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara, aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, aos funcionários da UFC, aos colegas e às instituições parceiras...



Aos amigos para toda a vida...



"Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito." **(Aristóteles)**

RESUMO

A hepatite crônica pelo vírus C tem sido associada à produção de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA). Apesar do aumento do número de pesquisas nessa área, ainda não existe um consenso entre quais autoanticorpos têm seus níveis elevados devido ao tratamento combinado de interferon e ribavirina, nem sua influência no desfecho do mesmo ou a relevância clínica da presença desses autoanticorpos no organismo do pacientes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de NOSA em pacientes com hepatite C crônica atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e submetidos à terapia combinada de interferon-alfa e ribavirina. Para isso, um total de 34 pacientes com hepatite C foram estudados. Os anticorpos anti-nuclear (FAN), anti-músculo liso (SMA), anti-microsomal de fígado e rim do tipo 1 (LKM-1) e anti-mitocôndria (AMA) foram detectados através de imunofluorescência indireta. A presença de NOSA foi relacionada a variáveis clínicas e epidemiológicas e à resposta ao tratamento. Os pacientes foram classificados, em relação à resposta ao tratamento, como não respondedores, recidivantes ou respondedores (resposta virológica sustentada). Em nosso estudo, 23 pacientes foram NOSA reagentes (SMA foi detectado em 6 pacientes, SMA e AMA em 10 e SMA, AMA e FAN em 7). Na 24ª semana de tratamento, 24 pacientes foram NOSA reagentes (SMA foi detectado em 4 pacientes, SMA e AMA em 10, FAN e SMA em 1, FAN e AMA em 1 e SMA, AMA e FAN em 8). A variação dos títulos dos autoanticorpos durante o tratamento não foi significativa. O percentual total de respondedores foi de 26,5% (9/34). A resposta virológica sustentada foi obtida por 17,4% (4/23) dos pacientes NOSA reagentes e 45,5% (5/11) dos pacientes não reagentes para NOSA. A presença de autoanticorpos não foi associada a gênero, idade, genótipo viral ou níveis de transaminases. Conclui-se que o FAN foi o único NOSA significativamente associado à resposta à terapia. A ausência de NOSA indica uma tendência à resposta virológica sustentada no tratamento da hepatite C crônica.

Palavras-chave: hepatite C crônica, auto-imunidade, auto-anticorpos, interferon alfa, ribavirina.

ABSTRACT

Chronic hepatitis C has been associated with non-organ-specific autoantibodies (NOSA) production. Despite of increasing number of researches about this subject, there is no agreement among the authors of which autoantibodies are produced during combined therapy of interferon and ribavirin or the clinical relevance of NOSA in patient's organism. Our aim was to evaluate the profile of NOSA in patients with chronic hepatitis C who attended to Walter Cantidio Hospital (HUWC) and received combined antiviral therapy (interferon-ribavirin). A total of 34 patients with hepatitis C were studied. Anti-nuclear antibody (ANA), anti-smooth muscle antibody (SMA), anti-liver/kidney microsomal antibody type 1 (LKM-1) and anti-mitochondrial antibody (AMA) were detected by indirect immunofluorescence. The presence of NOSA was related to clinical and epidemiological variables and to the outcome of antiviral combination therapy with interferon-alfa and ribavirin. Patients were classified as nonresponders, relapsers or long-term responders depending on the outcome of treatment. In our study, before therapy, 23 patients were NOSA positive (SMA was detected in 6 patients, SMA and AMA in 10 and SMA, AMA and ANA in 7). On the 24th week of treatment, 24 patients were NOSA positive (SMA was detected in 4 patients, SMA and AMA in 10, ANA and SMA in 1, ANA and AMA in 1 and SMA, AMA and ANA in 8). NOSA behavior did not show significant variation during treatment. The overall rate of long-term response was 26,5% (9/34). Long-term response occurred in 17,4% (4/23) of NOSA positive patients and 45,5% (5/11) of NOSA negative patients. Positivity of autoantibodies was not associated with gender, age, viral genotype or aminotransferase levels. In conclusion, ANA was the only NOSA associated with treatment outcome. The absence of NOSA might indicate a significantly higher chance for viral clearance in response to combination therapy for chronic hepatitis C infection.

Keywords: chronic hepatitis C, autoimmunity, autoantibodies, interferon alfa, ribavirin.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Epidemiologia da Hepatite C no Brasil e no Mundo.....	20
1.2. Características do Vírus da Hepatite C.....	23
1.3. Vias de Transmissão do Vírus da Hepatite C.....	26
1.4. Patogênese da Infecção pelo Vírus da Hepatite C.....	27
1.5. Manifestações Clínicas da Hepatite C.....	28
1.6. Métodos Diagnósticos para o Vírus da Hepatite C.....	28
1.7. Esquema terapêutico na Hepatite C.....	29
1.8. Aspectos Gerais do Desenvolvimento da Autoimunidade.....	34
1.9. Manifestações Autoimunes na Infecção pelo Vírus da Hepatite C.....	37
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo Geral.....	40
2.2. Objetivos Específicos.....	40
3. METODOLOGIA.....	41
3.1. Delineamento do estudo.....	41
3.2. Casuística.....	41
3.3. Protocolo do estudo.....	43
3.3.1. Abordagem do grupo 1.....	43
3.3.2. Abordagem do grupo 2.....	44
3.3.3. Descrição do seguimento.....	44
3.3.4. Caracterização genotípica.....	44
3.3.5. Dosagens bioquímicas e sorológicas.....	44
3.3.6. Pesquisa de autoanticorpos.....	44
3.4. Considerações éticas.....	51
3.5. Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1. Casuística.....	53
4.2. Padronização de técnica de imunofluorescência indireta em tecido para pesquisa de anticorpos SMA, LKM-1 e AMA.....	56
4.3. Pesquisa de Autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA).....	60
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ANEXOS.....	93
ANEXO I: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	94
ANEXO II: Questionário.....	95
ANEXO III: Protocolos laboratoriais.....	97
ANEXO IV: Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial do vírus da hepatite C.....	20
Figura 2: Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C nas regiões brasileiras....	22
Figura 3: Representação esquemática do vírus da hepatite C.....	24
Figura 4: Microscopia eletrônica (a) e imunoelétrica (b) das partículas de vírus da hepatite C.....	24
Figura 5: Organização do genoma do vírus da hepatite C, mostrando as regiões não-traduzidas 5' e 3', “ <i>single open reading frame</i> ” com seus sítios de clivagem.....	25
Figura 6: Gráfico da relação entre a duração do tratamento e a redução da carga viral do vírus da hepatite C em pacientes portadores do genótipo 1.....	31
Figura 7: Gráfico da relação entre a duração do tratamento e a redução da carga viral do vírus da hepatite C em pacientes portadores dos genótipos não-1.....	32
Figura 8: Repertório da imunidade periférica e mimetismo molecular.....	36
Figura 9: Esquema geral da abordagem dos indivíduos envolvidos na pesquisa.....	43
Figura 10: Visualização do corte para retirada dos órgãos.....	45
Figura 11: Retirada da cápsula renal.....	46
Figura 12: Lavagem do estômago para retirada de restos alimentares.....	46
Figura 13: Orientação do corte no tecido hepático.....	47
Figura 14: Orientação do corte no estômago.....	47
Figura 15: Orientação do corte no rim.....	48
Figura 16: Montagem dos três tecidos no bloco.....	48
Figura 17: Distribuição da população estudada de acordo com sexo e faixa etária (n=34).....	55
Figura 18: Padrão de fluorescência do anticorpo anti-microsomal de fígado e rim do tipo 1 a partir de soro controle.....	57
Figura 19: Padrão de fluorescência do anticorpo anti-músculo liso a partir de soro controle.....	58
Figura 20: Padrão de fluorescência do anticorpo anti-mitocôndria a partir de soro controle.....	59

Figura 21: Esquema geral de pacientes e controles estudados na pesquisa e comparação entre a produção de autoanticorpos não-órgão específicos pelos pacientes antes do tratamento e controles.....	60
Figura 22: Comparação entre os títulos de NOSA apresentados por pacientes antes e durante o tratamento (24 ^a semana).....	62
Figura 23: Resposta ao tratamento combinado de interferon-alfa e ribavirina em pacientes com hepatite C e a relação com a presença de autoanticorpos.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C nos seis países mais populosos do mundo.....	21
Tabela 2: Distribuição dos pacientes avaliados, segundo sexo, faixa etária, raça e genótipo.....	54
Tabela 3: Distribuição dos pacientes avaliados segundo exposição aos fatores de risco relacionados à transmissão do vírus da hepatite C.....	56
Tabela 4: Prevalência de autoanticorpos não-órgão específicos no grupo controle e em pacientes com hepatite C antes e na 24ª semana do tratamento com interferon-alfa e ribavirina.....	61
Tabela 5: Padrões de fluorescência de FAN em células HEp-2 antes e na 24ª semana de tratamento.....	63
Tabela 6: Distribuição dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C com transaminases alteradas e sua correlação com a presença ou não de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA) antes do tratamento.....	64
Tabela 7: Parâmetros clínicos e virológicos para pacientes infectados pelo vírus da hepatite C que tiveram ou não autoanticorpos não-órgão específicos reagentes antes do tratamento.....	65
Tabela 8: Prevalência e títulos de FAN, AMA e SMA nos pacientes no início do seguimento de acordo com a resposta ao tratamento.....	66
Tabela 9: Distribuição dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C NOSA reagente antes do tratamento, segundo sexo, idade e genótipo, relacionados ao resultado do tratamento.....	67
Tabela 10: Relação entre pacientes com autoanticorpos não-órgão específicos reagentes ou não na 24ª semana de tratamento de acordo com o tipo de resposta apresentada.....	68
Tabela 11: Prevalência de FAN, AMA, SMA e LKM-1 reagentes ou não na 24ª semana de seguimento em pacientes com hepatite C distribuídos segundo a resposta ao tratamento.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMA	Anticorpo anti-mitocôndria
Anti-VHC	Anticorpo anti-vírus da hepatite C
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAN	Fator anti-nuclear
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina classe G
IgGAM	Imunoglobulina total
IL	Interleucina
LKM-1	Anticorpo anti-microsomal de fígado e rim do tipo 1
NK	Célula <i>natural-killer</i>
NOSA	Autoanticorpo não-órgão específico
NR	Não respondedor
PCR	Reação da polimerase em cadeia
REC	Recidivante
RIBA	Ensaio de imunoblot recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
RVFT	Resposta virológica final do tratamento
RVP	Resposta virológica precoce
RVS	Resposta virológica sustentada
SMA	Anticorpo anti-músculo liso
TNF	Fator de necrose tumoral
Th1	Resposta de linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Resposta de linfócito T auxiliar do tipo 2
VHC	Vírus da hepatite C

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C NO BRASIL E NO MUNDO

As hepatites virais são mundialmente consideradas como um problema de saúde pública, representando uma causa significativa de morbidade e mortalidade (KIFFER *et al.*, 2003). A maioria dos casos de hepatites agudas ou crônicas resulta de uma infecção por um dos vírus da hepatite, nomeados de A a E (BRASIL, 2003). Acredita-se que existam, aproximadamente, 170 milhões de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite C (VHC) em todo o mundo e que a incidência anual da doença esteja entre 3 e 4 milhões de indivíduos (PAULA *et al.*, 2001; GAZE *et al.*, 2003; MOTTA-CASTRO *et al.*, 2003).

Embora a presença do VHC possua uma distribuição mundial, há um alto grau de variabilidade na frequência por região, com maior prevalência no continente africano, seguido por Ásia, Oceania, Europa e as Américas (SHEPARD *et al.*, 2005) (Fig. 1).

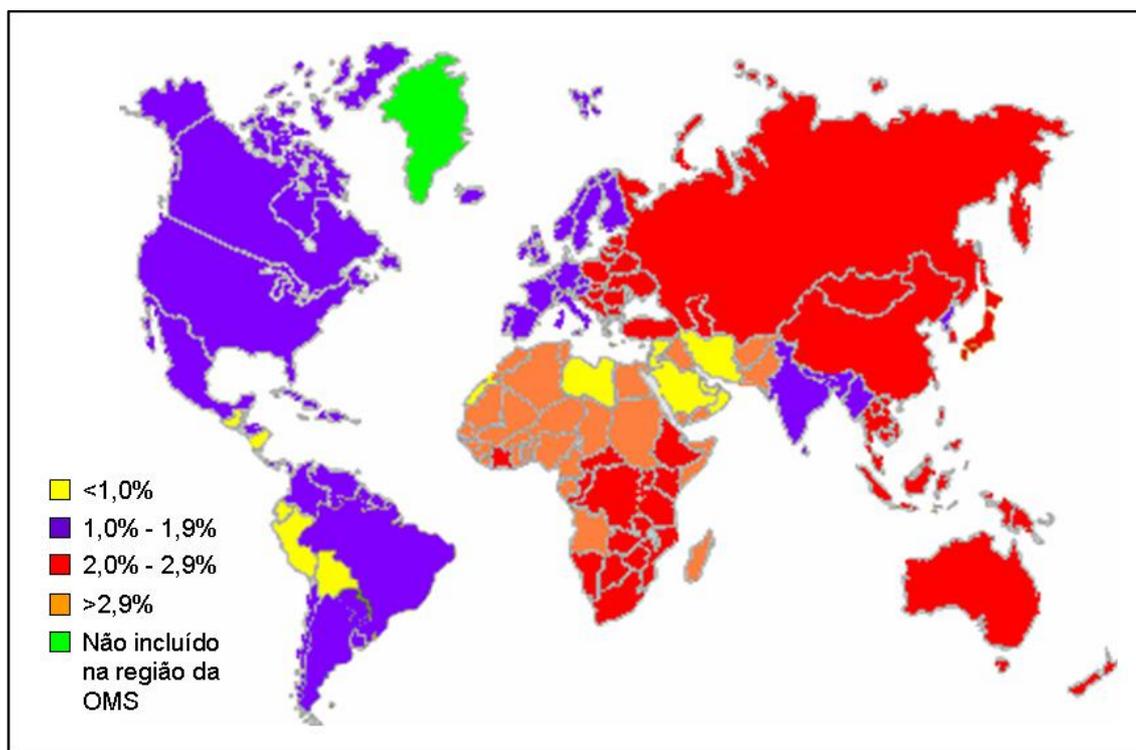


Figura 1: Distribuição mundial do vírus da hepatite C. (Fonte: SHEPARD *et al.*, 2005)

Não existe, entretanto, uma correlação entre a prevalência da hepatite C e o número de habitantes dos países. Por exemplo, China e Índia possuem populações com mais de um bilhão de habitantes, todavia a soroprevalência para VHC observada na China (3,2%) é bem superior àquela apresentada pela Índia (0,9%) (Tabela 1). Outros fatores, como hábitos culturais, cuidados com saúde pública e orientação da população, podem estar relacionados com a soroprevalência do VHC (SHEPARD *et al.*, 2005).

País	População total estimada em 2004 (milhões)	Soroprevalência estimada do VHC (%)	População estudada
China	1300	3,2	Amostra nacional representativa (n= 68000)
Índia	1087	0,9	Baseado na comunidade Bengal-Oeste (n= 3579)
USA	294	1,8	Amostra nacional representativa (n= 21214)
Indonésia	219	2,1	Doadores de sangue voluntários (n= 7572)
Brasil	179	1,1	Doadores de sangue voluntários (n= 66414)
Paquistão	159	4,0	Doadores de sangue voluntários (n= 103858)

Tabela 1: Prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C nos seis países mais populosos do mundo. VHC: vírus da hepatite C (SHEPARD *et al.*, 2005).

No Brasil, são encontrados diferentes padrões de distribuição do vírus da hepatite C. Dadas as dimensões continentais do país, foram observadas grandes diferenças na prevalência total do VHC entre as cidades brasileiras. Estudo realizado por Zarife e colaboradores (2006) apresentou soroprevalência do VHC de 1,5% na cidade de Salvador - BA. Em Ribeirão Preto - SP, Valente e colaboradores (2005) observaram uma prevalência para VHC de 1,2%. Entretanto, em Santa Catarina, foi observado um índice de apenas 0,38% de positividade para

VHC em estudo realizado com doadores de sangue (ROSINI *et al.*, 2003). No Paraná, foi observado 0,9% de positividade para a doença (PALTANIN e REICHE, 2002), em Porto Alegre - RS a prevalência do VHC foi de 1,1% (BRANDÃO e FUCHS, 2002) e em Rondônia foi relatado 1,7% de positividade no teste sorológico para hepatite C (anti-VHC) (FERRARI *et al.*, 1999).

A distribuição dos genótipos virais também varia nas diferentes regiões do Brasil (Fig. 2). Estudo realizado por Campiotto e colaboradores, em 2006, relataram presença dos genótipos 1, 2 e 3 em todas as regiões brasileiras. Esses genótipos apresentam uma distribuição heterogênea no Brasil, sendo o genótipo 1 sempre o mais prevalente, seguido dos genótipos 3 e 2, sendo os demais genótipos raramente encontrados (PARANÁ *et al.*, 2000; BUSEK e OLIVEIRA, 2003; CAMPIOTTO *et al.*, 2006).

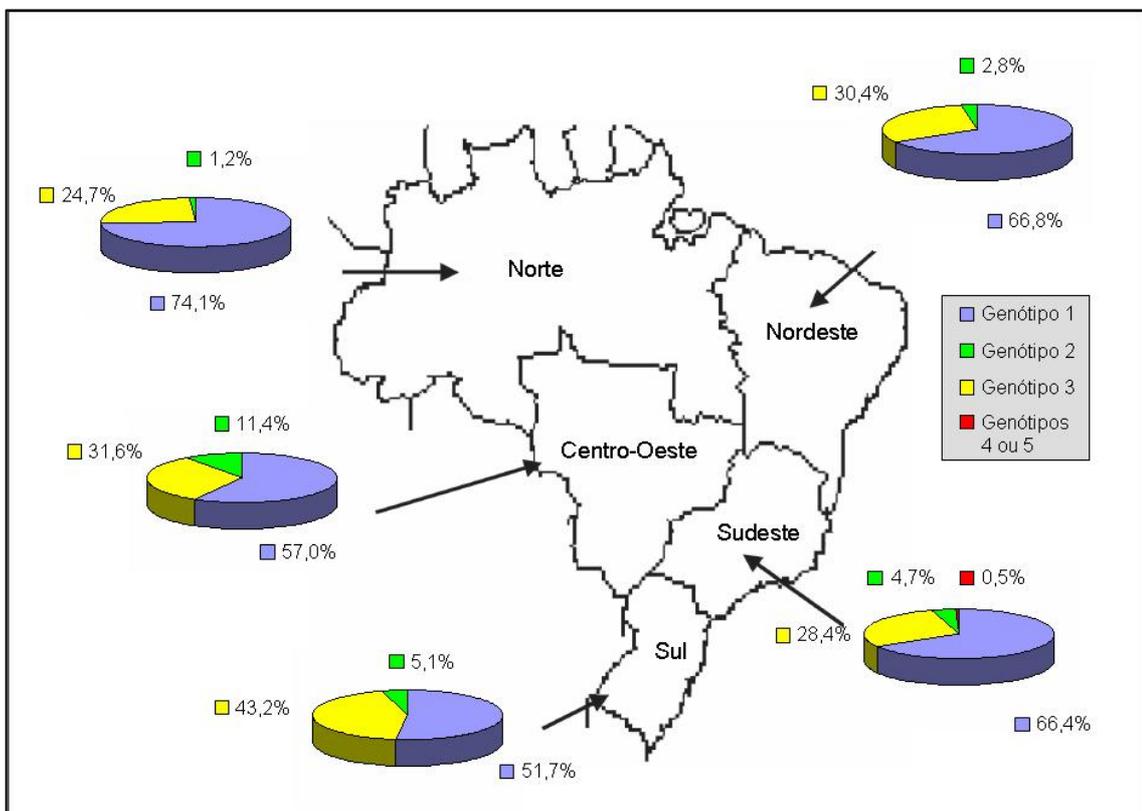


Figura 2: Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C nas regiões brasileiras. (Fonte: CAMPIOTTO *et al.*, 2006)

A hepatite C é a causa mais freqüente de hepatopatia crônica e de indicação de transplante hepático. Um fator preocupante na hepatite C é a ocorrência de grande número de portadores assintomáticos, tornando difíceis o estudo e o controle epidemiológico dessa doença (PAULA *et al.*, 2001; SOUTO *et al.*, 2001).

1.2. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA HEPATITE C

A humanidade sempre conviveu com doenças causadas por microorganismos. Embora não conhecêssemos os agentes etiológicos, os meios de transmissão e a cura, vários são os registros de descrições clínicas feitas por “médicos”, pesquisadores, escritores ou poetas. Hanseníase, sífilis, herpes simples e coccidiodomicose são exemplos de doenças comumente descritas em relatos antigos, poemas e romances. Não há, entretanto, esse tipo de registro para hepatite C (STICHT-GROH e BRETZEL, 1995; OLIVERE *et al.*, 1999).

Até 1989, não havia sido identificado nenhum agente causador para hepatite C até então chamada de não-A e não-B. Naquele ano, o cDNA do VHC foi clonado a partir de uma amostra de plasma de um chimpanzé portador de hepatite não-A e não-B (CHOO *et al.*, 1989). Foi feito o seqüenciamento viral e, em seguida, através de testes sorológicos, foi isolado o anticorpo anti-VHC. A partir daí, o VHC foi obtido do plasma de pacientes, sendo identificado como agente etiológico da hepatite C (KATO *et al.*, 1990; TAKAMIZAWA *et al.*, 1991).

O VHC é um vírus de RNA de fita positiva (pronta para ser traduzida) e, baseado em estudos sobre sua seqüência de nucleotídeos, foi classificado como pertencente à família *Flaviviridae*, em um gênero separado dos Flavivirus (como os vírus da febre amarela e da dengue) e dos Pestivirus (como os vírus da diarreia bovina e do cólera suíno). Apesar de apresentar uma estrutura genômica semelhante aos outros membros desta família, o VHC não possui vetor artrópode e não causa doença em animais. Para esse novo gênero, foi proposto o nome de Hepacivirus (SHUKLA *et al.*, 1995).

O vírus da hepatite C mede menos de 60nm e contém um nucleocapsídeo interno com um genoma linear de aproximadamente 9600 nucleotídeos circundado por um envelope lipídico (KAITO *et al.*, 1994) (Fig. 3).

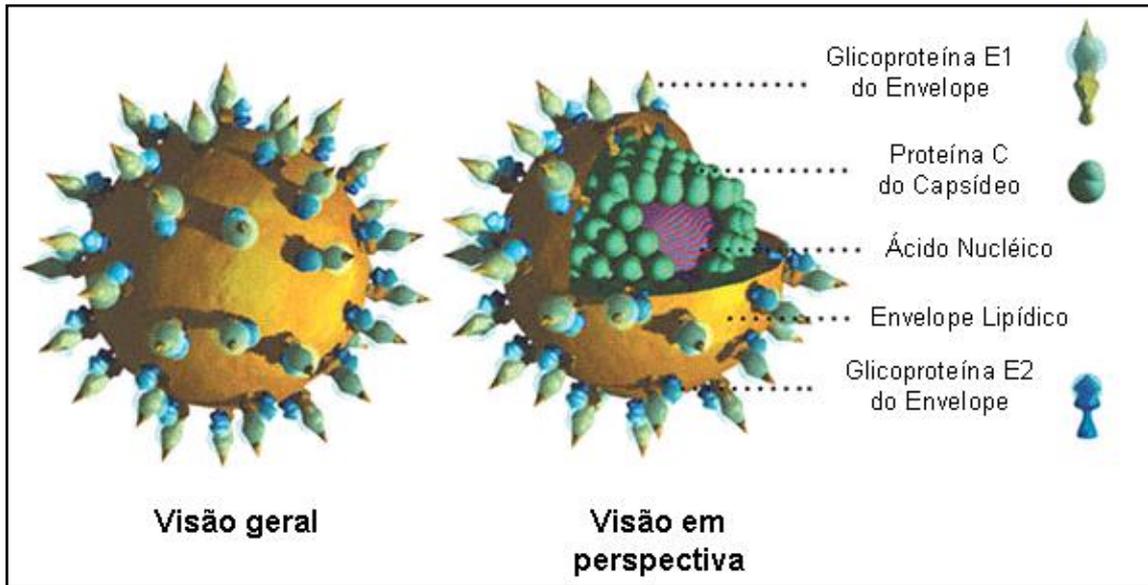


Figura 3: Representação esquemática do vírus da hepatite C.

(Fonte: http://www.prn.org/images/prn_nb_cntnt_images/models/hcv_model_q60.jpg)

A visualização da partícula viral pode ser realizada através de microscopia eletrônica e imunoelétrica (Fig. 4). Esta ocorre indiretamente através da utilização de anticorpos policlonais contra a proteína E1 do envelope viral produzido em coelho e com conjugado coloidal anti-IgG de coelho contendo partículas de ouro, permitindo a visualização do core da partícula viral. Essa técnica também pode utilizar uma mistura de quatro anticorpos monoclonais contra a proteína E1 do VHC (KAITO *et al.*, 2006).

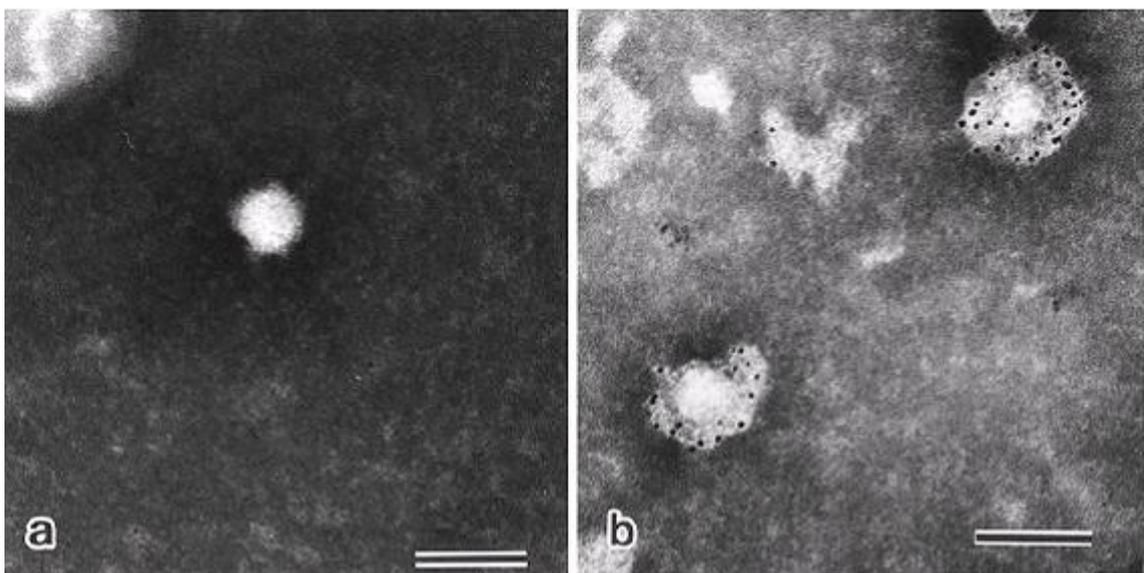


Figura 4: Microscopia eletrônica (a) e imunoelétrica (b) das partículas do vírus da hepatite C. As barras correspondem a 100nm. (Fonte: KAITO *et al.*, 2006).

O genoma do VHC codifica uma poliproteína que sofre clivagem posterior. Na poliproteína com uma longa fase de leitura aberta (*open reading frame* - ORF) distinguem-se as proteínas estruturais: core e o envelope (E1 e E2) e as não estruturais (NS) enumeradas de 2 a 5 (NS2, NS3, NS4, NS5) que produzem as enzimas protease, helicase e RNA polimerase que atuam individual ou associadamente e são responsáveis pela replicação e expressão virais (KATO *et al.*, 1990; CHOO *et al.*, 1991). O genoma do VHC possui regiões mutáveis NS2/E1/E2 (MCALLISTER *et al.*, 1998), outras relativamente estáveis como core/NS3/NS4/NS5 e uma região altamente conservada que é a região 5' não codificadora (5'NCR) (GARSON *et al.*, 1990; OKAMOTO *et al.*, 1990) (Fig. 5).

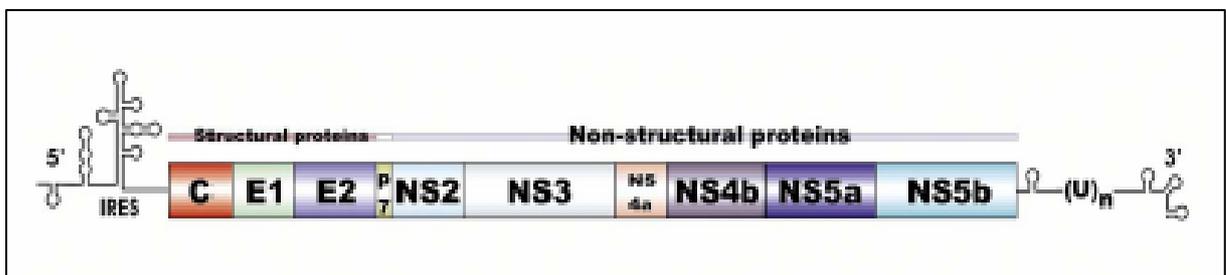


Figura 5: Organização do genoma do VHC, mostrando as regiões não-traduzidas 5' e 3', “*single open reading frame*” com seus sítios de clivagem. (Fonte: ROINGEARD *et al.*, 2004).

Existem segmentos da poliproteína do vírus da hepatite C que apresentam algum grau de homologia com seqüências de peptídeos presentes no organismo humano. Em manifestações autoimunes, estes peptídeos são alvos de autoanticorpos anti-microsossomais de rim e fígado do tipo 1 (LKM-1) (MCFARLANE, 1999; STRASSBURG *et al.*, 2003), anti-nucleares (FAN) e anti-músculo liso (SMA) (GREGORIO *et al.*, 2003). Este fenômeno será abordado posteriormente.

O agente etiológico da hepatite C não é uma partícula homogênea, podendo apresentar diversidade genética, que se traduz em diferentes tipos e subtipos. Assim, as cepas de VHC isoladas em diferentes regiões do mundo mostraram diferenças em 35% do seu genoma, o que permitiu classificá-las em 6 genótipos maiores e mais de 100 subtipos (SIMMONDS *et al.*, 1994).

Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ainda ter variações moleculares do VHC, que são denominadas quasispécies. Isto é possível, devido à replicação imperfeita do vírus, com surgimento de pequenas e constantes mutações. A maior ou menor diversidade das quasispécies parece estar relacionada com a resposta imunológica do hospedeiro, que varia

desde novas manifestações clínico-laboratoriais, até uma alta heterogeneidade nos casos de doença hepática mais avançada e/ou baixa resposta terapêutica (ROSEN *et al.*, 1999).

Esta diversidade genotípica tem implicações em múltiplos aspectos da doença: na epidemiologia, devido às diferenças na distribuição geográfica e prováveis vias de contágio; na patogênese, pois condiciona cepas de diferentes graus de virulência (podendo ocorrer co-infecção por diferentes genótipos); no diagnóstico, devido à necessidade de seleção de seqüências de nucleotídeos de regiões extremamente conservadas para garantir a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos e moleculares; no tratamento, pois diferentes genótipos apresentam respostas diferentes às drogas utilizadas na terapia e na profilaxia, por ocasionar dificuldades na produção de vacinas (CHARMAN, 1995).

1.3. VIAS DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C

O VHC pode ser transmitido em qualquer situação em que sangue infectado é transferido entre indivíduos, sendo freqüentemente associado a transmissão através de transfusões sanguíneas, quando ainda não se fazia pesquisa de anti-VHC nos bancos de sangue (KIM, 2002). Outras formas de transmissão associadas ao vírus são o uso de drogas intravenosas, as tatuagens e a prática de *body-piercing* (KIM, 2002; HELLARD *et al.*, 2003).

Por terem vias de transmissão semelhantes, freqüentemente relata-se associação do VHC com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Estudo realizado no Brasil mostrou que em um grupo de pacientes com HIV 17,7% são co-infectados pelo VHC (MENDES-CORREA *et al.*, 2001). Neste caso, verifica-se que a carga viral do VHC é maior quando há esta co-infecção, estando esta carga inversamente relacionada a quantidade de células T do organismo (MATTHEWS-GREER *et al.*, 2001).

A transmissão sexual do VHC ainda não está bem estabelecida, havendo controvérsias quanto a este aspecto em diversos estudos apresentados (DIAGO *et al.*, 1996; WEJSTAL, 1999; GROSS, 2001; STROFFOLINI *et al.*, 2001). Pesquisa feita em esposas de indivíduos infectados pelo VHC mostrou uma baixa prevalência de mulheres também infectadas e ainda levanta-se a questão se esta infecção teria ocorrido, realmente, por transmissão sexual ou por exposição aos mesmos fatores de risco ou ainda por compartilhamento de objetos capazes de causar alguma lesão, como lâminas de barbear e escovas de dente (DIAGO *et al.*, 1996; STROFFOLINI *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos evidenciaram pouca quantidade de RNA viral em esperma e secreções cervico-vaginais de pessoas infectadas pelo VHC (MESEGUER *et al.*, 2002; BÉLEC *et al.*, 2003). Diago e colaboradores (1996) relataram que a transmissão intrafamiliar

por contato sexual ou não-sexual se daria por compartilhamento de instrumentos perfurocortantes não descartáveis (DIAGO *et al.*, 1996).

A transmissão vertical é possível durante o momento do parto, pois há riscos de contato sanguíneo entre a mãe infectada e a criança, mas esta taxa de transmissão é relativamente baixa e está associada a alta viremia materna (BATALLAN *et al.*, 2003). A patogenicidade do vírus em crianças é descrita como bem menos grave que a observada em adultos, tendendo à cura, apresentando-se as crianças assintomáticas e com exames clínicos normais (BOST-BRU, 1999).

1.4. PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

A patogênese das hepatites virais ainda é pouco compreendida. Sabe-se que o VHC é um vírus não hepatotóxico e que a cronificação da doença pode levar a cirrose e a complicações de hipertensão portal. Em estudos da patogênese de VHC, constatou-se que a diversidade de manifestações clínicas e a evolução da infecção dependem primariamente da resposta imune do hospedeiro ao vírus (MANNIS e RAMBUSCH, 1999; STRASSBURG, 2003).

Na hepatite C, o desenvolvimento de hepatite aparentemente resulta do reconhecimento imune e da destruição de hepatócitos infectados pelo VHC. O grau de destruição varia entre os indivíduos. A infecção persistente pelo vírus no fígado dispara, continuamente, uma resposta ativa de células T, que induz a destruição de hepatócitos alvo. Este é provavelmente o principal mecanismo responsável pelo dano hepático (FUKUDA, 2003). Além disso, caso haja algum tipo de manifestação autoimune do indivíduo causada pela presença do vírus no organismo, podem ser produzidos autoanticorpos contra estruturas presentes no fígado, levando a uma reação que contribui com o agravamento do dano hepático (MURATORI *et al.*, 2005).

O período de incubação do VHC varia de 15 a 160 dias. Acredita-se que, após esse período, quase todos os hepatócitos expressem proteínas virais. No tecido hepático, são observadas células apoptóticas e infiltrados linfocitários, caracterizando uma reação inflamatória (CHOO e PINHO, 2003). A presença de VHC, geralmente, cursa com uma infecção permanente. Entretanto, ainda não foi possível determinar o grau de interação entre as proteínas virais e o metabolismo celular. Algumas evidências sugerem que as proteínas do VHC estão envolvidas com a transformação celular e, apesar de o VHC aparentemente não possuir oncogenes que induzam essa transformação em um curto período de tempo, a infecção pelo VHC geralmente leva a hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular em 10 a 20 anos (KOHARA, 2000; STRAUSS, 2001; LYRA, 2003). É essa infecção crônica que

gera um constante dano hepático, levando a uma regeneração irregular das células hepáticas, aumentando as chances de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (KOHARA, 2000).

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA HEPATITE C

A infecção pelo vírus C é pouco perceptível na fase aguda (hepatite aguda) tendo acentuada tendência para a cronificação (hepatite crônica), neste caso acomete em torno de 85% dos homens adultos e 65% das mulheres e crianças. Nos adultos, um terço dos casos crônicos evoluem para as formas graves num período de 20 anos (CHOO e PINHO, 2003; LYRA, 2003).

Diferentemente do que ocorre nas hepatites A e B, a maioria das pessoas que desenvolvem infecção crônica é assintomática (90%) ou apresenta sintomas muito inespecíficos, como letargia, dores musculares e articulares, cansaço ou náuseas. Assim, o diagnóstico só costuma ser realizado através de exames para doação de sangue, exames de rotina ou quando sintomas da doença hepática surgem, já na fase avançada de cirrose. Os indícios de hepatite podem ser averiguados bioquimicamente através da dosagem das transaminases hepáticas e histologicamente pela análise histopatológica do fragmento do tecido hepático obtido por biópsia (AGUILERA e BERENGUER, 2004).

Além dos sintomas relacionados diretamente à hepatite, o vírus pode desencadear o aparecimento de outras doenças, como a porfíria cutânea tarda (manifestações cutâneas devidas a disfunções hepáticas e, através da estimulação do sistema imunológico, crioglobulinemia mista, tireoidite autoimune, glomerulonefrite, entre outras (PALEKAR e HARRISON, 2005; VASSILOPOULOS e CALABRESE, 2005).

1.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O VÍRUS DA HEPATITE C

O diagnóstico da infecção pelo VHC ocorre pela pesquisa de anticorpos contra as proteínas virais pelo método ELISA, pela detecção de antígenos virais ou anticorpos contra o vírus por IMUNOBLOT e pela detecção do RNA viral por testes moleculares (BRECHOT, 1997).

A primeira geração de ensaios imunoenzimáticos anti-VHC (EIA-1) detectavam somente anticorpos para o antígeno recombinante viral c100-3. O uso deste teste em populações de baixo risco, tais como doadores de sangue, resultou em um alto número de resultados falso-positivos e falso-negativos (NICHOLSON *et al.*, 1991). Com os ensaios de segunda e terceira geração (EIA-2 e EIA-3), os testes de ELISA passaram a adquirir maiores sensibilidade e especificidade. O período médio para soroconversão do VHC após transfusão sanguínea diminuiu de 16 semanas no EIA-1, para 10 semanas no EIA-2 e para 7 ou 8

semanas no EIA-3 (GRETCH, 1997). Esse teste é extremamente útil para o diagnóstico das hepatites crônicas, especialmente nos indivíduos com alterações de transaminases e epidemiologia sugestiva de infecção pelo VHC (STRAUSS, 2001).

Um teste suplementar também utilizado no diagnóstico viral é o ensaio de imunoblot para proteína recombinante (RIBA). Esse ensaio tem por base a detecção de anticorpos anti-VHC a partir da ligação destes a antígenos virais fixados a membranas de nitrocelulose (MUNOZ-ESPINOSA, 2002). A maior parte dos indivíduos com hepatite C crônica e que apresentam EIA-2 positivos (80-90%) são também positivos no RIBA e na pesquisa do RNA viral, enquanto que 60 a 70% dos pacientes com RIBA indeterminado são positivos no teste qualitativo para VHC, que verifica a presença do RNA viral no sangue periférico (GONÇALES *et al.*, 2000).

A pesquisa do antígeno do core do VHC tem sido utilizada para avaliar a resposta precoce do indivíduo à terapia combinada de peginterferon e ribavirina, bem como para diagnóstico viral inicial (REDDY *et al.*, 2006). Foi demonstrado que os níveis totais de antígeno do core do VHC estão correlacionados com as concentrações de RNA do vírus, podendo ser utilizados como marcador da replicação viral (BUTI *et al.*, 2004).

O diagnóstico direto do VHC é possível através de métodos de detecção do RNA viral, qualitativos e quantitativos, usando técnicas de transcriptase reversa e reação da polimerase em cadeia (BRECHOT, 1997).

A aplicação de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o DNA complementar (cDNA), transcrito reversamente, permite a realização de ensaios muito sensíveis e importantes para o diagnóstico de viroses. A habilidade destes testes de detectar pequenas quantidades de moléculas de RNA viral representa um método extremamente sensível para o diagnóstico da infecção pelo VHC (PAWLOTSKY, 2002). O RNA viral pode ser detectado no soro do paciente dentro de 1 a 2 semanas após exposição do indivíduo ao vírus e semanas antes da elevação dos níveis alanina aminotransferase e do aparecimento de anticorpos anti-VHC (PAWLOTSKY, 2002).

Os testes quantitativos ou de carga viral são importantes no acompanhamento do tratamento de pacientes com hepatite C (BUTI *et al.*, 2004). Existem kits comerciais e métodos caseiros (*in-house*) disponíveis ao diagnóstico do VHC (HAZARI *et al.*, 2004; MANCINI *et al.*, 2004; TESTE AMPLICOR VHC V 2,0 – Roche Diagnostics Systems).

1.7. ESQUEMA TERAPÊUTICO NA HEPATITE C

De acordo com a Portaria No. 863/2002 do Ministério da Saúde do Brasil, o tratamento da hepatite C deve ser feito com interferon-alfa (IFN- α) em monoterapia ou

associado à ribavirina. No caso de interferon peguilado, que resulta da associação de uma molécula de polietilenoglicol ao IFN, fazendo com que sua absorção e eliminação se tornem mais lentas, deve ser administrada uma dose de 180µg por via subcutânea por semana. Já a ribavirina deve ser utilizada em dose de 1000mg por dia via oral para pacientes com menos de 75kg e de 1250mg por dia para pacientes com 75kg ou mais. Essa dosagem diária pode ser dividida em duas tomadas. O tratamento deve ter duração de 48 semanas para pacientes portadores do genótipo 1 do VHC e de 24 semanas para portadores dos demais genótipos virais.

Esse tratamento é indicado para pacientes que possuem o RNA do VHC detectável molecularmente por PCR, transaminases hepáticas persistentemente alteradas (em pelo menos três dosagens com intervalos de dois meses), biópsia hepática com fibrose portal e ausência de cirrose ou cirrose compensada. E é contra-indicado em casos graves de anemia, leucopenia, plaquetopenia, doenças cardiovasculares, endócrinas, autoimunes ou neuropsiquiátricas e gravidez.

Antes do tratamento, além de cumprir os critérios de inclusão necessários, o paciente precisa realizar duas pesquisas, utilizando-se PCR, para detecção da partícula viral no sangue periférico: uma qualitativa, que confirma a presença do vírus no organismo, e outra quantitativa, que determina a carga viral (o número de partículas virais, em unidades internacionais (UI) encontrados em cada mililitro de sangue). Após 12 semanas de tratamento, deve ser realizado um novo PCR quantitativo, onde a carga viral do paciente deve decrescer de 2 logaritmos de base 10 para que seja indicada a continuidade do tratamento. Essa determinação se baseia nas chances de “clareamento” viral que o paciente apresenta nessa fase do tratamento. Se a carga viral continuar alta, as chances de “clareamento” viral são baixas, então, é indicada a descontinuidade do tratamento; o contrário ocorre quando há uma redução da carga viral, indicando altas chances de “clareamento” viral, sendo continuado o tratamento. O exame também pode detectar a ausência do vírus no sangue periférico. Quando há uma redução significativa ou total do número de cópias virais, o tratamento é continuado e diz-se que o paciente obteve uma resposta virológica precoce (RVP). Na 48ª semana, depois do término do tratamento, deve ser realizado um PCR qualitativo, que pesquisa apenas a presença ou ausência do vírus no sangue. Nessa etapa, se o exame for positivo, significa que o paciente não respondeu ao tratamento e ele deve ser acompanhado clinicamente, com monitoramento constante dos níveis de transaminases. Ocorrendo uma grave descompensação da função hepática, o paciente é encaminhado para transplante. Se o exame for negativo, significa que houve “clareamento” viral no sangue periférico, então, diz-se que o paciente apresentou resposta virológica final (RVFT) ao tratamento. Nesse caso, a cada seis meses

durante dois anos, deve ser realizado um novo PCR qualitativo. Se todos os resultados forem negativos, o paciente apresentou uma resposta virológica sustentada (RVS). É esta resposta que hoje é chamada de “cura”, embora não se possa garantir que o vírus esteja ausente do organismo como um todo (Fig. 6).

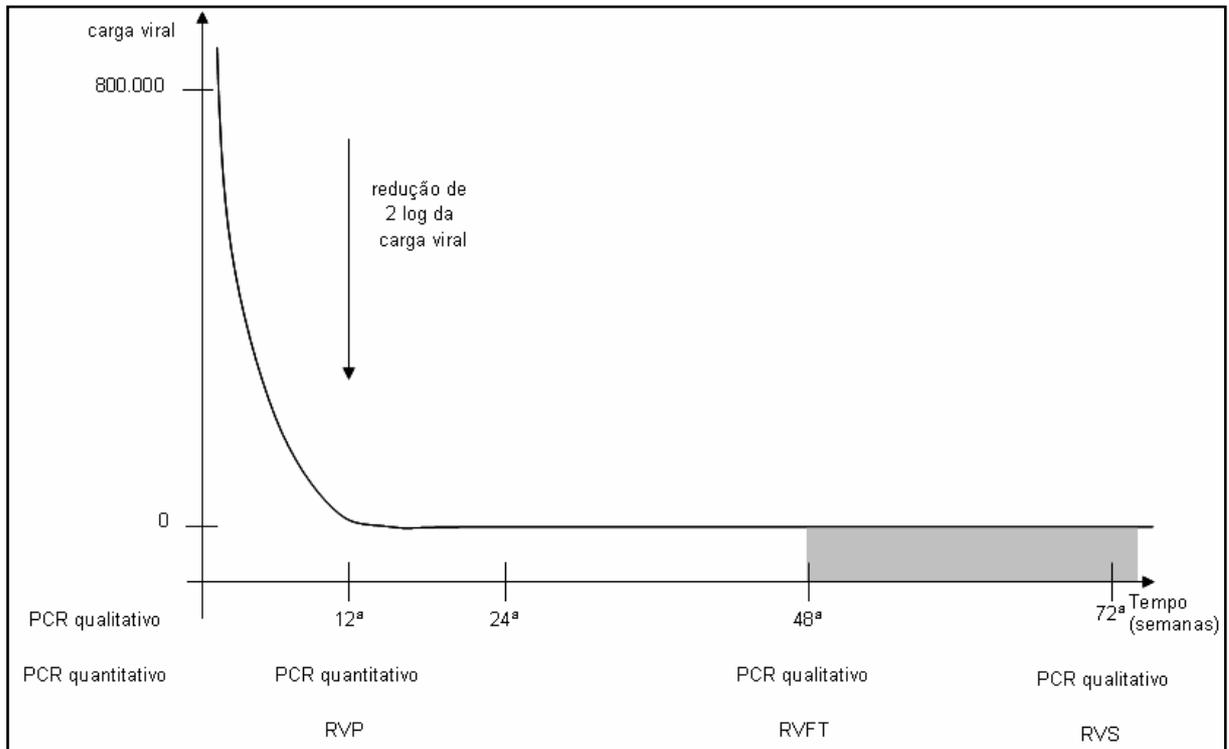


Figura 6: Gráfico da relação entre a duração do tratamento e a redução da carga viral do vírus da hepatite C em pacientes portadores do genótipo 1. RVP: resposta virológica prévia; RVFT: resposta virológica final do tratamento; RVS: resposta virológica sustentada.

Para os genótipos não-1, o tratamento com interferon peguilado associado à ribavirina é feito de modo semelhante ao descrito anteriormente, diferindo apenas na duração, que é de 24 semanas, e nos exames de PCR para detecção e quantificação da partícula viral no sangue periférico antes, durante e após o tratamento, cujo esquema, inclui um PCR qualitativo anterior ao tratamento para verificar a presença do vírus no sangue. Nesta etapa, não é necessária a realização de PCR quantitativo. Também não é feito nenhum tipo de detecção molecular durante a terapia, dada a sua curta duração. Por isso, para os pacientes que apresentam genótipo não-1, não existe uma RVP ao tratamento. Após a 24ª semana, é realizado um novo PCR qualitativo. Se o exame for positivo, significa que o paciente não respondeu ao tratamento e ele deve ser acompanhado clinicamente, com monitoramento constante dos níveis de transaminases. Ocorrendo uma grave descompensação da função

hepática, o paciente é encaminhado para transplante. Se o exame for negativo, significa que houve “clareamento” viral no sangue periférico, então, diz-se que o paciente apresentou resposta virológica final (RVFT) ao tratamento. Nesse caso, a cada seis meses durante dois anos, deve ser realizado um novo PCR qualitativo. Se todos os resultados forem negativos, o paciente apresentou uma resposta virológica sustentada (RVS) (Fig. 7).

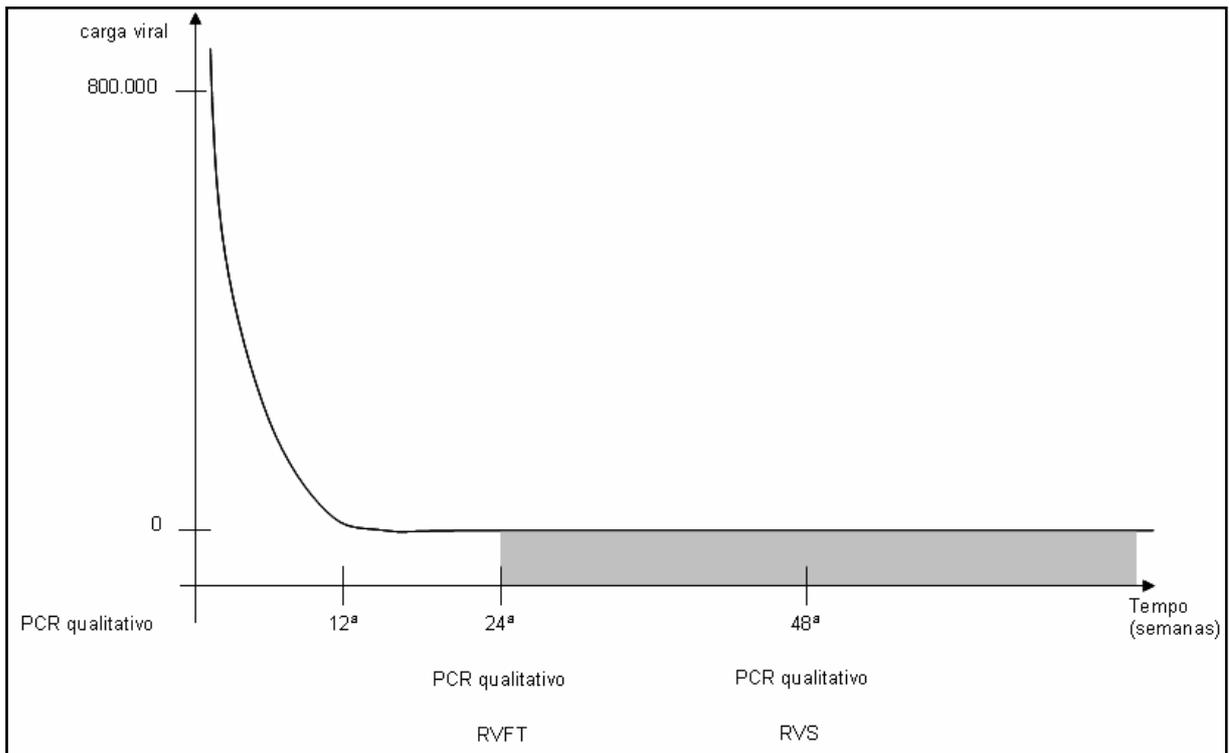


Figura 7: Gráfico da relação entre a duração do tratamento e a redução da carga viral do vírus da hepatite C em pacientes portadores dos genótipos não-1. RVFT: resposta virológica final do tratamento; RVS: resposta virológica sustentada.

Os interferons são glicoproteínas e podem ser classificados em três diferentes tipos: o $IFN\alpha$, produzido por leucócitos; o $IFN\beta$, produzido por fibroblastos e o $IFN\gamma$, produzido por células T e *natural killer* (NK). A infecção viral de uma célula leva à produção de interferons α e β , que ativam os mecanismos antivirais nas células vizinhas, tornando-as resistentes à infecção. O interferon age ligando-se a receptores específicos na superfície celular, iniciando uma complexa cascata de interações proteína-proteína, levando a uma rápida ativação da transcrição gênica. Os efeitos dessa modulação gênica estimulada pelo interferon dependem do sistema biológico em que ele está agindo e podem resultar na inibição da replicação viral nas células infectadas, na inibição da proliferação celular, no bloqueio da tradução de proteínas, na degradação do RNA viral e em imunomodulação. A molécula de interferon,

quando peguilada, tem seu tamanho aumentado, o que torna sua absorção mais lenta, sua meia-vida mais longa e sua taxa de eliminação do plasma mais baixa que a do interferon convencional, prolongando a duração de sua atividade biológica (BAKER, 2003). Entretanto, os interferons têm um efeito imunoterapêutico inespecífico e são utilizados na tentativa de reforçar o nível geral de atividade imunológica. Nesse aspecto, dada a presença do vírus da hepatite C e a homologia existente entre a poliproteína viral e alguns peptídeos do organismo humano, a terapia com IFN pode resultar na produção de uma grande diversidade de anticorpos contra a partícula viral com capacidade de reagir cruzadamente com estruturas próprias do indivíduo, levando a uma manifestação autoimune (SVIRTLIH *et al.*, 2005).

Os interferons α e β foram os primeiros agentes a permitir um tratamento eficaz para hepatites virais. A monoterapia com IFN para hepatite C crônica leva a uma resposta de 20% a 25%, enquanto o tratamento combinado de IFN e ribavirina aumenta o número de respostas a longo prazo para mais de 50% (DUMOULIN, 1999).

Assume-se que a ação de ambos é a indução de um estado antiviral, e que os efeitos imunomodulatórios do IFN são importantes para a eliminação de uma hepatite viral. Durante um tratamento bem sucedido com IFN, é incomum uma elevação das aminotransferases atribuída à destruição dos hepatócitos infectados por vírus pelas células imunes citolíticas, como ocorre em outros tipos de hepatites virais. Em vez disso, os pacientes com hepatite C crônica mostram um declínio gradual dos níveis de aminotransferases séricas pouco tempo após o estabelecimento da terapia com IFN (DUMOULIN, 1999).

A ribavirina é um análogo sintético da guanossina que tem ação direta contra vírus de RNA e DNA, por provável mecanismo de inibição da DNA polimerase vírus-dependente. A ribavirina sozinha não tem qualquer efeito sobre o VHC, exercendo, portanto, um efeito imunomodulatório na terapia associada com IFN (SVIRTLIH *et al.*, 2005). Tal efeito implica no aumento significativo da resposta imune tipo 1 de células T auxiliares (Th1) (FANG *et al.*, 2000), estimulando a produção das citocinas IL-2, IFN γ e TNF α e suprimindo a produção das citocinas da resposta imune tipo 2 de células T auxiliares (Th2), IL-4, IL-5 e IL-10, ao nível da expressão de RNAm e proteínas (TAM *et al.*, 1999). A ribavirina, portanto, contribui para uma melhor eficácia do tratamento da hepatite C crônica quando combinada com IFN α (FANG *et al.*, 2001).

Como em toda terapia, pode haver efeitos colaterais durante a administração de IFN e ribavirina, como: leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, anemia hemolítica, fadiga, depressão e/ou transtornos psiquiátricos, sintomas gripais (febre e dores musculares), náuseas, perda de apetite, tosse, falta de ar, disfunções na tireóide, rash cutâneo, perda de cabelo e aumento do risco de malformações fetais em grávidas (MESCHINI *et al.*, 2003).

1.8. ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO DA AUTOIMUNIDADE

Doenças autoimunes, com exceção da artrite reumatóide e da tireoidite autoimune, são individualmente raras, mas juntas elas afetam aproximadamente 5% da população nos países ocidentais (JACOBSON *et al.*, 1997). Elas representam um grupo fascinante de doenças, mas pouco compreendido. Não existe diferença fundamental entre a estrutura dos antígenos próprios e dos antígenos estranhos, pois os linfócitos evoluem não para distinguir o próprio do não-próprio, mas sim para responder ao antígeno somente em certos microambientes, geralmente na presença de citocinas inflamatórias (SILVERSTEIN e ROSE, 2000). Já que a autoreatividade é fisiológica, é um desafio compreender como ela se torna um processo patológico e como as células B e T contribuem para o dano tecidual (DAVIDSON e DIAMOND, 2001).

Clinicamente, as doenças autoimunes parecem ser tanto sistêmicas como órgão-específicas. Esta classificação, apesar de útil, não guarda necessariamente uma correspondência com as causas da doença. Uma divisão mais apropriada distingue as doenças em que existe uma alteração geral na seleção, regulação ou morte das células B e T, daquelas em que uma resposta anormal a um determinado antígeno, próprio ou não-próprio, causa autoimunidade. Geralmente, não se pode determinar se uma doença autoimune é devida a uma anormalidade global na função linfocitária ou a uma anormalidade antígeno-específica. Baixos níveis de autoanticorpos são encontrados em pessoas saudáveis (DAVIDSON e DIAMOND, 2001).

Em algumas doenças órgão-específicas, desenvolve-se autoreatividade contra antígenos encontrados em todo o organismo, entretanto, a doença é restrita a um determinado órgão (TARGOFF, 2000). Presume-se que o antígeno tem maior acesso aos tecidos afetados, embora os padrões de migração linfocitária também possam determinar os locais de inflamação (AUSTRUP *et al.*, 1997).

Estudos epidemiológicos demonstraram que fatores genéticos são determinantes importantes da susceptibilidade à doença autoimune. Algumas delas são devidas a mutações em um único gene. Mesmo nessas condições, outros genes modificam a gravidade da doença e nem todos os indivíduos que possuem o gene mutante manifestam a doença, já que a expressão gênica depende de um conjunto de fatores (PITKANEN *et al.*, 2001). A doença é caracterizada tanto por autoimunidade quanto por imunodeficiência. Essas duas anormalidades, também coexistem em outras desordens, adquiridas ou herdadas, que são caracterizadas por perda da função das células B ou T, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida, deficiências do complemento e deficiência de IgA (WANG *et al.*, 1998). A maioria das doenças autoimunes são multigênicas, com múltiplos genes de

suscetibilidade trabalhando em conjunto para produzir um fenótipo anormal (ENCINAS e KUCHROO, 2000).

A ocorrência de uma doença causada por um determinado gene ou por uma mutação depende da bagagem genética do indivíduo como um todo. Esse conjunto interfere tanto na susceptibilidade à doença quanto na apresentação do fenótipo doente, que são resultantes da alteração de um único gene. Alguns defeitos genéticos podem predispor o indivíduo à ocorrência de mais de uma doença autoimune, então, várias dessas doenças podem compartilhar vias patogênicas comuns (DAVIDSON e DIAMOND, 2001).

É possível que a vulnerabilidade de um órgão-alvo ao dano mediado pela resposta imune seja, também, determinada geneticamente. Isso pode explicar a observação clínica que pessoas com as mesmas anormalidades sorológicas não necessariamente têm as mesmas alterações teciduais (COELHO *et al.*, 1997).

A predisposição à autoimunidade depende da interação entre genes de susceptibilidade e de proteção. Cada gene de susceptibilidade confere seu próprio aumento de risco. Contudo, a propensão a doenças autoimunes não depende somente da quantidade desses genes presentes no indivíduo (ENCINAS e KUCHROO, 2000).

Mesmo que o indivíduo tenha predisposição genética à doença, alguns estímulos – tais como exposição ambiental ou mudança no ambiente interno – são freqüentemente requeridos para ocorrência de autoimunidade. No caso de doenças autoimunes, entretanto, o estímulo é desconhecido (SALVETTI *et al.*, 2000).

Uma outra causa para o desenvolvimento de autoimunidade seria a infecção por agentes microbianos. Os antígenos microbianos têm potencial para iniciar autoreatividade através do mimetismo molecular, ativação policlonal ou liberação de antígenos crípticos. O agente infeccioso pode apresentar um peptídeo (antígeno) que guarde alguma semelhança com um peptídeo próprio do indivíduo (autoantígeno). A infecção causaria, então, a ativação dos linfócitos, que mediarão a doença, e o autoantígeno sustentaria a ativação, que persistiria mesmo após a erradicação do agente infeccioso (ZHAO *et al.*, 1998). A infecção microbiana pode causar também a ativação policlonal de linfócitos autoreativos. Esse mecanismo pode explicar o aumento da incidência de doença autoimune após a exposição a patógenos microbianos. Microrganismos que destroem células podem causar inflamação, liberação de antígenos crípticos e autoimunidade. Embora não tenha sido provado que a ativação linfocitária, não específica, resultante de uma infecção leve à autoimunidade, é claro que a inflamação, mesmo na ausência de uma infecção, pode estimular a ativação policlonal e a autoreatividade (MILLER *et al.*, 1997) (Fig. 8).

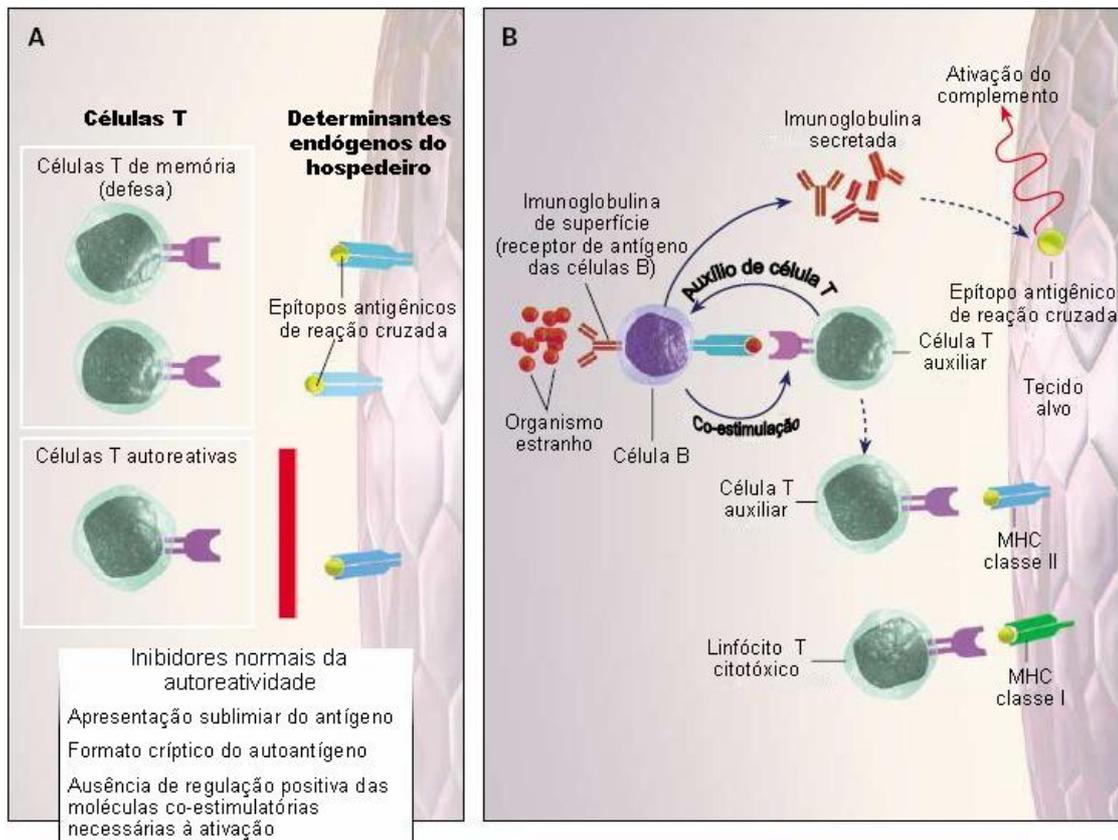


Figura 8: Repertório da imunidade periférica e mimetismo molecular. As células T circulantes têm um espectro de especificidade (Painel A). As células T de memória promovem a defesa contra organismos invasores e são potencialmente reativas aos tecidos do hospedeiro. Existe alguma autoreatividade das células T, mas ela é quiescente. Essas células T não reconhecem os antígenos para os quais elas são específicas (antígenos crípticos). A barra vermelha representa as barreiras à autoreatividade. Uma resposta imune é iniciada contra um organismo estranho após a apresentação de peptídeos por células apresentadoras de antígenos às células T, junto aos sinais estimulatórios apropriados (Painel B). Se esses peptídeos (esferas vermelhas) forem similares aos peptídeos do hospedeiro (esferas amarelas), então a resposta imune também será dirigida contra o hospedeiro. Esse processo é mediado por células T com potencial autoreativo, que se tornam ativadas pela exposição aos peptídeos exógenos. As células B, auxiliadas por sinais das células T auxiliares ativadas produzem anticorpos que podem causar dano tecidual através da ativação das vias do complemento. Linfócitos T citotóxicos reconhecem antígenos mimetizados associados a moléculas de MHC classe I na superfície dos tecidos-alvo, causando dano tecidual direto. Os antígenos crípticos podem ser liberados após a ocorrência do dano tecidual, levando a uma amplificação da resposta. (Fonte: ALBERT e INMAN, 1999)

Manifestações autoimunes são comumente associadas à retrovirose humana, como nas infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo vírus linfotrópico humano para células T do tipo 1 (HTLV-1) (BOURINBAIAR e ABULAFIA-LAPID, 2005). Pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) frequentemente apresentam uma ampla variedade de doenças autoimunes, como: lúpus eritematoso sistêmico, síndrome do anticorpo anti-fosfolípide, vasculite, cirrose biliar primária, polimiosite, doença de Grave e púrpura trombocitopênica idiopática (ZANDMAN-GODDARD e SHOENFELD, 2002). Outros vírus também parecem estar relacionados com autoimunidade, como: vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), coronavírus, coxsackie vírus e herpes vírus 6 (VON HERRATH e OLDSTONE, 1996). Em infecções bacterianas, o mecanismo de mimetismo molecular pode estar implicado no desenvolvimento da síndrome de Guillian-Barré após a infecção pelo patógeno gastrointestinal *Campylobacter jejuni* e no desenvolvimento de atrofia gástrica associada à infecção por *Helicobacter pylori* (DE LIBERO *et al.*, 2005).

Estímulos não infecciosos, como drogas, também podem alterar o repertório imune. Penicilinas e cefalosporinas, por exemplo, podem ligar-se à membrana das células vermelhas e gerar um novo antígeno que elicitava um autoanticorpo, provocando anemia hemolítica (ARNDT *et al.*, 1999).

Durante a progressão da doença autoimune, células B e T autoreativas contribuem para a disseminação do epítipo (autoantígeno). Células B autoreativas ativadas funcionam como células apresentadoras de antígenos, elas apresentam os peptídeos novos (crípticos) de autoantígenos e expressam moléculas co-estimulatórias. Elas também produzem peptídeos que não foram previamente apresentados às células T, assim, as células T não se tornaram tolerantes a estes peptídeos crípticos. Com o tempo, múltiplos peptídeos novos dentro de uma molécula poderão ativar as células T (LIANG e MAMULA, 2000).

1.9. MANIFESTAÇÕES AUTOIMUNES NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

Baseado em características clínicas e bioquímicas, os quadros de infecção por VHC são quase indistinguíveis de uma hepatite autoimune. Ademais, existem diversos estudos bem documentados que mostram o desenvolvimento de hepatite autoimune após o “clareamento” viral em indivíduos infectados por vírus hepatotóxicos (MANNIS e RAMBUSCH, 1999).

Um possível mecanismo para a indução de hepatite autoimune envolve o conceito de mimetismo molecular, i.e., a similaridade entre determinantes antigênicos do organismo infectante e do hospedeiro. Existem diversos exemplos de mimetismo molecular entre vírus hepatotrópicos e auto-antígenos humanos. Dois segmentos da poliproteína do vírus da hepatite C mostraram uma homologia parcial de uma seqüência de aminoácidos com um

peptídeo de 33 aminoácidos que contém epítomos imunodominantes do citocromo P450 IID6, o qual é alvo dos auto-anticorpos anti-microsossomais de rim e fígado do tipo 1 (LKM-1) (MCFARLANE, 1999; STRASSBURG, 2003). A poliproteína viral também possui regiões similares a antígenos humanos para os autoanticorpos anti-nucleares (FAN) e anti-músculo liso (anti-SMA), podendo resultar em reação imunológica cruzada no indivíduo portador do vírus (GREGORIO *et al.*, 2003).

É fundamental que haja uma distinção exata entre a presença de um quadro autoimune, uma doença autoimune e uma infecção viral, assim como a detecção de uma associação entre eles para o estabelecimento de estratégias terapêuticas seguras e eficazes. Pacientes com doenças autoimunes se beneficiam de tratamento imunossupressor. Em contraste, pode haver exacerbação de quadro ou doença autoimune como resultado da administração de interferon, que é um dos fármacos componentes do esquema de tratamento para hepatite C. Por outro lado, o efeito do tratamento imunossupressor em hepatites virais crônicas traz alguns riscos (SEPÚLVEDA, 2003).

O fenômeno autoimune mais comumente observado em terapias com IFN é a indução de autoanticorpos ou o aumento dos títulos de autoanticorpos pré-existentes. O IFN- α deve induzir a formação de autoanticorpos em mais da metade dos pacientes tratados para hepatite C crônica. Entretanto, os sintomas clínicos diretamente relacionados com a presença de autoanticorpos (anticorpos anti-tireóide, anti-nuclear, anti-cardiolipina, anti-LKM, anti-neutrófilo e fator reumatóide) são raros (CALLEJA *et al.*, 1996; FLODSTRÖM-TULLBERG, 2003).

Uma disfunção tireoidiana está freqüentemente associada à presença de autoanticorpos, porém, também pode ocorrer na ausência destes, podendo ser desencadeada pelos efeitos tóxicos diretos do IFN. Autoimunidade da tireóide, antes, durante e após o tratamento com IFN, ocorre mais significativa e freqüentemente em hepatite C crônica do que em hepatite B, por exemplo, com autoanticorpos antitireoideanos observados em 3% a 5% em casos de hepatite B, e mais do que 20% em casos de hepatite C crônica (DUMOULIN, 1999). É altamente recomendável a dosagem de TSH e auto-anticorpos antitireoideanos e antes do início de qualquer tratamento com IFN e periodicamente durante o seguimento (SEPÚLVEDA, 2003).

Uma variedade de caracteres autoimunes tem sido observada como efeito colateral durante ou após o tratamento com IFN. Esses efeitos incluem o agravamento de doença autoimune pré-existente, assim como o surgimento de um fenômeno autoimune. Enquanto na presença de doença autoimune verdadeira o tratamento com IFN pode ser contra-indicado, o tratamento com IFN- α é comumente seguro e pode ser usado com eficácia para hepatites

virais associadas a autoimunidade, em particular, na hepatite C crônica. Na prática clínica, devem ser tomados cuidados para distinguir essas condições antes do início da terapia com IFN sempre que possível (FLODSTRÖM-TULLBERG, 2003).

Até 2004, estudos tentaram mostrar a correlação existente entre a ocorrência de autoanticorpos e a infecção crônica pelo VHC em pacientes tratados com monoterapia de IFN- α ou terapia combinada de IFN- α com ribavirina, não obtendo resultados conclusivos (FLOREANI *et al.*, 1998; STROFFOLINI *et al.*, 2004; WASMUTH *et al.*, 2004).

Pesquisas atuais, comprovam a existência de autoanticorpos anti-nucleares (FAN), anti-músculo liso (SMA), anti-mitocôndria (AMA) e anti-microsomal de fígado e rim do tipo 1 (LKM-1), os chamados autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA), em pacientes infectados cronicamente pelo vírus da hepatite C, submetidos ou não a terapia anti-viral (ZUSINAITE *et al.*, 2005). Esses estudos encontraram um aumento da ocorrência desses autoanticorpos durante o tratamento, embora este fato não configure uma contra-indicação ao mesmo (GATSELIS *et al.*, 2005; MURATORI *et al.*, 2005).

Apesar do aumento do número de pesquisas nessa área, ainda não existe um consenso entre quais autoanticorpos têm seus níveis elevados devido ao tratamento, nem sua influência no desfecho do mesmo ou a relevância clínica da presença desses autoanticorpos no organismo do paciente. Então, ainda é necessário investigar se o IFN, da maneira que é utilizado nos esquemas atuais de tratamento para hepatite C, pode exacerbar ou induzir um quadro de autoimunidade, além de relacionar isso com a evolução da doença. Assim, determinar a ocorrência de autoanticorpos que caracterizem um quadro de autoimunidade ou uma doença autoimune pode ser crucial para nortear a conduta clínica a ser adotada, podendo servir como marcador importante para diagnóstico, prognóstico e tratamento da hepatite C.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- O objetivo do presente trabalho é traçar e comparar o perfil de autoanticorpos em pacientes com hepatite viral do tipo C antes e durante o tratamento, provenientes do Ambulatório de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará (HUWC).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença dos autoanticorpos séricos anti-músculo liso (SMA), anti-microssomal de fígado e rim do tipo 1 (LKM-1), anti-mitocôndria (AMA) e anticorpos anti-núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico (FAN), através de técnicas de imunofluorescência;
- Relacionar a presença dos autoanticorpos estudados com dados epidemiológicos e clínicos.
- Verificar se a infecção pelo vírus da hepatite C influi na produção de autoanticorpos.
- Avaliar o perfil de autoanticorpos apresentado pelos pacientes diante do esquema terapêutico empregado.

3. METODOLOGIA

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de acompanhamento de 18 meses de pacientes portadores de hepatite C submetidos à terapia combinada de interferon-alfa e ribavirina para avaliar o perfil de produção de autoanticorpos.

3.2. CASUÍSTICA

Foram formados dois grupos de indivíduos:

Grupo 1: Portadores de hepatite C crônica, tendo sido afastados outros diagnósticos de hepatite, que foram atendidos no Ambulatório de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e iniciaram tratamento com interferon-alfa e ribavirina entre abril de 2004 e junho de 2005, sendo acompanhados até novembro de 2006.

Os critérios de inclusão e exclusão e os esquemas de tratamento para esse grupo foram aqueles dispostos na Portaria 863 de 04 de novembro de 2002 do Ministério da Saúde.

Critérios de inclusão:

Foram incluídos no Protocolo de Tratamento aqueles pacientes que possuíam todas as seguintes características:

- a) ser portador de VHC - detecção por tecnologia biomolecular de ácido ribonucléico (teste qualitativo) positiva;
- b) apresentar transaminases acima de uma vez e meia o limite superior da normalidade, em pelo menos três determinações com intervalo mínimo de um mês entre elas, sendo pelo menos uma delas nos últimos seis meses;
- c) ter realizado, nos últimos 24 meses, biópsia hepática onde tenha sido evidenciada atividade necro-inflamatória de moderada a intensa (maior ou igual a A2 pela classificação Metavir ou atividade portal ou peri-septal grau 2 da classificação da Sociedade Brasileira de Patologia) e/ou presença de fibrose de moderada a intensa (maior ou igual a F1 pelas classificações Metavir ou Sociedade Brasileira de Patologia);
- d) ter entre 12 e 70 anos;
- e) ter contagem de plaquetas acima de 50.000/mm³ e de neutrófilos acima de 1.500/mm³.

Critérios de exclusão:

Não foram incluídos no Protocolo de Tratamento pacientes com as seguintes condições:

- a) consumo abusivo de álcool nos últimos 6 meses;
- b) consumo regular de drogas ilícitas (se o paciente estiver em tratamento para dependência química com boa adesão, o tratamento para hepatite C poderá ser considerado);
- c) pacientes transplantados;
- d) pacientes com doenças autoimunes diagnosticadas;
- e) hepatopatia descompensada;
- f) cardiopatia grave;
- g) doença da tireóide descompensada;
- h) neoplasias;
- i) diabetes melito tipo 1 de difícil controle ou descompensada;
- j) convulsões não controladas;
- k) imunodeficiências primárias;
- l) homens e mulheres sem adequado controle contraceptivo;
- m) gravidez (beta-HCG positivo);
- n) não concordância com os termos do Consentimento Informado.

Grupo 2: Amostras de soros de indivíduos doadores de sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) pareados por sexo e faixa etária com os indivíduos do grupo 1.

Critérios de inclusão:

- Ter testes negativos para:

⇒ AntiHBc	⇒ AntiHIV
⇒ HBsAg	⇒ Sorologia para doença de Chagas
⇒ AntiHBs	⇒ VDRL
⇒ AntiVHA	⇒ AntiHTLV I/II
⇒ AntiVHC	

3.3. PROTOCOLO DO ESTUDO

3.3.1. Abordagem do grupo 1

Os pacientes de qualquer sexo ou faixa etária, com sorologia anti-VHC positiva, foram abordados no ambulatório de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio e esclarecidos sobre a pesquisa. Após a assinatura do termo de consentimento (ANEXO I), os pacientes foram submetidos a uma entrevista, onde responderam a um questionário (ANEXO II) composto de perguntas e dados sobre a doença. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue (Fig. 9).

Coleta e estocagem

Dos pacientes, foram obtidas amostras de 10mL de sangue, por punção venosa em tubos sem anticoagulante, em dois momentos, imediatamente antes e seis meses após o início do tratamento. O material coletado ficou em repouso por um período de 2h, para retração do coágulo. Os tubos foram submetidos à centrifugação por 15 minutos e o soro foi pipetado e estocado em tubos tipo eppendorf de 0,6mL em alíquotas de 100µL a – 20°C.

Antes do início do tratamento, os pacientes foram submetidos à biópsia hepática, para que fosse realizado o exame histopatológico do fígado (procedimento previsto na Portaria 863 de 04 de novembro de 2002 do Ministério da Saúde para o início do tratamento).

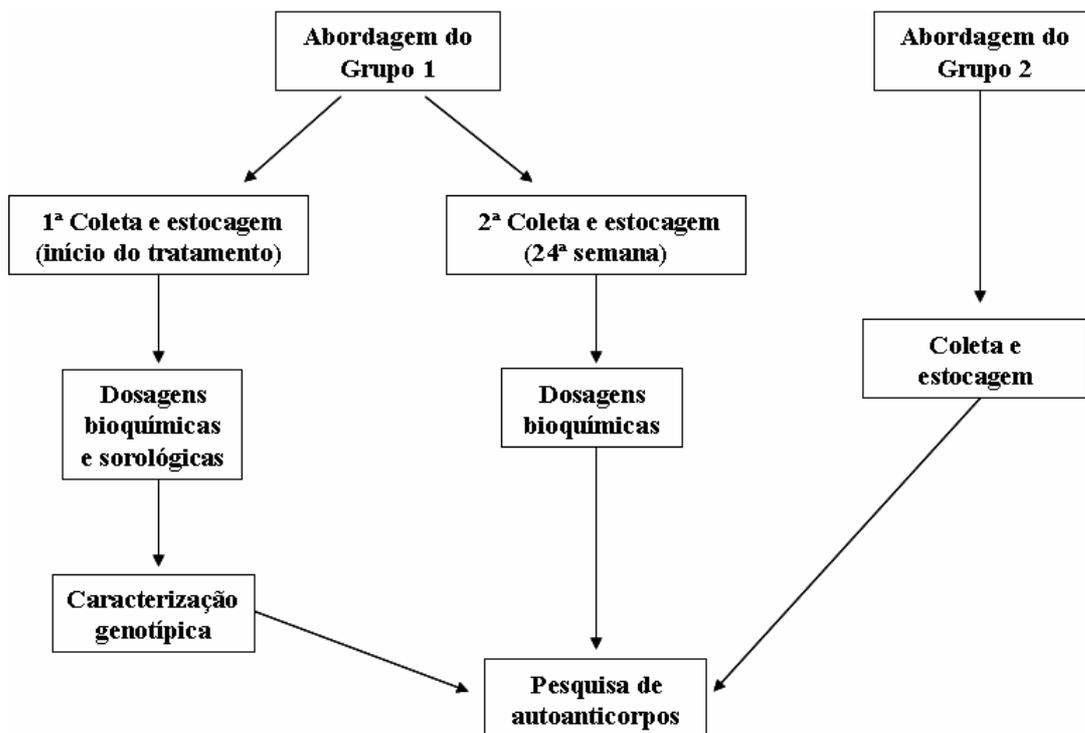


Figura 9: Esquema geral da abordagem dos indivíduos envolvidos na pesquisa.

3.3.2. Abordagem do grupo 2

O material a ser estudado foi obtido do descarte das bolsas de coleta de sangue no HEMOCE. Foi realizada consulta às fichas clínicas de triagem para seleção do sexo e da faixa etária. A estocagem do soro dos indivíduos deste grupo ocorreu de modo semelhante ao descrito para o grupo 1 (Fig. 9).

3.3.3. Descrição do seguimento

O seguimento dos pacientes foi realizado durante 18 meses. O início do seguimento deu-se com a coleta da primeira amostra de sangue, antes do tratamento. Na 24ª semana do seguimento foi coletada a segunda amostra. Depois disso, o paciente continuou sendo acompanhado, com a finalidade de verificar a resposta virológica final ao tratamento (48ª semana, para pacientes com VHC genótipo 1). Naqueles com resposta favorável (detecção do RNA viral negativa), houve um acompanhamento de mais seis meses, para verificação de ocorrência da resposta virológica sustentada.

3.3.4. Caracterização genotípica

A determinação do genótipo viral dos pacientes foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Estudos Avançados em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina, sob a coordenação da Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota, e fez parte da dissertação de Cristianne Sousa Bezerra.

3.3.5. Dosagens bioquímicas e sorológicas

As dosagens de transaminases séricas e os ensaios sorológicos para a pesquisa de anti-VHC, HBsAg, anti-HIV e VDRL foram realizadas no Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio, sob a responsabilidade da Dra. Heliane Baltasar Ribeiro.

3.3.6. Pesquisa de autoanticorpos

Os exames sorológicos foram realizados no Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

➤ **Detecção de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA):**

- **Anticorpos anti-músculo liso (SMA), Anti-microsossomais de fígado e rim (LKM-1), Anticorpos anti-mitochondriais (AMA) e Fator anti-nuclear (FAN).**

Produção de substrato antigênico:

Para a detecção dos autoanticorpos foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta, baseada em Diego Vergani e colaboradores (2004).

Foram utilizadas ratas Wistar, adultas jovens, saudáveis, com peso inferior a 250g. Os animais foram submetidos à analgesia em câmara fechada contendo algodão embebido com éter absoluto, seguido de sacrifício por deslocamento cervical. As ratas foram fixadas com fitas adesivas pelas patas em bandejas cirúrgicas para realização de um corte longitudinal no abdômen através do qual o fígado, o estômago, e os rins foram identificados e extraídos (Fig. 10).



Figura 10: Visualização do corte para retirada dos órgãos.

Do rim, foi retirada a cápsula, cuidadosamente, com o auxílio de uma pinça, evitando danificar a superfície do órgão (Fig. 11). O estômago foi seccionado longitudinalmente para a retirada de restos alimentares. Os três órgãos foram lavados em abundância com solução salina 0,9%, armazenados em um frasco contendo solução salina 0,9% e acondicionados em isopor com gelo para transporte (Fig. 12).



Figura 11: Retirada da cápsula renal.



Figura 12: Lavagem do estômago para retirada de restos alimentares.

Os tecidos eram cortados sobre superfície plástica limpa, utilizando bisturi e pinças para manipulação. Os tecidos foram cortados da seguinte forma: o fígado em cubos de 3 a 4 mm, preferencialmente na região mais espessa (Fig. 13); o estômago em tiras longitudinais (Fig. 14); e o rim, primeiro, sagitalmente, depois em cortes transversais, produzindo cubos contendo pelo menos dois cálices renais e desprezando a região medular (Fig. 15).



Figura 13: Orientação do corte no tecido hepático.

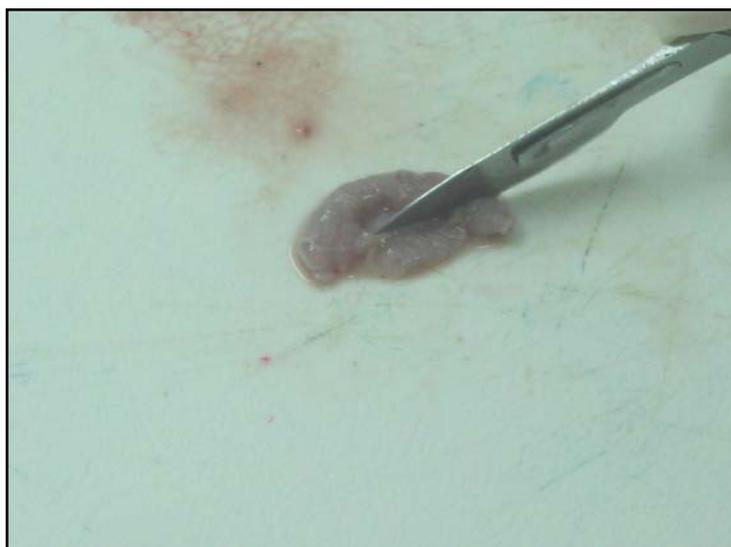


Figura 14: Orientação do corte no estômago.

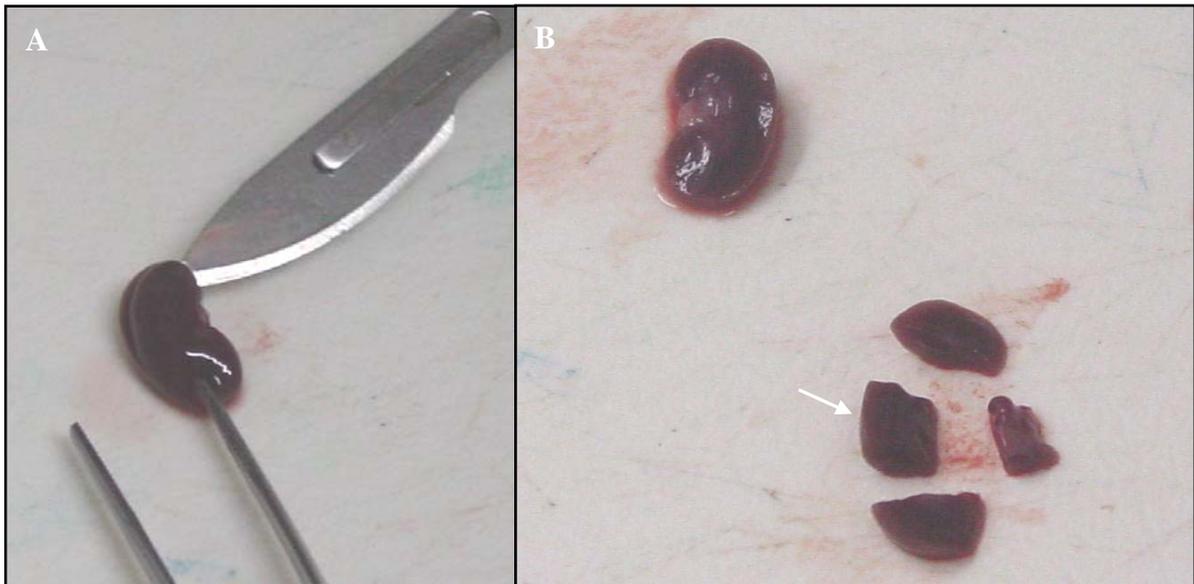


Figura 15: Orientação do corte no rim. (A) Corte sagital do rim. (B) Cortes transversais do rim, conservando dois cálices renais do córtex e desprezando a medula. A seta indica o fragmento utilizado na montagem.

Depois de seccionados, os tecidos foram justapostos, formando um bloco homogêneo. O fígado foi colocado ao lado do rim na região que corresponderia à medula renal. A tira de estômago foi posicionada do outro lado do rim com a camada mucosa voltada para a face externa do bloco (Fig. 16).

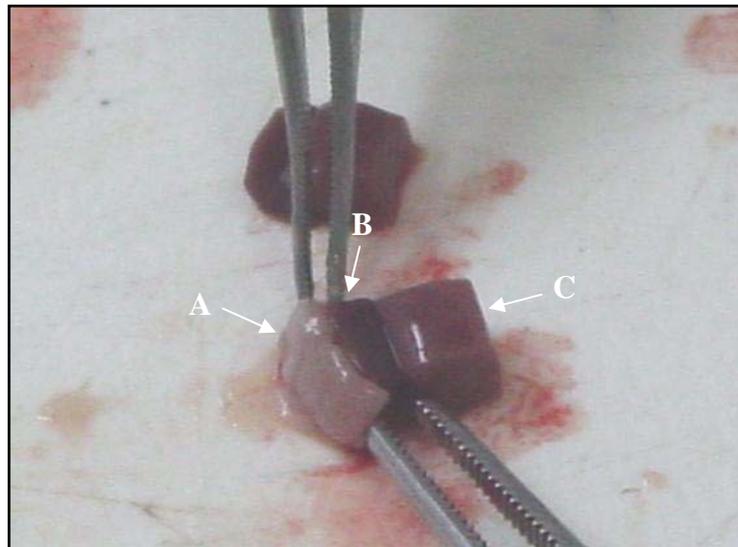


Figura 16: Montagem dos três tecidos no bloco. (A) Estômago com mucosa voltada para a face externa do bloco, colocado sobre a camada cortical do rim (B). (C) Fígado posto ao lado do rim na região que corresponderia à medula renal.

O bloco foi transferido para um suporte metálico contendo uma base de tissue-tek[®] previamente resfriados e levado ao criostato para congelamento a -23°C. Durante o congelamento, depositou-se tissue-tek[®] ao redor do bloco a fim de fazer uma base de apoio para o corte.

Depois de acoplado o suporte no criostato, foi realizado o desbastamento do bloco com cortes grandes, de aproximadamente 20µm, até obter uma superfície lisa, contendo todos os tecidos. A partir daí, o equipamento foi regulado para 3µm, sendo desprezados os primeiros cortes, para o ajuste da espessura. Os cortes seguintes foram pescados e aderidos a lâminas virgens de borda fosca (Lâmina fosca – BIOGLASS), sem adição de fixadores, que foram armazenadas em caixas histológicas plásticas e acondicionadas em freezer comum a -20°C por um período de, no máximo, sessenta dias. Todo o procedimento de corte foi realizado em temperatura não superior a -20° C (ANEXO III).

Teste de imunofluorescência indireta:

Cada amostra de soro dos pacientes foi depositada sobre os cortes histológicos, em diferentes lâminas e em quantidade suficiente para cobri-los, aproximadamente 70µL, na diluição de 1:20 em tampão PBS 0,01M, pH 7,2 na triagem para a pesquisa de SMA, LKM-1, AMA e FAN. As lâminas foram dispostas em câmara úmida, onde permaneceram por 30 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens de cinco minutos com tampão PBS sob agitação moderada (Homogeneizador de Bolsa BHB800 - BENFER) em cubas para lavagem de lâminas (tipo Coplin), as lâminas foram cuidadosamente enxutas com papel de filtro, uma a uma, e antes de a superfície dos tecidos secar, foi coberta com conjugado de anti-Imunoglobulina humana total marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sheep anti-Human IgGAM – THE BINDING SITE) e deixadas em repouso, em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, foram realizadas três lavagens de cinco minutos com tampão PBS, sendo as duas primeiras sob agitação moderada e a última em repouso com adição do corante Azul de Evans na proporção de 10 gotas para 100mL de tampão. Após as lavagens, foi realizada a montagem lâmina-laminula com meio de montagem (glicerol:PBS na proporção de 9:1) e o material foi examinado em microscópio de epifluorescência (Microscópio BX41 / Fonte TH3 – OLYMPUS) para verificação de marcação fluorescente nos tecidos. Foram utilizados controles positivo e negativo obtidos de laboratório de referência (Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto). As amostras que apresentaram qualquer marcação fluorescente foram re-testadas utilizando conjugado classe-específico anti-IgG

(Sheep anti-Human IgG – THE BINDING SITE). A presença de cada autoanticorpo foi verificada de acordo com o padrão de fluorescência apresentado pelos três tecidos. O título do anticorpo foi determinado por diluições sucessivas, partindo de 1:20 até extinção da fluorescência. Em todas as reações, foram utilizados controles positivo e negativo. No caso de detecção de anticorpos anti-nucleares, foi realizada pesquisa qualitativa de FAN em células HEp-2 para determinar o padrão de fluorescência, como descrito posteriormente.

Reatividade em imunofluorescência:

A leitura da marcação fluorescente foi realizada, independentemente, por três profissionais, através de objetiva de 10X. O anticorpo anti-músculo liso (SMA) tem como antígenos três principais grupos de microfilamentos (actina, vimentina e tubulina) e marcam as paredes das artérias dos três tecidos, a camada muscular do estômago e o eixo vascular da lâmina própria da mucosa gástrica. Esse anticorpo pode apresentar quatro padrões distinguíveis através da observação do rim: padrão V, se marcar paredes de veias renais; padrão G, se marcar glomérulos renais; padrão T, se marcar túbulos renais; e padrão VGT, ou F-actin, se marcar todas as estruturas referidas. O anticorpo anti-microssomal de fígado e rim do tipo 1 (LKM-1) tem como antígeno o citocromo p450 e marca de forma brilhante o citoplasma das células hepáticas, fortemente alguns túbulos renais e difusamente as células das glândulas gástricas. O anticorpo anti-mitocôndria (AMA) liga-se ao antígeno M2 e marca as células parietais gástricas com padrão granular brilhante, fracamente o citoplasma das células hepáticas, fortemente todos os túbulos renais, especialmente os menores e distais. Os anticorpos anti-nucleares (FAN) exibem marcação dos núcleos celulares em todos os tecidos.

• **Fator anti-nuclear (FAN) em células epitelióides de carcinoma de laringe humano (HEp-2)**

O termo “fator anti-nuclear” refere-se a uma variedade de autoanticorpos que reagem com constituintes do núcleo celular, nucléolos, citoplasma e aparelho mitótico. A imunofluorescência indireta é o método de referência para a pesquisa de FAN. Para realização dessa técnica, foram utilizados kits para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-nucleares no soro humano (Imuno-Con ANA HEp-2 – WAMA Diagnóstica) de acordo com as instruções do fabricante. O soro de cada paciente e controle foi diluído a 1:40 com tampão PBS diluído (0,01M, pH 7,02). Após 15 minutos à temperatura ambiente, as lâminas foram removidas dos envelopes, identificadas e colocadas em câmara úmida. Para cada ensaio, foram utilizados controles negativo e positivo. Uma gota, aproximadamente

35µL, dos soros diluídos e dos controles foi colocada sobre cada substrato antigênico. As lâminas foram então incubadas por 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de soro foi removido, delicadamente, da superfície da lâmina com jatos de tampão PBS diluído, com auxílio de uma pipeta. Foram realizadas duas lavagens de cinco minutos com tampão PBS diluído sob agitação moderada (Homogeneizador de bolsa BHB800 - BENFER) em cubas para lavagem de lâminas (tipo Coplin). As lâminas foram enxugadas em papel absorvente para retirar o excesso de tampão. Imediatamente, antes que a superfície da lâmina secasse, foi adicionado conjugado de anti-IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas do excesso de luz. Em seguida, o excesso de conjugado foi removido com tampão PBS. Foram realizadas duas lavagens de cinco minutos com tampão PBS diluído sob agitação moderada (Homogeneizador de bolsa BHB800 - BENFER) em cubas para lavagem de lâminas (tipo Coplin) sendo, na última lavagem, adicionado o corante Azul de Evans na proporção de 10 gotas para cada 100mL de PBS. As lâminas foram enxugadas em papel absorvente para retirar o excesso de PBS. Imediatamente, antes que a superfície da lâmina secasse, foi realizada a montagem lâmina-lamínula com meio de montagem (glicerol:PBS na proporção de 9:1), evitando a formação de bolhas. O material foi examinado, imediatamente, em microscópio de epifluorescência (Microscópio BX41 / Fonte TH3 - OLYMPUS) para verificação dos padrões de fluorescência. A pesquisa de FAN foi feita apenas em diluição de 1:40 (triagem), não sendo realizadas diluições seriadas dos testes reagentes. Em todas as reações, foram utilizados controles positivo e negativo. A leitura em microscópio de fluorescência seguiu a padronização do II Consenso Nacional para padronização de FAN em células HEp-2 (Dellavance *et al.*, 2003) e foi realizada, independentemente, por três profissionais.

3.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP) e analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, sendo aprovado no dia 03 de fevereiro de 2005, sob o documento de número 321/04 (ANEXO IV).

Todos os pacientes envolvidos na pesquisa assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I).

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises tabulares e gráficas, utilizando os testes paramétricos de χ^2 para tendências, χ^2 de Pearson com correção de Yates, exato de Fisher e os não paramétricos U de Mann-Whitney e de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. CASUÍSTICA

Durante o período de abril de 2004 a julho de 2005, 120 pacientes foram abordados no Ambulatório de Gastro-Hepatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, todos apresentando sorologia positiva para o anticorpo anti-VHC e com suspeita de hepatite crônica causada pelo vírus C. Em 96 desses pacientes foi detectado RNA viral no sangue periférico, dos quais 34 preencheram os critérios necessários para participar da pesquisa, assinando termo de consentimento informado e sendo submetidos a tratamento associado de interferon e ribavirina. Dois deles utilizaram interferon- α convencional em três aplicações subcutâneas semanais mais ribavirina oral em doses diárias. Os outros 32 foram submetidos à terapia associada de peginterferon em uma aplicação subcutânea semanal e ribavirina oral em doses diárias. Não foi possível determinar o resultado do tratamento para quatro pacientes, visto que três tiveram seus tratamentos suspensos por leucopenia ou plaquetopenia graves e um abandonou o tratamento.

Dos 34 pacientes, 20 eram homens e 14 mulheres. Quanto à raça, 64,7% (22) dos indivíduos se declararam mestiços, 29,4% (10) brancos e 5,9% (2) negros. Apenas dois pacientes tinham menos de 30 anos, quatro tinham entre 30 e 39 anos, dez tinham entre 40 e 49 anos, dezesseis tinham entre 50 e 59 anos e dois tinham mais de 60 anos, sendo a média de idade de 48,65 anos (Tabela 2). Houve maior frequência de indivíduos do sexo masculino com idade entre 50 e 59 anos (29,41%) (Fig. 17). A genotipagem viral foi realizada e foi observado que 79,5% (27) dos pacientes possuíam infecção relacionada ao genótipo 1 do vírus, enquanto que, apenas, 17,6% (6) dos indivíduos apresentavam infecção relacionada ao genótipo 3 do vírus, sendo que, dois pacientes apresentaram genótipo 1a, cinco 3a e quinze 1b. Em 1 paciente não foi possível a determinação do genótipo viral, sendo ele classificado como de genótipo indeterminado. Nenhum paciente apresentou infecção pelos genótipos virais 2, 4, 5 ou 6. O grupo controle foi composto por 20 homens e 14 mulheres, pareados por faixa etária com os pacientes e tendo média de idade igual a 48,23 anos.

Característica	n (%)
<i>Sexo</i>	
Masculino	20 (58,8)
Feminino	14 (41,2)
<i>Faixa Etária (em anos)</i>	
< 30	2 (5,9)
30 a 39	4 (11,8)
40 a 49	10 (29,4)
50 a 59	16 (47)
≥ 60	2 (5,9)
<i>Raça</i>	
Branco	10 (29,4)
Mestiço	22 (64,7)
Negro	2 (5,9)
<i>Genótipo</i>	
1	27 (79,4)
3	6 (17,7)
indeterminado	1 (2,9)

Tabela 2: Distribuição dos pacientes avaliados, segundo sexo, faixa etária, raça e genótipo (n = 34).

Para avaliação de co-infecção, foi realizada pesquisa de anticorpo para o vírus HIV, teste de VDRL e pesquisa do antígeno HBs (vírus da hepatite B). Nenhum paciente foi positivo para o teste de HIV. Dois pacientes apresentaram positividade na pesquisa do antígeno HBs e dois pacientes foram positivos no teste VDRL.

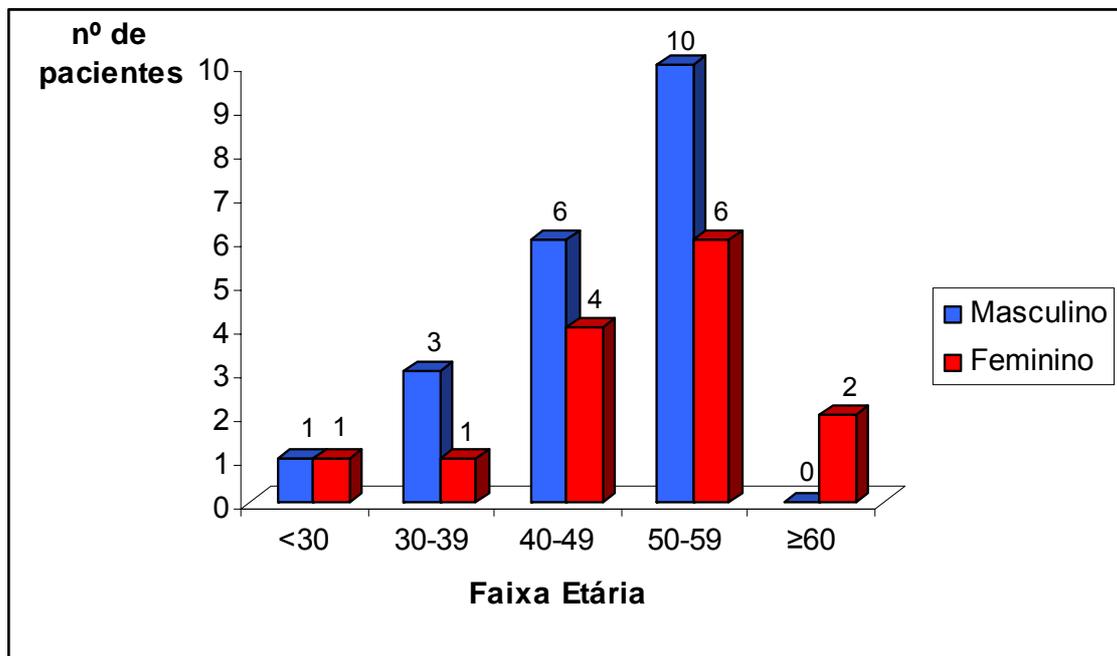


Figura 17: Distribuição da população estudada de acordo com sexo e faixa etária (n=34).

Quanto aos fatores de risco para aquisição da infecção, foram avaliados os seguintes critérios: ter recebido transfusão sanguínea, ter sido submetido a cirurgias, ter compartilhado ou sofrido acidentes com objetos perfurocortantes e possuir tatuagem. Dos 34 pacientes, 4 não apresentaram nenhum dos fatores de riscos pesquisados e 30 relataram pelo menos um deles. Vinte e três pacientes (67,6%) foram submetidos a algum tipo de cirurgia, 17 (50%) já haviam recebido transfusão sanguínea, dez (29,4%) relataram uso ou acidentes com objetos perfurocortantes (aqui estão incluídos os indivíduos usuários de drogas injetáveis) e 2 (5,9%) possuíam tatuagens (Tabela 3). Quinze pacientes relataram exposição a dois fatores de risco: cirurgia e compartilhamento ou acidente com objeto perfurocortante (4), cirurgia e tatuagem (1), cirurgia e transfusão (10). Dois pacientes relataram exposição a três fatores de risco: cirurgia, transfusão e compartilhamento ou acidente com objeto perfurocortante. Apenas um paciente relatou exposição aos quatro fatores de risco pesquisados.

Fator de risco	n (%)
<i>Transfusão sangüínea</i>	
Sim	17 (50)
Não	17 (50)
<i>Cirurgia</i>	
Sim	23 (67,6)
Não	11 (32,4)
<i>Compartilhamento ou acidente com objeto perfurocortante</i>	
Sim	10 (29,4)
Não	24 (70,6)
<i>Tatuagem</i>	
Sim	2 (5,9)
Não	32 (94,1)

Tabela 3: Distribuição dos pacientes avaliados segundo exposição aos fatores de risco relacionados à transmissão do vírus da hepatite C.

4.2. PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM TECIDO PARA PESQUISA DE ANTICORPOS SMA, LKM-1 E AMA

O protocolo padronizado aqui foi desenvolvido a partir daquele sugerido pelo consenso do comitê para sorologias autoimunes do Grupo Internacional de Hepatites Autoimunes (Vergani *et al.*, 2004).

Padrões de fluorescência obtidos a partir de soros controle:

Os soros controles para os autoanticorpos anti-SMA, anti-LKM-1 e AMA foram obtidos de laboratórios de referência e submetidos ao teste de imunofluorescência indireta como descrito anteriormente.

Para determinação do autoanticorpo presente no soro, foi necessário analisar o padrão de fluorescência nos três tecidos: estômago, rim e fígado. Para isso, foi fundamental a identificação precisa das estruturas histológicas. Com a finalidade de facilitar essa identificação, foi realizada coloração hematoxilina-eosina em uma das lâminas produzidas, o

que permitiu avaliar a qualidade do corte histológico e de suas estruturas, bem como a localização das mesmas.

Para o anticorpo anti-microssomal de fígado e rim do tipo 1, foi visualizada marcação fluorescente nas seguintes estruturas: túbulos renais de forma não homogênea e citoplasma das células hepáticas de forma brilhante, o que caracterizou esse anticorpo (Fig. 18).

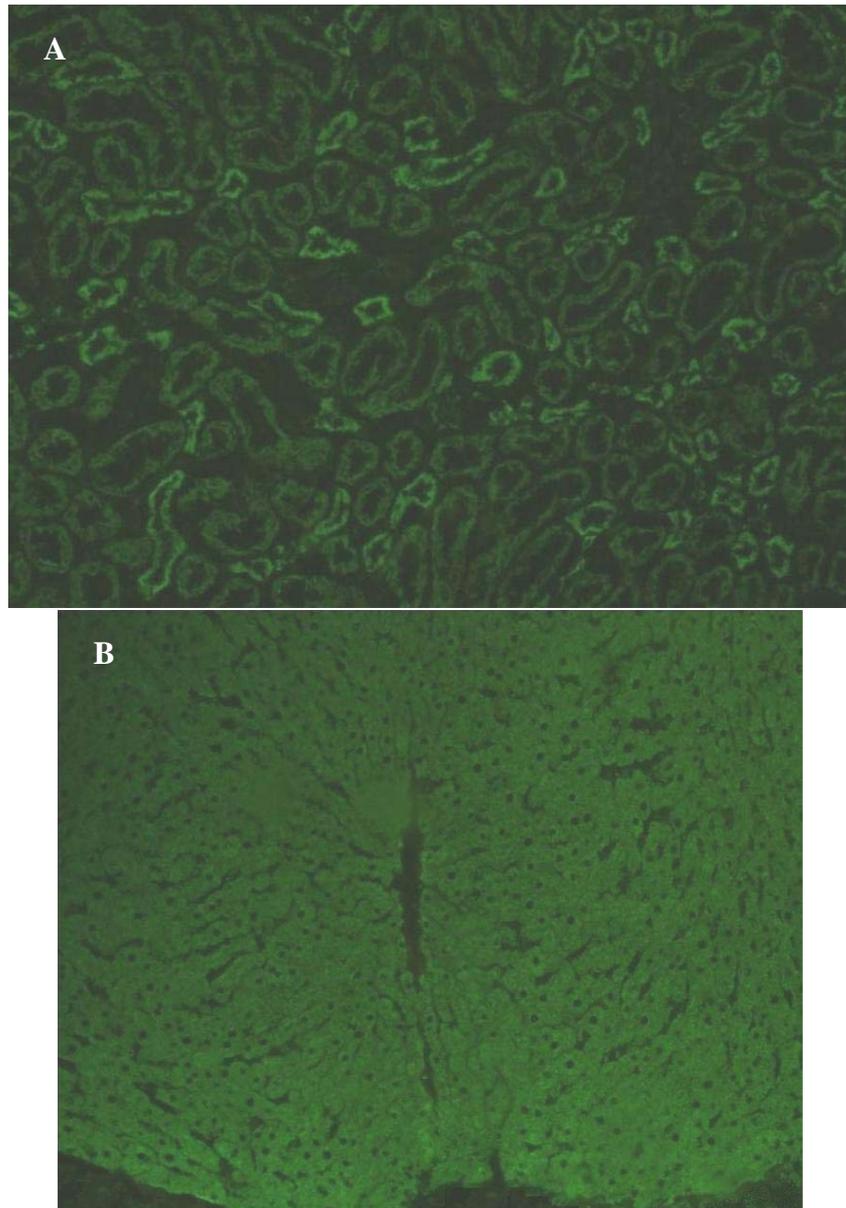


Figura 18: Padrão de fluorescência do anticorpo anti-microssomal de fígado e rim do tipo 1 a partir de soro controle. A: rim, B: fígado.

Para o anticorpo anti-músculo liso, foi visualizada marcação fluorescente nas seguintes estruturas: eixo vascular na lâmina própria da mucosa gástrica e camada muscular do estômago, túbulos e glomérulos renais e paredes de artérias e veias nos três tecidos, o que caracteriza o padrão VGT, ou F-actin, desse anticorpo (Fig. 19).

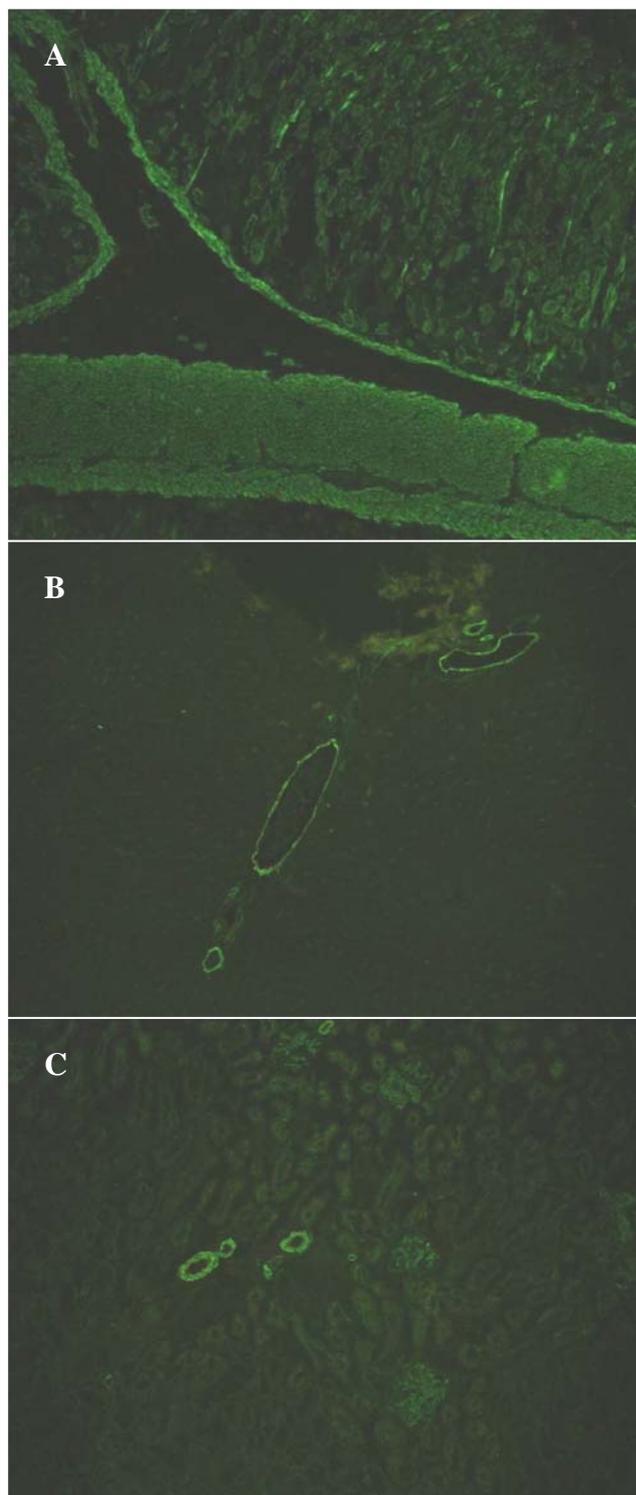


Figura 19: Padrão de fluorescência do anticorpo anti-músculo liso a partir de soro controle. A: estômago, B: fígado, C: rim.

Para o anticorpo anti-mitocôndria, foi visualizada marcação fluorescente nas seguintes estruturas: células da mucosa gástrica, túbulos renais de forma homogênea e citoplasma das células hepáticas, o que caracteriza esse anticorpo (Fig. 20).

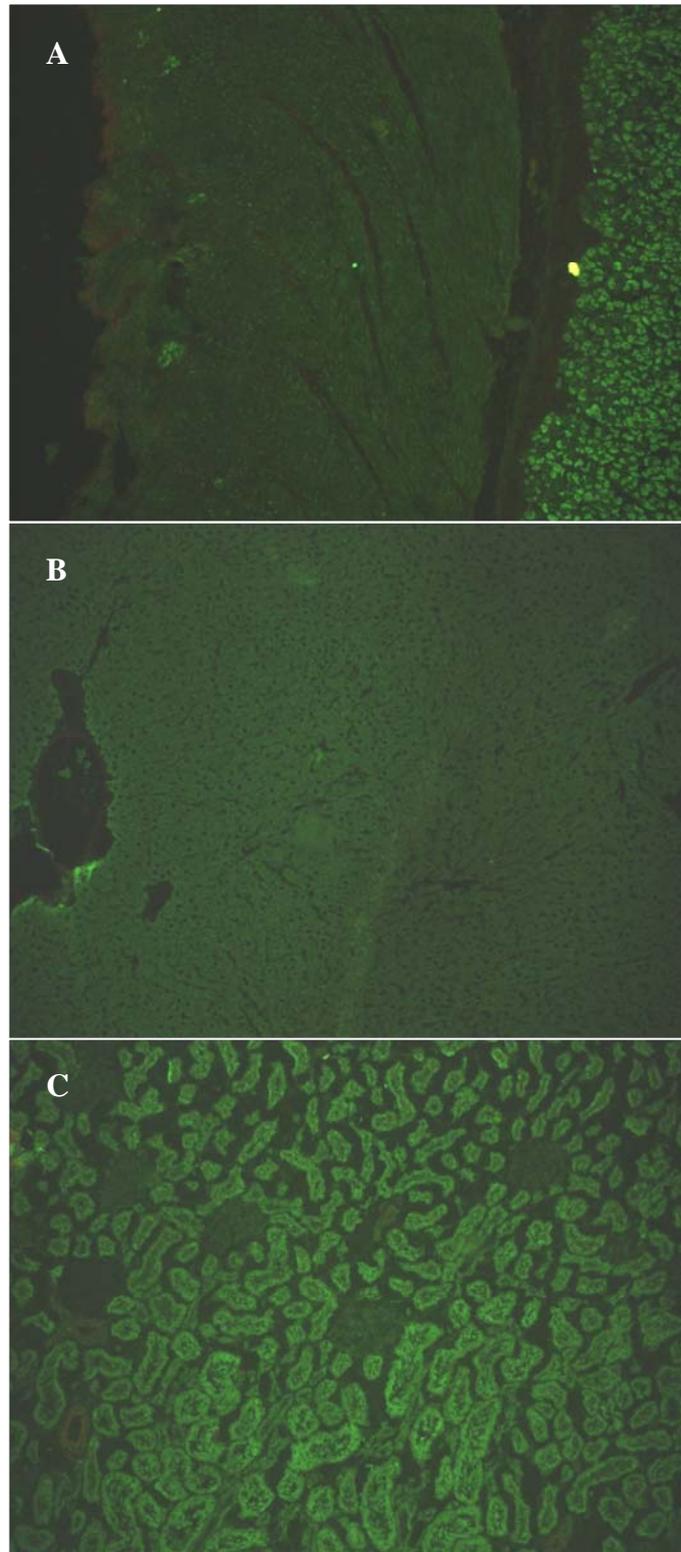


Figura 20: Padrão de fluorescência do anticorpo anti-mitocôndria a partir de soro controle. A: estômago, B: fígado, C: rim.

4.3. PESQUISA DE AUTOANTICORPOS NÃO-ÓRGÃO ESPECÍFICOS (NOSA)

A pesquisa de autoanticorpos não-órgão específicos foi realizada nos 34 pacientes submetidos à terapia combinada de interferon-alfa e ribavirina, sendo obtidas duas amostras: uma antes e outra na 24^a semana do tratamento. A pesquisa também foi realizada nas 34 amostras do grupo controle. Foi considerado como “autoanticorpo reagente” aqueles indivíduos que apresentaram marcação fluorescente compatível com quaisquer dos autoanticorpos pesquisados: FAN, SMA, AMA e LKM-1. A triagem para detecção de NOSA foi realizada utilizando conjugado de anticorpo anti-imunoglobulina humana total (IgGAM) enquanto que a determinação do padrão de fluorescência no tecido e, conseqüentemente, do autoanticorpo foi feita utilizando conjugado de anticorpo anti-IgG. Entre os pacientes, na amostra coletada antes do tratamento, 23 apresentaram autoanticorpos reagentes e 11, não reagentes. Entre as amostras do grupo controle, 24 apresentaram autoanticorpos reagentes e dez foram não reagentes (Fig. 21).

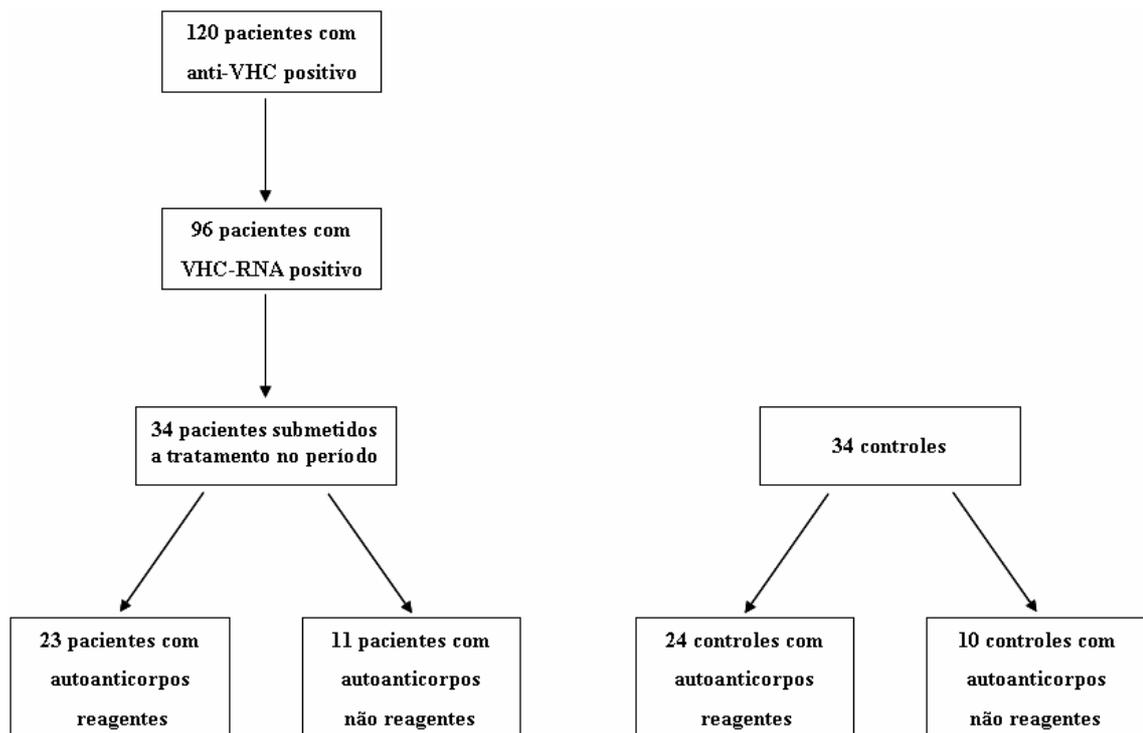


Figura 21: Esquema geral de pacientes e controles estudados na pesquisa e comparação entre a produção de autoanticorpos não-órgão específicos pelos pacientes antes do tratamento e controles ($p=1$, teste do χ^2 de Pearson).

A frequência de autoanticorpos reagentes nos pacientes na 24ª semana de tratamento foi de 24 pacientes, sendo os outros 10 anticorpos não reagentes, resultado igual ao do grupo controle.

Quanto à prevalência de NOSA nos pacientes antes do tratamento, foi observado que 7 (20,59%) produziram anticorpos FAN, SMA e AMA simultaneamente, 10 (29,41%), SMA e AMA e 6 (17,65%) apenas SMA. Durante o tratamento, apenas um paciente passou a apresentar SMA e AMA reagentes. Nas amostras do grupo controle, 2 (5,88%) apresentaram FAN, SMA e AMA reagentes; 20 (58,82%), SMA e AMA; 1 (2,94%), apenas SMA e 1 (2,94%), apenas AMA. Em nenhuma das amostras de pacientes ou controles foi detectado o anticorpo LKM-1 (Tabela 4). Os títulos dos anticorpos foram determinados para SMA e AMA e não houve diferença entre as distribuições dos títulos desses anticorpos entre controles e pacientes, antes ou durante o tratamento ($p=0,841$. χ^2 para tendência linear) (Fig. 22).

Tabela 4: Prevalência de autoanticorpos não-órgão específicos no grupo controle e em pacientes com hepatite C antes e na 24ª semana do tratamento com interferon-alfa e ribavirina.

Autoanticorpo	Antes do tratamento n (%)	24ª semana do tratamento n (%)	Grupo controle n (%)
FAN	7 (20,59)	10 (29,41)	2 (5,88)
AMA	17 (50)	19 (55,88)	23 (67,65)
SMA	23 (67,65)	23 (67,65)	23 (67,65)
LKM - 1	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Todos os autoanticorpos séricos foram determinados por imunofluorescência indireta (IFI). O título de, no mínimo, 1:20 foi considerado como resultado reagente para AMA, SMA e LKM-1, e de 1:40 para FAN. FAN, fator anti-nuclear; AMA, anticorpo anti-mitocôndria; SMA, anticorpos anti-músculo liso; LKM-1, anticorpo anti-microsossomal de fígado e rim do tipo 1.

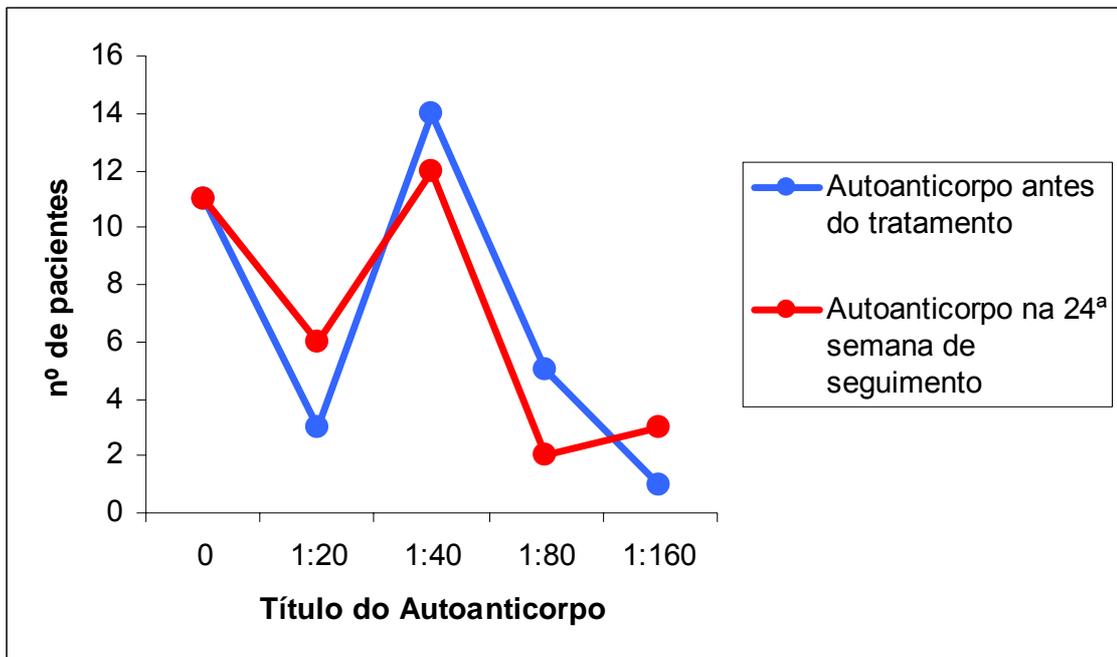


Figura 22: Comparação entre os títulos de SMA (anticorpo anti-músculo liso) apresentados por pacientes antes e durante o tratamento (24ª semana).

A determinação do tipo de anticorpo presente em cada amostra depende do padrão de fluorescência apresentado em cortes de tecido de rato, no caso de SMA, AMA e LKM-1, como descrito acima, e em células HEp-2, no caso de FAN. O padrão de fluorescência em células HEp-2 foi interpretado de acordo com o II Consenso nacional para padronização de FAN (2002). O padrão mais freqüente nos pacientes antes do tratamento foi Nucleolar Homogêneo; na 24ª semana de seguimento, foi Nuclear Pontilhado Fino (Tabela 5). Três pacientes (8,82%) com FAN não reagente antes do tratamento passaram a produzir esse anticorpo e em 2 (5,88%), houve mudança do padrão de fluorescência. Dada a diversidade de padrões encontrados, não foi possível analisar a associação desses padrões com a produção de outros autoanticorpos ou com a resposta ao tratamento.

Tabela 5: Padrões de fluorescência de FAN em células HEp-2 antes e na 24^a semana de tratamento.

Padrões de fluorescência de FAN em HEp-2	Início do tratamento (n=7)	24^a semana de tratamento (n=10)
Nuclear Homogêneo	0	1
Nuclear Pontilhado Fino	2	3
Nuclear Pontilhado Grosso	1	0
Nucleolar Homogêneo	3	2
Nucleolar Pontilhado	1	1
Citoplasmático Pontilhado Reticulado	0	1
Citoplasmático Pontilhado com Pontos Isolados	0	2

Os padrões de fluorescência de FAN (fator anti-nuclear) foram determinados por imunofluorescência indireta (IFI) em lâminas com células HEp-2 e a leitura realizada de acordo com o II Consenso nacional para padronização de FAN em células HEp-2 (2002).

Durante o seguimento foram avaliados os níveis das transaminases (TGO e TGP) nos pacientes. Antes do tratamento, 30 (88,24%) pacientes apresentavam transaminases alteradas e 4 (11,76%), normais. Durante o tratamento (24^a semana), 23 (67,65%) pacientes apresentaram transaminases normais e apenas 11 (32,35%) mantiveram os níveis de transaminases alterados. Nestes pacientes, de um modo geral, houve uma redução significativa dos níveis de TGO e TGP ($p=0,062$ e $p=0,016$, respectivamente. Os valores de p foram obtidos através do teste de Wilcoxon). Não houve relação entre a produção de NOSA e a alteração dos níveis de transaminases (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C com transaminases alteradas e sua correlação com a presença ou não de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA) antes do tratamento.

Transaminases alteradas (U/mL)	n*	NOSA		p	
		reagente mediana (mín-máx)	n** mediana (mín-máx)		
TGO antes do tratamento	20	87,07 (32-190,5)	8	79,9 (35,5-226,4)	0,542
TGO na 24ª semana de tratamento	9	91 (62,2-182)	2	99,3 (78-120,6)	1,00
TGP antes do tratamento	20	121,66 (17-250)	8	93,25 (82-362,15)	0,360
TGP na 24ª semana de tratamento	9	75 (41,4-226)	2	89,35 (67-111,7)	0,814

Nota: n* corresponde ao número de pacientes com autoanticorpos reagentes com transaminases alteradas. n** corresponde ao número de pacientes com autoanticorpos não reagentes com transaminases alteradas. Os valores de *p* foram determinados através da análise do teste U de Mann-Whitney.

Quanto ao tratamento, o paciente que apresenta teste qualitativo positivo, significando que houve detecção do RNA viral no sangue periférico, ao final da terapia é dito não respondedor; aquele que apresenta teste qualitativo negativo pode ser classificado em dois grupos, levando em conta o resultado desse teste 6 meses após o final do tratamento: recidivante, se o teste for positivo, ou com resposta virológica sustentada, se o teste for negativo.

A produção de NOSA pelos pacientes no início do seguimento não demonstrou relação significativa com a resposta ao tratamento. Entretanto, 47,83% dos pacientes (11/23) que apresentaram NOSA reagente foram recidivantes, enquanto apenas 18,18% (2/11) dos que apresentaram NOSA não reagente tiveram essa mesma resposta. Além disso, 45,5% dos pacientes com NOSA não reagente apresentaram resposta virológica sustentada contra somente 17,4% dos NOSA reagente. Não houve associação entre sexo, idade e genótipo viral com a produção ou não de NOSA (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros clínicos e virológicos para pacientes infectados pelo vírus da hepatite C que tiveram ou não autoanticorpos não-órgão específicos reagentes antes do tratamento.

Característica	Pacientes NOSA reagentes (n=23)	Pacientes NOSA não reagentes (n=11)	p
Sexo			
<i>Masculino</i>	15	5	0,234
<i>Feminino</i>	8	6	
Idade	49 (24-66)	52 (28-68)	0,897
Genótipo			
<i>1</i>	18	9	0,902
<i>3</i>	4	2	
<i>indeterminado</i>	1	0	
Resposta ao tratamento *			
<i>Não respondedores</i>	5	3	0,456
<i>Recidivantes</i>	11	2	
<i>Resposta virológica sustentada</i>	4	5	

Nota: O dado de idade corresponde ao valor da mediana (mínimo-máximo). Os valores de *p* foram determinados através da análise do χ^2 de Pearson com correção de Yates, teste exato de Fisher e teste U de Mann-Whitney.

* Dados referentes a trinta pacientes.

Os autoanticorpos isoladamente também não foram significativamente associados à resposta ao tratamento apresentada pelos pacientes. Contudo, todos os pacientes que tiveram FAN reagente no início do seguimento não obtiveram uma resposta satisfatória ao tratamento. Ademais, dos pacientes com SMA reagentes, 76,19% foram recidivantes ou não respondedores, percentagem que contrasta com a dos que tiveram resposta virológica sustentada, que foi de 44,44%. Independente da resposta ao tratamento, o título mediano para SMA e AMA foi de 1:40 e o maior encontrado foi de 1:160 (para SMA), que é considerado um título baixo. Como dito anteriormente, os títulos de anticorpos apresentaram uma variação semelhante dentro dos grupos de amostras estudados (Tabela 8).

Tabela 8: Prevalência e títulos de FAN, AMA e SMA nos pacientes no início do seguimento de acordo com a resposta ao tratamento.

NOSA	Resposta virológica sustentada (n=9)	Recidivantes e não respondedores (n=21)	<i>p</i>
FAN [n(%)]	0 (0)	5 (23,81)	0,142
AMA [n(%)]	2 (22,22)	13 (61,9)	0,198
<i>Título de AMA</i>			
mediana (mín-máx)	1:40 (1:40-1:40)	1:40 (1:20-1:80)	
SMA [n(%)]	4 (44,44)	16 (76,19)	0,103
<i>Título de SMA</i>			
mediana (mín-máx)	1:40 (1:40-1:160)	1:40 (1:20-1:80)	

Os valores de *p* foram calculados com o teste exato de Fisher. FAN, fator anti-nuclear; AMA, anticorpo anti-mitocôndria; SMA, anticorpos anti-músculo liso; LKM, anticorpo anti-microsossomal de fígado e rim.

Dentre os pacientes NOSA reagente antes do tratamento, 4 (20%) apresentaram resposta virológica sustentada e 16 (80%) foram recidivantes ou não-respondedores. A associação entre sexo, idade, genótipo viral e resposta ao tratamento não foi estatisticamente significativa. Porém, foi observada uma maior prevalência dos pacientes com genótipo viral tipo 1 entre os indivíduos recidivantes ou não-respondedores (Tabela 9).

Tabela 9: Distribuição dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C NOSA reagente antes do tratamento, segundo sexo, idade e genótipo viral, relacionados ao resultado do tratamento.

Característica	Resposta virológica sustentada	Recidivantes e não respondedores	<i>p</i>
	(n=4)	(n=16)	
Sexo			
<i>Masculino</i>	3	10	0,560
<i>Feminino</i>	1	6	
Idade	52 (35-56)	51,5 (24-66)	0,123
Genótipo			
<i>1</i>	3	13	0,530
<i>3</i>	1	2	
<i>indeterminado</i>	0	1	

Nota: O dado de idade corresponde ao valor da mediana (mínimo-máximo). Os valores de *p* foram determinados através da análise do χ^2 de Pearson com correção de Yates, teste exato de Fisher e teste U de Mann-Whitney.

Os autoanticorpos pesquisados durante o tratamento, mais precisamente na 24ª semana, tiveram proporções semelhantes aos apresentados antes do tratamento quando analisados em conjunto. Ainda assim, os pacientes que tiveram NOSA reagente nessa etapa do seguimento, tenderam a apresentar uma resposta não favorável. Doze deles (57,14%), apesar de terem obtido resposta virológica ao final do tratamento, voltaram a apresentar o RNA viral no sangue seis meses após o término da terapia (recidivantes) e somente 4 (19,05%) obtiveram resposta virológica sustentada. Já naqueles em que não foram detectados NOSA, mais da metade apresentou resposta virológica sustentada (55,56%). Essa relação entre a presença de NOSA durante o tratamento e a qualidade da resposta mostrada pelo paciente foi estatisticamente significativa ($p=0,047$) (Tabela 10).

Tabela 10: Relação entre pacientes com autoanticorpos não-órgão específicos reagentes ou não na 24^a semana de tratamento de acordo com o tipo de resposta apresentada.

	Autoanticorpos não-órgão específicos na 24 ^a semana de tratamento		<i>p</i>
	Reagente n=21	Não reagente n=9	
Resposta virológica sustentada	4 (19,05)	5 (55,56)	0,047
Recidivantes	12 (57,14)	1 (11,11)	
Não respondedores	5 (23,81)	3 (33,33)	

O valor de *p* foi determinado através da análise do χ^2 de Pearson com correção de Yates.

Quando os autoanticorpos foram analisados individualmente na comparação com o resultado da terapia, encontrou-se uma associação importante entre FAN reagente e resposta insatisfatória ao tratamento. Oito pacientes comprovaram essa relação, visto que eles foram os únicos a apresentar FAN reagente e mostraram-se recidivantes ou não respondedores. Por outro lado, todos os pacientes que tiveram pesquisa de FAN não reagente apresentaram resposta virológica sustentada ($p=0,035$). Esse mesmo tipo de resposta foi obtido por 55,56% dos pacientes que tiveram SMA não reagente ($p=0,103$) e 66,67% que tiveram AMA não reagente ($p=0,099$) (Tabela 11).

Tabela 11: Prevalência de FAN, AMA, SMA e LKM-1 reagentes ou não na 24ª semana de seguimento em pacientes com hepatite C distribuídos segundo a resposta ao tratamento.

Autoanticorpo	Resposta virológica sustentada (n=9)	Recidivantes e não respondedores (n=21)	<i>p</i>
FAN			
<i>Reagente [n(%)]</i>	0 (0)	8 (38,1)	0,035
<i>Não reagente [n(%)]</i>	9 (100)	13 (61,9)	
AMA			
<i>Reagente [n(%)]</i>	3 (33,33)	14 (66,67)	0,099
<i>Não reagente [n(%)]</i>	6 (66,67)	7 (33,33)	
SMA			
<i>Reagente [n(%)]</i>	4 (44,44)	16 (76,19)	0,103
<i>Não reagente [n(%)]</i>	5 (55,56)	5 (23,81)	
LKM-1			
<i>Reagente [n(%)]</i>	0 (0)	0(0)	-
<i>Não reagente [n(%)]</i>	9 (100)	21 (100)	

Os valores de *p* foram calculados utilizando o teste exato de Fisher. FAN, fator anti-nuclear; AMA, anticorpo anti-mitocôndria; SMA, anticorpo anti-músculo liso; LKM, anticorpo anti-microsossomal de fígado e rim.

A figura 23 mostra um diagrama que proporciona uma visão geral da produção de autoanticorpos antes e durante o tratamento, relacionada com a resposta à terapia. Dos 34 pacientes submetidos ao tratamento, 11 tiveram, em sua amostra inicial, pesquisa de NOSA não reagente e 23, reagente. Dos pacientes não reagentes, 10 permaneceram nessa condição durante o seguimento e, quanto à resposta ao tratamento, 5 (45,5%) apresentaram resposta virológica sustentada; um (9,1%), recidivante; três (27,3%) não responderam e um (9,1%) teve o tratamento suspenso. Apenas um paciente desenvolveu anticorpos SMA e AMA durante o tratamento, sendo os mesmos detectados na amostra coletada na 24ª semana em um título de 1:20, e, apesar de ter mostrado uma resposta virológica final do tratamento positiva, o paciente foi recidivante após seis meses. Dos 23 pacientes com NOSA reagente, em 9 (39,13%), o título permaneceu inalterado durante o seguimento, dos quais 2 apresentaram

resposta virológica sustentada, 1 foi recidivante e 3 não respondedores, 1 abandonou o tratamento e 2 tiveram seus tratamentos suspensos; em 8 pacientes houve aumento do título de autoanticorpos, tendo 1 paciente apresentado resposta virológica sustentada, 6 sido recidivantes e 1 não respondedor; em 6 pacientes houve redução do título de autoanticorpos, tendo 1 paciente apresentado resposta virológica sustentada, 4 sido recidivantes e 1 não respondedor à terapia combinada de interferon-alfa e ribavirina.

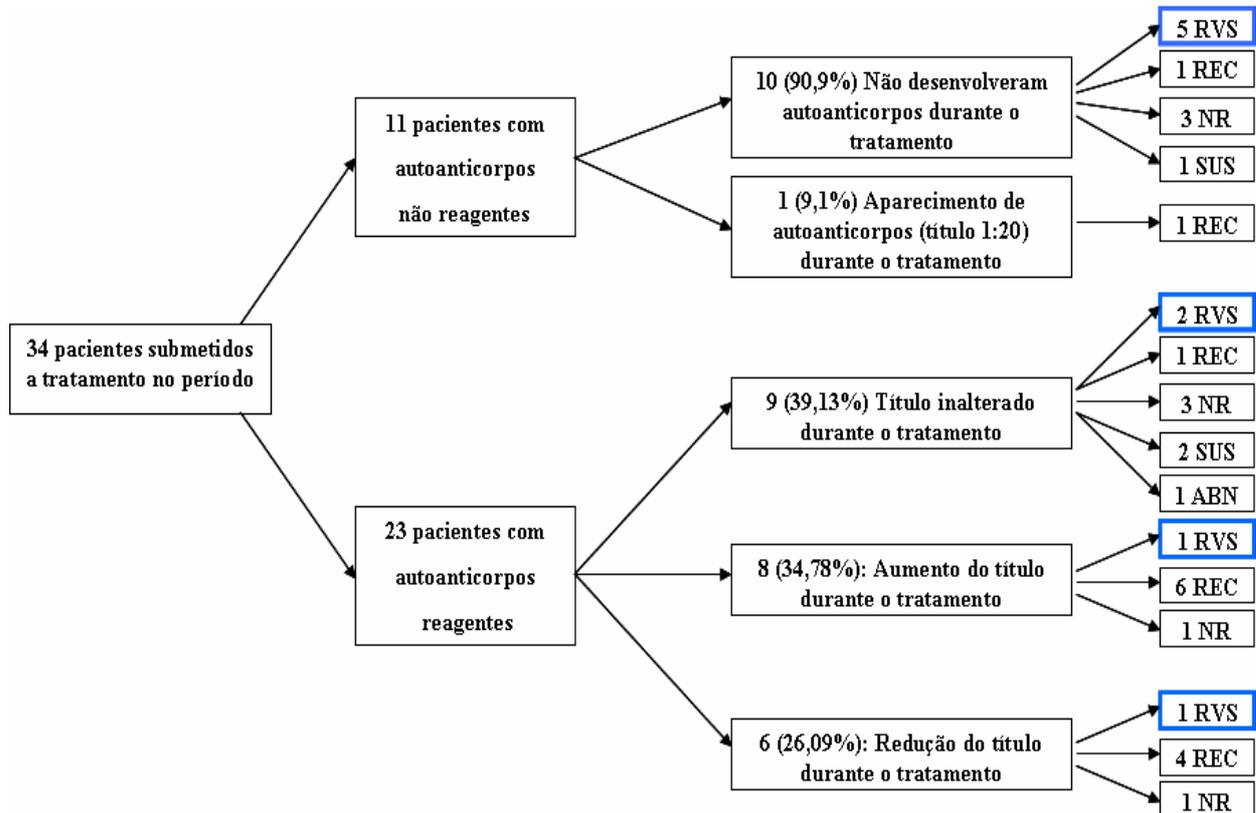


Figura 23: Resposta ao tratamento combinado de interferon-alfa e ribavirina em pacientes com hepatite C e a relação com a presença de autoanticorpos. RVS: resposta virológica sustentada, REC: recidivante, NR: não respondedor, SUS: tratamento suspenso, ABN: abandono de tratamento.

5. DISCUSSÃO

Os estudos relacionados à hepatite C são muito recentes. Tendo como base a descoberta do vírus, que ocorreu no final da década de 80 (CHOO *et al.*, 1989), percebe-se que essa doença é especificamente pesquisada há pouco mais de uma década. Antes disso, só era possível a identificação dos vírus das hepatites A e B, sendo as outras hepatites virais denominadas não-A, não-B (PRINCE *et al.*, 1974). Com o progresso científico, foram criados os primeiros testes para investigação da infecção, que utilizavam a técnica de ELISA para detecção de anticorpos anti-VHC (KUO *et al.*, 1989), determinando apenas se o paciente já entrara em contato com o vírus. Em seguida, surgiram os exames de biologia molecular, que detectaram o RNA da partícula viral no sangue periférico, confirmando se a infecção estava realmente presente (CHOO *et al.*, 1989). Contudo, o alto custo desse tipo de tecnologia, torna-a pouco acessível à grande parte da população.

Desde 1993, os hemocentros brasileiros incluíram na triagem das bolsas de sangue para doação os testes para hepatite C, exceto os de biologia molecular. Contudo, apesar de esses avanços terem ocorrido de maneira rápida, até essa data muitas transfusões de sangue contaminado com VHC foram realizadas, tornando-as um fator de risco para a infecção viral (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005). Dos 34 pacientes que participaram da pesquisa, 11 já haviam doado sangue. Como a doença é, na maioria das vezes, assintomática, antes da realização de exames específicos para hepatite C era difícil suspeitar dessa infecção. Por isso, durante muito tempo, houve uma transmissão silenciosa do VHC entre a população. Além disso, a transfusão de sangue e seus derivados não é a única via de transmissão do vírus, que pode ser veiculado também através de instrumentos que entrem em contato com o sangue do indivíduo contaminado: agulhas (acidentes com profissionais de saúde, prática de *body-piercing*, compartilhamento entre usuários de drogas e na confecção de tatuagens), alicates de unha, instrumentos dentários e cirúrgicos, lâminas de barbear, navalhas de cabeleireiros, entre outros (HELLARD *et al.*, 2003; KIM, 2002). Existem, portanto, diversas maneiras de transmitir e de adquirir o VHC nas atividades mais cotidianas. Na amostra estudada, há 4 pacientes que não relataram exposição a nenhum dos fatores de risco avaliados (transfusão sanguínea, cirurgia, tatuagem e compartilhamento ou acidente com objeto perfuro cortante), o que comprova a importância da transmissão cotidiana, onde deve ser incluída também a via sexual, embora não haja comprovação epidemiológica de sua existência (SHUSTOV *et al.*, 2005; STROFFOLINI *et al.*, 2001).

Outro fator que contribui para a transmissão silenciosa do VHC é o fato de a doença tender à cronificação em 80% dos pacientes (LAUER e WALKER, 2001), fazendo com que

eles tenham um longo período, em torno de 20 anos, para disseminar o vírus sem sequer terem conhecimento de que estão infectados. Nesse estudo, os pacientes apresentaram uma média de idade de 48,65 anos, tendo o mais jovem 24 e o mais velho 68 anos. O paciente que relatou o maior tempo de conhecimento da infecção foi de 4 anos e a maioria soube que estava infectado há menos de um ano. Não é possível precisar o tempo total de infecção, dada a diversidade das possibilidades de transmissão do vírus. Boa parte dos pacientes descobre a infecção por conta da triagem dos hemocentros, quando tentam fazer uma doação de sangue. Tal observação pode explicar a preponderância do sexo masculino sobre o feminino na amostra pesquisada, já que são os homens os doadores de sangue mais frequentes.

Como afirmado anteriormente, o VHC não é um vírus hepatotóxico e a hepatite se dá pela resposta imunológica do indivíduo infectado à presença do vírus, provocando a morte de células do fígado (STRASSBURG, 2003). Então, o tratamento empregado para essa doença não é somente antiviral, mas também estimulador do sistema imunológico, permitindo que esse produza um nível de resposta mais elevado a fim de tentar debelar a infecção viral. A droga utilizada é o interferon, que é uma citocina promotora da inflamação e que pode ser administrada em monoterapia ou em terapia combinada com ribavirina. Esta, apesar de ser um antiviral, neste tratamento funciona como um imunomodulador, aumentando a produção de citocinas que também participam da resposta inflamatória (SVIRTLIH *et al.*, 2005). No Brasil, a primeira regulamentação para o tratamento de pacientes com hepatite C foi publicada em 2002 através da Portaria 863 do Ministério da Saúde. No Hospital Universitário Walter Cantídio, o fornecimento de rotina da medicação liberada pelo Governo Federal teve início em 2004, coincidindo com o início da presente pesquisa.

O tratamento para hepatite C ainda é tema de diversas pesquisas, que pretendem tanto aprimorar a terapia em si, que tem uma eficácia variada frente à diversidade genotípica viral, quanto avaliar seus efeitos diretos e indiretos. Um desses efeitos está relacionado com a questão de a combinação de interferon e ribavirina produzir um aumento da resposta imunológica pró-inflamatória não somente contra as células infectadas pelo VHC, mas no organismo como um todo, o que pode induzir o indivíduo a apresentar, quadros, fenômenos ou doenças autoimunes.

Independente do tratamento, várias manifestações imunopatológicas têm sido relacionadas à infecção pelo vírus da hepatite C, como: crioglobulinemia, tireoidite autoimune, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, glomerulonefrite, líquen plano, poliarterite nodosa e diabetes (BOGDANOS *et al.*, 2000). Ademais, a existência de uma co-infecção, com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), por exemplo, pode significar um risco maior para o desenvolvimento de autoimunidade (ADEYEMI *et al.*, 2005). Este fator,

especificamente, não influenciou a produção de autoanticorpos na amostra estudada, visto que apenas três pacientes apresentavam indícios de co-infecção: um com VHB (HBsAg positivo), um com sífilis (VDRL reagente) e mais um com ambas as infecções citadas.

Nesse trabalho, foram pesquisados os NOSA: fator anti-nuclear (FAN), anticorpo anti-músculo liso (SMA), anticorpo anti-mitocôndria (AMA) e anticorpo anti-microsomal de fígado e rim do tipo 1 (LKM-1). Para pesquisa desses autoanticorpos, utilizam-se as técnicas de imunofluorescência indireta em células HEp-2 (FAN) e em cortes histológicos de estômago, rim e fígado de rato (SMA, AMA e LKM-1). Esta foi padronizada durante a atual pesquisa baseada em um protocolo desenvolvido por Vergani e colaboradores (1994).

Algumas modificações e observações foram feitas ao longo do processo de padronização a fim de produzir uma melhor qualidade para detecção dos NOSA. A extração de órgãos da rata Wistar branca foi realizada de acordo com a orientação do protocolo base (VERGANI *et al.*, 1994). Para montagem, o estômago seria cortado em tiras longitudinais e enrolado, formando um cilindro, o rim seria cortado longitudinalmente e em cubos de 3 a 4mm, e o fígado seria cortado em cubos de 3 a 4mm, não importando a direção, sendo esses fragmentos justapostos, imersos em tissue-tek[®] e congelados em nitrogênio líquido. Durante a padronização, essa montagem não favoreceu os cortes histológicos em criostato, provavelmente, por conta da diferença de textura e resistência dos tecidos no momento do corte. Adotou-se, então, uma nova montagem, justapondo o cubo de fígado ao de rim na região que corresponderia à medula renal e a tira de estômago ao lado do córtex com a mucosa gástrica voltada para face externa do bloco, que foi submetido a congelamento em criostato em uma base de tissue-tek[®] à temperatura de -22°C. Dessa forma, todos os tecidos foram cortados simultaneamente, sem provocar o esmagamento de nenhuma estrutura. Um cuidado importante tomado no momento do corte do cubo de rim foi o de garantir que este incluísse sempre a região de dois cálices renais no córtex, para que houvesse uma abundância de túbulos e glomérulos, sendo a região medular sempre retirada. As navalhas utilizadas para os cortes histológicos deviam ser novas e foram substituídas na produção de cada lote de lâminas. Estas precisavam estar bem limpas para promover uma melhor aderência do tecido. Para realização dos cortes histológicos, foi fundamental que a temperatura do criostato estivesse entre -20°C e -22°C, e que a espessura estivesse regulada em 3 a 4µm. Isso garantiu que a organização do tecido ficasse preservada e que houvesse uma camada fina de células a ponto de evitar uma sobreposição de marcações fluorescentes no momento da leitura do exame. Também foi importante realizar uma coloração seqüencial das lâminas produzidas com hematoxilina-eosina, para verificar se as estruturas de interesse estavam presentes e íntegras.

Quanto ao armazenamento das lâminas com os cortes histológicos, o protocolo base propôs que fosse feito a -20°C por um período máximo de três meses. Nesse estudo, verificou-se uma queda na qualidade de detecção dos autoanticorpos, principalmente o SMA, quando o tempo de armazenamento excedeu três semanas, provavelmente, decorrente da degradação do antígeno de interesse.

Outra modificação que foi implementada diz respeito ao número de lavagens realizado para retirar o excesso do soro testado e de conjugado, que foi aumentado de dois para três devido à grande quantidade de marcações fluorescentes inespecíficas e de depósitos de conjugado, respectivamente. Tal medida surtiu efeito positivo e ajudou a obter uma imagem mais limpa e uma marcação mais precisa, facilitando a interpretação dos padrões de fluorescência do tecido e a identificação do autoanticorpo envolvido. Além disso, durante toda a realização do procedimento, foi fundamental garantir que a superfície do tecido estivesse sempre úmida, pois o ressecamento promove uma marcação fluorescente que dificulta a interpretação no momento da leitura.

O protocolo base também sugeria que fosse utilizado conjugado de anticorpo anti-imunoglobulina total humana na realização da imunofluorescência indireta. No presente estudo, esse conjugado foi utilizado apenas para triagem dos pacientes, por produzir um grande número de ligações inespecíficas e de depósitos, especialmente na mucosa gástrica, entre as células parietais. Para a determinação final do autoanticorpo e seu título, foi utilizado conjugado de anticorpo anti-imunoglobulina G humana, já que esta imunoglobulina está relacionada com os processos crônicos e é também utilizada nos kits comerciais para detecção de NOSA por imunofluorescência indireta.

A escolha dos autoanticorpos FAN, SMA, AMA e LKM-1 para essa pesquisa foi motivada pela relação entre eles e a hepatite autoimune. Dessa forma, tendo o fígado como alvo de estudo, foi possível avaliar se o órgão afetado pela infecção viral também poderia sê-lo pelo quadro, fenômeno ou doença autoimune. Dos 120 pacientes com anti-VHC positivo, em 24 não foi detectada a presença de RNA viral no sangue periférico por PCR qualitativo, o que pode ter ocorrido pelos seguintes motivos: (1) houve uma infecção aguda debelada pelo indivíduo, que passou a apresentar apenas os anticorpos contra o vírus, (2) a carga viral do paciente era muito baixa e não pôde ser detectada pelo exame, (3) ocorreu algum erro no acondicionamento ou manipulação da amostra, levando a degradação do RNA viral antes da realização do teste, (4) a liberação intermitente do vírus, ou (5) a um resultado falso positivo da sorologia anti-VHC (BEZERRA, 2006). Nos outros 96 pacientes o teste qualitativo foi positivo e desses, 34 iniciaram tratamento combinado de interferon-alfa e ribavirina durante o período da pesquisa, sendo acompanhados até o sexto mês após o final da terapia para avaliar

tanto a produção de anticorpos quanto a eficácia do tratamento. Três pacientes tiveram seus tratamentos suspensos por terem apresentado plaquetopenia ou leucopenia graves e um, abandonou o tratamento. De todos os pacientes foi possível realizar coleta de duas amostras: uma no início e a outra na 24ª semana do tratamento, já que essa semana corresponde ao final do tratamento para os indivíduos portadores do genótipo 3 e à metade do tratamento para o genótipo 1. Em ambas as amostras, foram pesquisados os NOSA.

A pesquisa de autoanticorpos na primeira amostra teve duas finalidades: (1) servir de parâmetro para avaliação da produção de autoanticorpos durante o tratamento e (2) comparar a produção de NOSA em indivíduos infectados pelo VHC com a de indivíduos saudáveis (grupo controle), que eram doadores de sangue no hemocentro estadual (HEMOCE).

Segundo Behar e Porcelli (1995), a doença autoimune é a consequência de uma resposta imune contra autoantígenos, que resulta em dano e eventual disfunção de órgãos-alvo. Apesar de a causa da maioria das doenças autoimunes ser desconhecida, a ocorrência de uma infecção tem sido utilizada para explicar o desenvolvimento da autoimunidade. O dano tecidual causado pela infecção, promoveria a liberação de antígenos intracelulares, que estimulariam uma resposta imune na forma de produção de autoanticorpos (BOGDANOS e MCFARLANE, 2003). Isso explicaria porque diferentes viroses são capazes de induzir um padrão similar a desordens autoimunes e porque esses mesmos vírus, que são parasitas intracelulares obrigatórios, estão associados à produção de anticorpos reativos a uma grande variedade de componentes celulares. Daí a importância de verificar se a infecção pelo vírus da hepatite C pode ser causa de autoimunidade.

Neste aspecto, houve uma produção semelhante de autoanticorpos entre os indivíduos infectados antes do tratamento, que foram 23 NOSA reagentes e 11 não reagentes, e os do grupo controle, que foram 24 NOSA reagentes e 10 não reagentes. Dos indivíduos FAN reagentes, 7 (20,59%) eram pacientes e 2 (5,88%) faziam parte do grupo controle. Para SMA, houve o mesmo número de indivíduos reagentes, 23 (67,65%), em pacientes e controles. Para AMA, 17 (50%) pacientes foram reagentes, enquanto no grupo controle, foram 19 (55,88%). Outros estudos mostraram que os NOSA estão presentes em mais de 50% dos pacientes infectados pelo VHC. Especificamente, o anticorpo SMA é o mais frequente (14% a 66%), seguido pelo FAN (6% a 41%) e pelo LKM-1 (0% a 11%), sendo os outros NOSA, como anticorpo anti-célula parietal gástrica, AMA e anticorpo anti-neutrófilos citoplasmáticos, menos frequentes (CASSANI *et al.*, 1997; GREGORIO *et al.*, 1998; MURATORI *et al.*, 2003; BOGDANOS *et al.*, 2004; SROFFOLINI *et al.*, 2004; WASMUTH *et al.*, 2004). Entre os pacientes, os valores de prevalência de FAN e LKM-1 coincidem com os encontrados por outros autores e o de SMA são bastante próximos, não contradizendo os achados da literatura.

Por outro lado, na amostra estudada, a percentagem de AMA reagente é bem superior. A relevância de tal fato é questionável, visto que as freqüências de SMA e AMA são bem próximas entre pacientes e controles. Essa semelhança se refletiu também em relação aos títulos, que eram baixos e cuja análise da tendência linear mostrou que não havia diferença entre as distribuições em pacientes e controles. Os títulos de NOSA em pacientes infectados pelo VHC tendem a ser mais baixos quando comparados com os pacientes que apresentam desordens autoimunes (CASSANI *et al.*, 1997; GREGORIO *et al.*, 1998; VERGANI *et al.*, 2004).

Portanto, nessa amostra não houve significância entre a infecção viral e a produção de NOSA. Por outro lado, não se pode afirmar que essa relação não existe, visto que o número de indivíduos pesquisado foi muito reduzido. Faz-se necessária, então, a realização de novos estudos com uma população bem mais ampla, visto que o vírus da hepatite C possui, em sua poliproteína, segmentos que apresentam algum grau de homologia com peptídeos humanos, como o citocromo p 450IID6, que é o sítio de ligação dos autoanticorpos LKM-1 (MCFARLANE, 1999; KERKAR *et al.*, 2003; STRASSBURG *et al.*, 2003), os microfilamentos de actina, que são os sítios de ligação do autoanticorpo SMA e três antígenos nucleares, que são sítios de ligação de FAN (GREGORIO *et al.*, 2003), sendo possível a produção desses autoanticorpos pelo mecanismo de mimetismo molecular. Já existem dados suficientes para comprovar que o anticorpo LKM-1 em pacientes com hepatite C presta uma contribuição direta para o agravamento da doença hepática. Esses autoanticorpos aumentam a atividade das transaminases durante a terapia com interferon, estão relacionados com achados histológicos hepáticos mais graves e são marcadores da hepatite autoimune do tipo 2 (CASSANI *et al.*, 1997; GREGORIO *et al.*, 1998). Para os outros NOSA, como FAN e SMA, ainda são necessários estudos mais amplos para fornecer uma resposta conclusiva sobre sua patogenicidade nesses pacientes (BOGDANOS e MCFARLANE, 2003).

Além da infecção viral, outra possibilidade de desenvolvimento de autoimunidade em pacientes infectados com VHC se dá quando eles são submetidos à terapia com interferon, combinada ou não com ribavirina. Esta possui um efeito imunomodulador, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TAM *et al.*, 1999; FANG *et al.*, 2001). Já os interferons do tipo I, onde se inclui o interferon-alfa, medeiam a resposta imune inata imediata às infecções virais, interferindo na transcrição do material genético e replicação virais, reforçando a eficiência da destruição por linfócitos T citotóxicos das células infectadas e estimulando a resposta Th1. Porém, a ação do interferon utilizado em tratamentos não possui um efeito direcionado a um órgão-alvo e sim, sistêmico, podendo levar ao início ou ao aumento da produção de anticorpos autoreativos em pacientes que tinham uma capacidade

latente de fazê-lo ou que o faziam em pequena escala. Soma-se a isso o fato de haver, nesse processo, uma maior liberação de antígenos intracelulares próprios do hospedeiro e virais (BAKER, 2003; SVIRTLIH *et al.*, 2005).

A produção de autoanticorpos pelos pacientes estudados na segunda amostra, coletada na 24ª semana de tratamento, mostra a seguinte distribuição: 24 NOSA reagentes e 10 não reagentes. Comparando esses dados com os obtidos na primeira amostra, coletada no início do tratamento (23 NOSA reagentes e 11 não reagentes), observa-se que não houve um aumento significativo da produção de autoanticorpos durante a terapia. Além disso, o percentual de positividade encontrado durante a terapia foi igual ao obtido no grupo controle. Por isso, não foi possível relacionar a presença de NOSA com a terapia com interferon-alfa e ribavirina na população estudada. Essa hipótese, entretanto, não deve ser descartada, pois os estudos realizados até o momento, apesar de não conseguirem comprovar a relação entre a produção de autoanticorpos e a resposta ao tratamento, sempre sugerem a realização de pesquisas com amostras mais significativas, inclusive com a adoção de estudos multicêntricos (MURATORI *et al.*, 2003; STROFFOLINI *et al.*, 2004; WASMUTH *et al.*, 2004; MURATORI *et al.*, 2005). Apenas Muratori e colaboradores (2005), relataram que o único fator preditivo negativo para os pacientes NOSA reagentes é ser portador do VHC de genótipo 1. Também há uma preocupação com os pacientes que apresentam LKM-1 reagente, pois esse autoanticorpo aumenta a atividade das transaminases durante a terapia com interferon e algumas evidências sugerem que eles estão mais predispostos a desenvolver uma doença autoimune da tireóide durante o tratamento (CASSANI *et al.*, 1997; GREGORIO *et al.*, 1998; BOGDANOS e MCFARLANE, 2003). Nenhum dos pacientes ou controles envolvidos na pesquisa apresentou o anticorpo LKM-1, não sendo possível avaliar seu papel na infecção ou na resposta ao tratamento.

Um ponto que merece ser mencionado diz respeito aos padrões de FAN encontrados antes e durante o tratamento. Antes da terapia, sete pacientes apresentaram FAN reagente e durante, dez. Houve mudança no padrão de fluorescência em dois pacientes, o que, por si só, é indicativo de desordem autoimune. Ademais, foram detectados padrões citoplasmáticos em três pacientes, o que ocorreu somente durante o tratamento. Os autoanticorpos SMA e AMA mostram padrões citoplasmáticos de FAN, que, em baixos títulos, têm sua identificação bastante prejudicada, sendo facilmente confundidos com artefatos ou com outros padrões citoplasmáticos, como os encontrados nos pacientes.

Quanto à resposta ao tratamento, pôde-se observar que nove pacientes mostraram uma resposta virológica sustentada (RVS), não sendo possível detectar o RNA viral no sangue periférico seis meses após o término da terapia (teste qualitativo negativo); treze pacientes

foram recidivantes (REC), tendo o teste qualitativo positivo seis meses após a terapia; e oito foram não respondedores (NR), já que apresentaram teste qualitativo positivo logo ao final do tratamento. Em relação à produção de autoanticorpos, não houve associação significativa entre a resposta ao tratamento e a presença ou não de NOSA antes da terapia. Contudo, essa relação foi identificada quando levada em conta a produção de NOSA durante o tratamento (24ª semana). É importante observar que dos nove pacientes que obtiveram RVS, cinco (55,6%) não apresentaram autoanticorpos reagentes em nenhum momento da pesquisa, três apresentaram NOSA no início do tratamento, porém, permaneceram com o título inalterado ou apresentaram redução do título de autoanticorpos e apenas um apresentou aumento do título de autoanticorpos. O único autoanticorpo que esteve associado ao tipo de resposta apresentado pelo paciente ao final do tratamento e durante o seguimento foi o FAN: 38,1% dos pacientes que foram recidivantes ou não respondedores apresentaram FAN reagente, enquanto que todos os pacientes que obtiveram resposta virológica sustentada foram não reagentes para FAN. Os achados de Wasmuth e colaboradores (2004) mostraram associação semelhante, porém com o anticorpo SMA.

Dos 11 pacientes NOSA não reagente no início do tratamento, apenas um passou a apresentar autoanticorpos e foi REC, os outros dez permaneceram não reagentes para NOSA, tendo cinco obtido RVS, um REC e três sido NR. Muratori e colaboradores (2005) realizaram um estudo envolvendo 143 pacientes e observaram que 118 eram NOSA não reagentes no início do tratamento, dos quais 12 passaram a apresentar autoanticorpos (seis RVS, dois REC e quatro NR) e os outros 106 permaneceram não reagentes durante a terapia (sessenta RVS, onze REC e trinta e cinco NR). Apesar de existir uma diferença expressiva entre o número de pacientes estudados nas duas pesquisas, as proporções encontradas guardam semelhanças quanto ao tipo de resposta ao tratamento, especialmente, no grupo de indivíduos que não apresentaram autoanticorpos em nenhum dos momentos avaliados.

Ainda avaliando as duas pesquisas, a nossa encontrou 23 pacientes NOSA reagentes antes do início do tratamento, dos quais 9 permaneceram com título inalterado durante o tratamento (dois RVS, um REC, três NR, dois tratamentos suspensos e um abandono), 8 apresentaram aumento de título (um RVS, seis REC e um NR) e 6 apresentaram redução do título (um RVS, quatro REC e um NR). No estudo de Muratori e colaboradores. (2005), 25 pacientes foram NOSA reagentes antes do início do tratamento, sendo que 19 mantiveram os títulos constantes (nove RVS, quatro REC e seis NR), 4 apresentaram aumento de título (dois RVS e dois NR) e 2 apresentaram redução do título (um RVS e um REC). Comparando pacientes NOSA reagentes antes do tratamento e suas respostas à terapia, levando em consideração as variações de títulos dos autoanticorpos, constata-se uma diferença entre os

percentuais de indivíduos que mostraram aumento do título de NOSA durante a terapia [34,78% neste estudo e 16% no estudo de Muratori e cols. (2005)]. Do mesmo modo, os percentuais de pacientes que permaneceram com os títulos de autoanticorpos inalterados [39,13% neste estudo e 76% no de Muratori e cols. (2005)] e os que apresentaram redução de título [26,09% neste estudo e 8% no de Muratori e cols. (2005)] foram discrepantes. Isso demonstra que não é verificado um padrão de resposta associado à variação de títulos de autoanticorpos durante o tratamento, impossibilitando o uso da pesquisa de NOSA como fator preditivo para a resposta à terapia combinada de interferon-alfa e ribavirina em pacientes com hepatite C crônica. Além disso, também não foi possível traçar um perfil dos autoanticorpos produzidos por esses pacientes antes ou durante a terapia, embora a presença desses autoanticorpos sugira que eles possuem uma participação na fisiopatologia da doença. Todavia, a quantidade de casos avaliados em ambos os trabalhos é bastante reduzida, sendo necessária a realização de estudos com um número maior de pacientes antes da generalização das observações feitas até o presente momento, tendo em vista que as condutas diante da terapia devem ser adotadas com cautela.

6. CONCLUSÕES

- Foram detectados os autoanticorpos não-órgão específicos FAN, SMA e AMA em pacientes infectados pelo VHC, antes e durante a terapia combinada de interferon-alfa e ribavirina.
- Não houve relação entre sexo, idade, genótipo viral e níveis de transaminases com a produção de NOSA antes ou durante o tratamento.
- Na amostra estudada, não foi possível verificar se a infecção pelo VHC induz a produção de NOSA.
- A presença de NOSA antes do tratamento não foi associada ao tipo de resposta apresentada pelo paciente ao longo do seguimento.
- A detecção de autoanticorpos durante o tratamento teve associação significativa com relação ao tipo de resposta apresentada pelo paciente durante o seguimento: a ausência de NOSA indica uma tendência à resposta virológica sustentada, ao passo que a presença de NOSA indica uma tendência à recidiva ou à não-resposta ao tratamento.
- O FAN foi o autoanticorpo que, isoladamente, apresentou relação com a resposta ao tratamento, visto que todos os pacientes que apresentaram uma resposta virológica sustentada tinham FAN não reagente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMI OM, ATTAR B, JENSEN D, GHAOUI R, COTLER SJ. Serological markers of autoimmunity in patients infected with hepatitis C virus: impact of HIV co-infection. **HIV Med.** V. 6(6), p. 371-4, 2005.

AGUILERA V, BERENGUER M. Hepatitis C and fibrosis. **Rev Esp Enferm Dig.** V. 96(6), p. 402-14, 2004.

ALBERT LJ, INMAN RD. Molecular mimicry and autoimmunity. **N Engl J Med.** V. 341(27), p. 2068-74, 1999.

ALBUQUERQUE AC, COELHO MR, LOPES EP, LEMOS MF, MOREIRA RC. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients from one center in Recife, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V. 100(5), p. 467-70, 2005.

ARNDT PA, LEGER RM, GARRATTY G. Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. **Transfusion.** V. 39(11-12), p. 1239-46, 1999.

AUSTRUP F, VESTWEBER D, BORGES E, LOHNING M, BRAUER R, HERZ U, RENZ H, HALLMANN R, SCHEFFOLD A, RADBRUCH A, HAMANN A. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. **Nature.** V. 385(6611), p. 81-3, 1997.

BAKER DE. Pegylated interferon plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C. **Rev Gastroenterol Disord.** V. 3(2), p. 93-109, 2003.

BATALLAN A, FAUCHER P, PONCELET C, DEMARIA F, BENIFLA JL, MADELENAT P. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: recent news about the benefit of caesarean sections. **Gynecol Obstet Fertil.** V. 31(11), p. 964-8, 2003.

BEHAR SM, PORCELLI SA. Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens. **Arthritis Rheum.** V. 38(4), p. 458-76, 1995.

BELEC L, LEGOFF J, SI-MOHAMED A, BLOCH F, MATTA M, MBOPI-KEOU FX, PAYAN C. Cell-associated, non-replicating strand(+) hepatitis C virus-RNA shedding in cervicovaginal secretions from chronically HCV-infected women. **J Clin Virol.** V. 27(3), p. 247-51, 2003.

BEZERRA CS. **Estudo molecular do Vírus da Hepatite C isolado de pacientes atendidos em hospital de referência em Fortaleza, Ceará.** 2006. 134f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BOGDANOS DP, LENZI M, OKAMOTO M, RIGOPOULOU EI, MURATORI P, MA Y, MURATORI L, TSANTOULAS D, MIELI- VERGANI G, BIANCHI FB, VERGANI D. Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51. **Int J Immunopathol Pharmacol.** V. 17(1), p. 83-92, 2004.

BOGDANOS DP, MCFARLANE IG. Cytochrome P450 2A6 meets P450 2D6: an enigma of viral infections and autoimmunity. **J Hepatol.** V. 39(5), p. 860-3, 2003.

BOGDANOS DP, MURATORI L, BIANCHI FB, VERGANI D. Hepatitis C virus and autoimmunity. **Hepatology.** V. 31(6), p. 1380, 2000.

BOST-BRU C. The pediatrician and hepatitis C virus. **Arch Pediatr.** V. 6(10), p. 1122-5, 1999.

BOURINBAIAR AS, ABULAFIA-LAPID R. Autoimmunity, alloimmunization and immunotherapy of AIDS. **Autoimmun Rev.** V. 4(6), p. 403-9, 2005.

BRANDAO AB, FUCHS SC. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study. **BMC Gastroenterol.** V. 2(1), p. 18, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Programa Nacional de hepatites Virais. **Hepatites Virais: o Brasil está atento.** Brasília, Ministério da Saúde, 2003.

BRECHOT C. Biology of hepatitis C viruses: clinical implications. **Rev Med Interne.** V. 18(11), p. 893-905, 1997.

BUSEK S, OLIVEIRA G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genet Mol Res.** V. 2(1), p. 117-23, 2003.

BUTI M, MENDEZ C, SCHAPER M, SAULEDA S, VALDES A, RODRIGUEZ-FRIAS F, JARDI R, ESTEBAN R. Hepatitis C virus Core Antigen as a predictor of non-response in genotype 1 chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirin. **J Hepatol.** V. 40(3), p. 527-32, 2004.

CALLEJA JL, ALBILLOS A, CACHO G, IBORRA J, ABREU L, ESCARTIN P. Interferon and prednisone therapy in chronic hepatitis C with non-organ-specific antibodies. **J Hepatol**. V. 24(3), p. 308-12, 1996.

CAMPIOTTO S, PINHO JR, CARRILHO FJ, DA SILVA LC, SOUTO FJ, SPINELLI V, PEREIRA LM, COELHO HS, SILVA AO, FONSECA JC, ROSA H, LACET CM, BERNARDINI AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**. V. 39(3), p. 41-9, 2006.

CASSANI F, CATALETA M, VALENTINI P, MURATORI P, GIOSTRA F, FRANCESCONI R, MURATORI L, LENZI M, BIANCHI G, ZAULI D, BIANCHI FB. Serum autoantibodies in chronic hepatitis C: comparison with autoimmune hepatitis and impact on the disease profile. **Hepatology**. V. 26(3), p. 561-6, 1997.

CHARMAN LG. Genetic diversity of hepatitis C virus: implications for pathogenesis, treatment and prevention. **Lancet**. V. 345(1), p. 562-6, 1995.

CHOO QL, PINHO, JRR *in* FOCACCIA R. Grupo de Hepatites Virais do Instituto Emílio Ribas. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.

CHOO QL, KUO G, WEINER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. V. 244(1), p. 359-62, 1989.

CHOO QL, RICHMAN KH, HAN JH, BERGER K, LEE C, DONG C. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci**. V. 88(6), p. 2451-5, 1991.

COELHO SN, SALEEM S, KONIECZNY BT, PAREKH KR, BADDOURA FK, LAKKIS FG. Immunologic determinants of susceptibility to experimental glomerulonephritis: role of cellular immunity. **Kidney Int**. V. 51(3), p. 646-52, 1997.

DAVIDSON A, DIAMOND B. Autoimmune diseases. **N Engl J Med**. V. 345(5), p. 340-50, 2001.

DE LIBERO G, MORAN AP, GOBER HJ, ROSSY E, SHAMSHIEV A, CHELNOKOVA O, MAZORRA Z, VENDETTI S, SACCHI A, PRENDERGAST MM, SANSANO S, TONEVITSKY A, LANDMANN R, MORI L. Bacterial infections promote T cell recognition of self-glycolipids. **Immunity**. V. 22(6), p. 763-72, 2005.

DELLAVANCE A, GABIREL JR A, CINTRA AFU, XIMENRS AC, NUCCITELLI B, TALIBERTI BH, MOREIRA C, MUHLEN CA, BICHARA CD, SANTOS CHR, YANO CM, MANGUEIRA CLP, CARVALHO DG, BONFÁ ESDO, DOI EM, GUIMARÃES FNC, ARAÚJO FI, MUNDIM HM, REGO J, VIEIRA LEA, POLI L, ANDRADE LEC, CALLADO MR, MESQUITA MM, SUGIYAMA M, SLHESARENKO N, SILVA NA, CARBALLO OG, LESER PG, FRANCESCANTONIO PLC, JARACH R, XAVIER RM, LEVY RA, NEVES SPF, CRUVINEL WM, SANTOS WS. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células Hep-2. **Rev Bras Reumatol**. V. 43(1), p. 129-40, 2003.

DIAGO M, ZAPATER R, TUSET C, CARBONELL P, GONZALEZ C, CORS R, CASAS E. Intrafamily transmission of hepatitis C virus: sexual and non-sexual contacts. **J Hepatol**. V. 25(2), p. 125-8, 1996.

DUMOULIN FL, LEIFELD L, SAUERBRUCH T, SPENGLER U. Autoimmunity induced by interferon-alpha therapy for chronic viral hepatitis. **Biomed Pharmacother**. V. 53(5-6), p. 242-54, 1999.

ENCINAS JA, KUCHROO VK. Mapping and identification of autoimmunity genes. **Curr Opin Immunol**. V. 12(6), p. 691-7, 2000.

FANG SH, HWANG LH, CHEN DS, CHIANG BL. Ribavirin enhancement of hepatitis C virus core antigen-specific type 1 T helper cell response correlates with the increased IL-12 level. **J Hepatol**. V. 33(5), p. 791-8, 2000.

FANG SH, LAI MY, HWANG LH, YANG PM, CHEN PJ, CHIANG BL, CHEN DS. Ribavirin enhances interferon-gamma levels in patients with chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. **J Biomed Sci**. V. 8(6), p. 484-91, 2001.

FERRARI JO, FERREIRA MU, TANAKA A, MIZOKAMI M. The seroprevalence of hepatitis B and C in an Amerindian population in the southwestern Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 32(3), p. 299-302, 1999.

FLODSTROM-TULLBERG M. Viral infections: their elusive role in regulating susceptibility to autoimmune disease. **Microbes Infect**. V. 5(10), p. 911-21, 2003.

FLOREANI A, CHIARAMONTE M, GREGGIO NA, FABRIS P, DE LAZZARI F, NACCARATO R, BETTERLE C. Organ-specific autoimmunity and genetic predisposition in interferon-treated HCV-related chronic hepatitis patients. **Ital J Gastroenterol Hepatol**. V. 30(1), p. 71-6, 1998.

FUKUDA Y, NAKANO I *in* FOCACCIA R, Grupo de Hepatites Virais do Instituto Emília Ribas. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.

GARSON, J.A.; RING, C.; TUKE, P.; TEDDER, R.S. Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet**. V. 336(8719), p. 878-9, 1990.

GATSELIS NK, GEORGIADOU SP, TASSOPOULOS N, ZACHOU K, LIASKOS C, HATZAKIS A, DALEKOS GN. Impact of parietal cell autoantibodies and non-organ-specific autoantibodies on the treatment outcome of patients with hepatitis C virus infection: a pilot study. **World J Gastroenterol**. V. 11(4), p. 482-7, 2005.

GAZE R, MAUL DE CARVALHO D, RANGEL-TURA LF. Information from teachers on viral hepatitis transmission and prevention in Brazil. **Salud Publica Mex**. V. 45(4), p. 245-51, 2003.

GONCALES NS, COSTA FF, VASSALLO J, GONCALES FL JR. Diagnosis of hepatitis C virus in Brazilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: comparison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. V. 42(5), p. 263-7, 2000.

GREGORIO GV, CHOUDHURI K, MA Y, PENSATI P, IORIO R, GRANT P, GARSON J, BOGDANOS DP, VEGNENTE A, MIELI-VERGANI G, VERGANI D. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. **Clin Exp Immunol**. V. 133(3), p. 404-13, 2003.

GREGORIO GV, PENSATI P, IORIO R, VEGNENTE A, MIELI-VERGANI G, VERGANI D. Autoantibody prevalence in children with liver disease due to chronic hepatitis C virus (HCV) infection. **Clin Exp Immunol**. V. 112(3), p. 471-6, 1998.

GRETCH DR. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. **Clin Liver Dis**. V. 1(3), p. 543-57, 1997.

GROSS JB. Hepatitis C: a sexually transmitted disease? **Am J Gastroenterol**. V. 96(11), p. 3051-3, 2001.

HAZARI S, ACHARYA SK, PANDA SK. Development and evaluation of a quantitative competitive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for hepatitis C virus RNA in serum using transcribed thio-RNA as internal control. **J Virol Methods**. V. 116(1), p. 45-54, 2004.

HELLARD M, AITKEN C, MACKINTOSH A, RIDGE A, BOWDEN S. Investigation of infection control practices and knowledge of hepatitis C among body-piercing practitioners. **Am J Infect Control**. V. 31(4), p. 215-20, 2003.

JACOBSON DL, GANGE SJ, ROSE NR, GRAHAM NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clin Immunol Immunopathol**. V. 84(3), p. 223-43, 1997.

KAITO M, ISHIDA S, TANAKA H, HORIIKE S, FUJITA N, ADACHI Y, KOHARA M, KONISHI M, WATANABE S. Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. **Med Mol Morphol**. V. 39(2), p. 63-71, 2006.

KAITO M, WATANABE S, TSUKIYAMA-KOHARA K, YAMAGUCHI K, KOBAYASHI Y, KONISHI M. Hepatitis C virus particle detected immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol**. V. 75(1), p. 1755-60, 1994.

KATO N, HIJIKATA M, OOTSUYAMA Y, NAKAGAWA M, OHKOSHI S, SIGIMURA T, SHIMOTOHNO K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc Natl Acad Sci**. V. 87(1), p. 9524-8, 1990.

KERKAR N, CHOUDHURI K, MA Y, MAHMOUD A, BOGDANOS DP, MURATORI L, BIANCHI F, WILLIAMS R, MIELI-VERGANI G, VERGANI D. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. **J Immunol**. V. 170(3), p. 1481-9, 2003.

KIFFER CRV, VIANA GB, CHEINQUER H *in* FOCACCIA R, Grupo de Hepatites Virais do Instituto Emília Ribas. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.

KIM WR. The burden of hepatitis C in the United States. **Hepatology**. V. 36(5 Suppl 1), p. S30-4, 2002.

KOHARA M. Hepatitis C virus replication and pathogenesis. **J Dermatol Sci**. V. 22(3), p. 161-8, 2000.

KUO G, CHOO QL, ALTER HJ, GITNICK GL, REDEKER AG, PURCELL RH, MIYAMURA T, DIENSTAG JL, ALTER MJ, STEVENS CE. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**. V. 244(4902), p. 362-4, 1989.

LAUER GM, WALKER BD. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**. V. 345(1), p. 41-52, 2001.

LIANG B, MAMULA MJ. Molecular mimicry and the role of B lymphocytes in the processing of autoantigens. **Cell Mol Life Sci**. V. 57(4), p. 561-8, 2000.

LYRA LGC. HEPATITE C: O desafio de um vírus. **Condutas Terapêuticas em Gastro**. 3ª edição. AstraZeneca, 2003.

MANCINI C, PISANI G, AZZI A, LUISA ZERBINI M, GENTILI G, MARIO BISSO G. Inter-laboratory comparison of qualitative and quantitative detection of hepatitis C (HCV) virus RNA in diagnostic virology: a multicentre study (MS) in Italy. **J Clin Virol**. V. 30(4), p. 313-9, 2004.

MANNS MP, RAMBUSCH EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. **J Hepatol**. V. 31(Suppl 1), p. 39-42, 1999.

MATTHEWS-GREER JM, CALDITO GC, ADLEY SD, WILLIS R, MIRE AC, JAMISON RM, MCRAE KL, KING JW, CHANG WL. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without human immunodeficiency virus. **Clin Diagn Lab Immunol**. V. 8(4), p. 690-4, 2001.

MCALLISTER J, CASINO C, DAVIDSON F, POWER J, LAWLOR E, YAP PL. Long term evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus in a commonsource infected cohort. **J Virol**. V. 72(6), p. 4893-4905, 1998.

MCFARLANE IG. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. **Biomed Pharmacother**. V. 53(5-6), p. 255-63, 1999.

MENDES-CORREA MC, BARONE AA, GUASTINI C. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. V. 43(1), p. 15-9, 2001.

MESCHINI A, LUCCHETTA MC, FONTANA M, NOCCHI S, PACE A, GRASSI M. Recent trends in the therapy of hepatitis C. **Clin Ter**. V. 154(3), p. 181-91, 2003.

MESEGUER M, GARRIDO N, GIMENO C, REMOHI J, SIMON C, PELLICER A. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm. **Fertil Steril**. V. 78(6), p. 1199-202, 2002.

MILLER JF, HEATH WR, ALLISON J, MORAHAN G, HOFFMANN M, KURTS C, KOSAKA H. T cell tolerance and autoimmunity. **Ciba Found Symp**. V. 204(1), p. 159-68, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria N° 863**, de 4 de Novembro de 2002 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas -Hepatite Viral Crônica C, 2002.

MOTTA-CASTRO ARC, YOSHIDA CFT, LEMOS ERS, OLIVEIRA JM, CUNHA RV, LEWIS-XIMENEZ LL, CABELLO PH, LIMA KMB, MARTINS RMB. Seroprevalence of Hepatitis B Virus Infection among an Afrodescendant Community in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, V. 98(1), p. 13-17, 2003.

MUNOZ ESPINOSA LE. Diagnosis of hepatitis C virus infection. **Rev Gastroenterol Mex**. V. 67(Suppl 2), p. S29-35, 2002.

MURATORI P, MURATORI L, GUIDI M, GRANITO A, SUSCA M, LENZI M, BIANCHI FB. Clinical impact of non-organ-specific autoantibodies on the response to combined antiviral treatment in patients with hepatitis C. **Clin Infect Dis**. V. 40(4), p. 501-7, 2005.

MURATORI P, MURATORI L, VERUCCHI G, ATTARD L, BIANCHI FB, LENZI M. Non-organ-specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C: clinical significance and impact on interferon treatment. **Clin Infect Dis**. V. 37(10), p. 1320-6, 2003.

NICHOLSON S, LESLIE DE, EFANDIS T, FAIRLEY CK, GUST ID. Hepatitis C antibody testing: problems associated with non-specific binding. **J Virol Methods**. V. 33(3), p. 311-7, 1991.

OKAMOTO H, OKADA S, SUGIYAMA Y, TANAKA T, SUGAI Y, AKAHANE Y. Detection of hepatitis C virus RNA by a two stage polymerase chain reaction with two pair of primers deduced from the 5'- noncoding region. **Jpn J Exp Med**. V. 60(4), p. 215-22, 1990.

OLIVERE JW, MEIER PA, FRASER SL, MORRISON WB, PARSONS TW, DREHNER DM. Coccidioidomycosis--the airborne assault continues: an unusual presentation with a review of the history, epidemiology, and military relevance. **Aviat Space Environ Med**. V. 70(8), p. 790-6, 1999.

PALEKAR NA, HARRISON SA. Extrahepatic manifestations of hepatitis C. **South Med J**. V. 98(10), p. 1019-23, 2005.

PALTANIN LF, REICHE EM. Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. **Rev Saude Publica**. V. 36(4), p. 393-9, 2002.

PARANA R, VITVITSKI L, BERBY F, PORTUGAL M, COTRIM HP, CAVALCANTE A, LYRA L, TREPO C. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arq Gastroenterol**. V. 37(4), p. 213-6, 2000.

PAULA VS, ARRUDA ME, VITRAL CL, GASPAR AMC. Seroprevalence of viral hepatitis in Riverine Communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. V. 96(8), p. 1123-8, 2001.

PAWLOTSKY JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology**. V. 36(5 Suppl 1), p. S65-73, 2002.

PITKANEN J, VAHAMURTO P, KROHN K, PETERSON P. Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. **J Biol Chem**. V. 276(22), p. 19597-602, 2001.

PRINCE AM, BROTMAN B, GRADY GF, KUHN WJ, HAZZI C, LEVINE RW, MILLIAN SJ. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. **Lancet**. V. 2(7875), p. 241-6, 1974.

REDDY AK, DAKSHINAMURTY KV, LAKSHMI V. Utility of HCV core antigen ELISA in the screening for hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis. **Indian J Med Microbiol**. V. 24(1), p. 55-7, 2006.

- ROINGEARD P, HOURIOUX C, BLANCHARD E, BRAND D, AIT-GOUGHOLTE M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. **Biol Cell**. V. 96(2), p. 103-8, 2004.
- ROSEN HR, GRETCH DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Mol Med Today**. V. 5(1), p. 393-9, 1999.
- ROSINI N, MOUSSE D, SPADA C, TREITINGER A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and Anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. **Braz J Infect Dis**. V 7(4), p. 262-7, 2003.
- SALVETTI M, RISTORI G, BOMPRESZI R, POZZILLI P, LESLIE RD. Twins: mirrors of the immune system. **Immunol Today**. V. 21(7), p. 342-7, 2000.
- SEPÚLVEDA C *in* FOCACCIA R. Grupo de Hepatites Virais do Instituto Emília Ribas. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003.
- SHEPARD CW, FINELLI L, ALTER MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**. V. 5(9), p. 558-67, 2005.
- SHUKLA DD, HOYNE PA, WARD CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Arch Virol**. V. 140(10), p. 1747-61, 1995.
- SHUSTOV AV, KOCHNEVA GV, SIVOLOBOVA GF, GRAZHDANTSEVA AA, GAVRILOVA IV, AKINFEEVA LA, RAKOVA IG, ALESHINA MV, BUKIN VN, ORLOVSKY VG, BESPALOV VS, ROBERTSON BH, NETESOV SV. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Western Siberia. **J Med Virol**. V. 77(3), p. 382-9, 2005.
- SILVERSTEIN AM, ROSE NR. There is only one immune system! The view from immunopathology. **Semin Immunol**. V. 12(1), p. 173-8, 2000.
- SIMMONDS P, ALBERTI A, ALTER HJ. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**. V. 19(1), p. 1321-4, 1994.
- SOUTO FJD. Prevalência e fatores associados a marcadores do vírus da hepatite B em população rural do Brasil central. **Pan Am Public Health**. V. 10(6), p. 91, 2001.
- STICHT-GROH V, BRETZEL G. Leprosy--current aspects of a disease from biblical times. **Immun Infekt**. V. 23(6), p. 216-21, 1995.

STRASSBURG CP, VOGEL A, MANNS MP. Autoimmunity and hepatitis C. **Autoimmun Rev.** V. 2(6), p. 322-31, 2003.

STRAUSS E. Hepatitis C. **Rev Soc Bras Med Trop.** V. 34(1), p. 69-82, 2001.

STROFFOLINI T, COLLOREDO G, GAETA GB, SONZOGNI A, ANGELETTI S, MARIGNANI M, PASQUALE G, VENEZIA G, CRAXI A, ALMASIO P. Does an 'autoimmune' profile affect the clinical profile of chronic hepatitis C? An Italian multicentre survey. **J Viral Hepat.** V. 11(3), p. 257-62, 2004.

STROFFOLINI T, LORENZONI U, MENNITI-IPPOLITO F, INFANTOLINO D, CHIARAMONTE M. Hepatitis C virus infection in spouses: sexual transmission or common exposure to the same risk factors? **Am J Gastroenterol.** V. 96(11), p. 3138-41, 2001.

SVIRTLIH N, SIMOVIC-BABIC J, KRSTIC M, DELIC D. Current treatment of chronic hepatitis C. **Srp Arh Celok Lek.** V. 133(3-4), p. 202-7, 2005.

TAKAMIZAWA A, MORI C, FUKU I, MANABE S, MURAKAMI S, FUJITA J, ONISHI E, ANDOH T, YOSHIDA I, OKAYAMA H. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. **J Virol.** V. 65(3), p. 1105-13, 1991.

TAM RC, PAI B, BARD J, LIM C, AVERETT DR, PHAN UT, MILOVANOVIC T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile. **J Hepatol.** V. 30(3), p. 376-82, 1999.

TARGOFF IN. Update on myositis-specific and myositis-associated autoantibodies. **Curr Opin Rheumatol.** V. 12(6), p. 475-81, 2000.

VALENTE VB, COVAS DT, PASSOS AD. Hepatitis B and C serologic markers in blood donors of the Ribeirao Preto Blood Center. **Rev Soc Bras Med Trop.** V. 38(6), p. 488-92, 2005.

VASSILOPOULOS D, CALABRESE LH. Extrahepatic immunological complications of hepatitis C virus infection. **AIDS.** V. 19(Suppl 3), p. S123-7, 2005.

VERGANI D, ALVAREZ F, BIANCHI FB, CANCELO ELR, MACKAY IR, MANNS MP, NISHIOKA M, PENNER E. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. **J Hepatol.** V. 41(4), p. 677-83, 2004.

VON HERRATH MG, OLDSTONE MB. Virus-induced autoimmune disease. **Curr Opin Immunol**. V. 8(6), p. 878-85, 1996.

WANG ZQ, HOROWITZ HW, ORLIKOWSKY T, DUDHANE A, WEINSTEIN A, HOFFMANN MK. Lymphocyte-reactive autoantibodies in human immunodeficiency virus type 1-infected persons facilitate the deletion of CD8 T cells by macrophages. **J Infect Dis**. V. 178(2), p. 404-12, 1998.

WASMUTH HE, STOLTE C, GEIER A, DIETRICH CG, GARTUNG C, LORENZEN J, MATERN S, LAMMERT F. The presence of non-organ-specific autoantibodies is associated with a negative response to combination therapy with interferon and ribavirin for chronic hepatitis C. **BMC Infect Dis**. V. 4:4, 2004. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/4/4>>. Acesso em: 07 out 2006.

WEJSTAL R. Sexual transmission of hepatitis C virus. **J Hepatol**. V. 31(Suppl 1), p. 92-5, 1999.

ZANDMAN-GODDARD G, SHOENFELD Y. HIV and autoimmunity. **Autoimmun Rev**. V. 1(6), p. 329-37, 2002.

ZARIFE MA, SILVA LK, SILVA MB, LOPES GB, BARRETO ML, TEIXEIRA MDA G, DOURADO I, REIS MG. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. V. 100(7), p. 663-8, 2006.

ZHAO ZS, GRANUCCI F, YEH L, SCHAFFER PA, CANTOR H. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. **Science**. V. 279(5355), p. 1344-7, 1998.

ZUSINAITE E, METSKULA K, SALUPERE R. Autoantibodies and hepatitis C virus genotypes in chronic hepatitis C patients in Estonia. **World J Gastroenterol**. V. 11(4), p. 488-91, 2005.

ANEXOS

ANEXO I

Identificador: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar do estudo: “Perfil de autoanticorpos em pacientes com hepatite C e a influência do tratamento com interferon-alfa e ribavirina”. Nesse estudo, os pesquisadores pretendem determinar a frequência de autoanticorpos associados à infecção pelos vírus C, que causam hepatite, e sua repercussão no curso da doença nos pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatologia do HUWC. Para isso, será necessária consulta às informações sobre o paciente e evolução da doença em prontuário e com o médico responsável e coleta de 10mL de sangue. Você poderá sentir o desconforto da picada da agulha no seu antebraço no momento da coleta.

A sua participação nesse estudo não lhe acarretará nenhum benefício no tratamento e apenas no final do estudo poderemos concluir se há uma relação entre a produção de autoanticorpos e a evolução da doença. As amostras obtidas serão estocadas no Núcleo de Estudos Avançados em Microbiologia Médica e poderão ser utilizadas em estudos futuros. Caso decida participar, você não receberá nenhum tipo de pagamento, mas também não terá nenhuma despesa com a pesquisa. Você poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento sem prejuízo ao seu atendimento, cuidado e tratamento.

Os resultados obtidos durante a pesquisa serão mantidos em sigilo e os pesquisadores não identificarão o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos. Você poderá ser informado dos resultados da pesquisa, para isso, entre em contato com os investigadores: Janaina Leitão Vilar e Dra. Lília Maria Carneiro Câmara no Núcleo de Estudos Avançados em Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fones: 3288-8303 (Secretaria), 3241-0059 (Janaina) e 3268-2085 (Dra. Lília).

Você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC (fone: 3288-8346) se quiser esclarecer alguma dúvida sobre a ética da pesquisa ou apresentar recursos ou reclamações em relação a esse estudo.

Declaração

Eu, _____, aceito participar do estudo: “Perfil de autoanticorpos em portadores de hepatite C” e declaro que fui adequadamente informado sobre a pesquisa.

Fortaleza, ____ / ____ / ____.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha (se menor ou analfabeto)

Assinatura do pesquisador

Assinatura do pesquisador

ANEXO II

**FICHA PARA ENTREVISTA DE PACIENTES DO ESTUDO:
“PERFIL DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM HEPATITE C E A INFLUÊNCIA DO
TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA”.**

Identificador: _____

Data: ____ / ____ / ____

I. Identificação

1. Nome: _____ 2. Idade: _____
 3. Prontuário: _____ 4. Unid. de atendimento: (HC-UFC), Outra: _____
 5. Sexo: (Masc.), (Fem.) 6. Estado Civil: (Solt.), (Cas.), (Div.), (Viúvo), (Menor), (Ignor.)
 7. Endereço: _____ 8. Bairro: _____
 9. Fone: _____ 10. Profissão: _____ 11. Procedência: _____

II. Manifestações Clínicas

12. Assintomático ()
 13. Sintomático () 14. Tempo de doença em relação ao atendimento: _____

15. Icterícia	()	16. Colúria	()	17. Acolia	()	18. Febre	()
19. Adinamia	()	20. Anorexia	()	21. Mialgia	()	22. Artralgia	()
23. Dor abdominal	()	24. Tremores	()	25. Sonolência	()	26. Hepatomegalia	()
27. Esplenomegalia	()	28. Ascite	()	29. Equimoses	()	30. Eritema palmar	()
31. Edema de MMII	()	32. Ginecomastia	()	33. Melena	()	34. Aranha vascular	()
35. Coma	()	36. Fetor hepático	()	36. Tem biópsia? (Sim) (Não) Local: _____			

III. Dados Epidemiológicos

37. Tipo Sangüíneo: (A), (B), (AB), (O) 38. Fator Rh: (Positivo), (Negativo)
 39. Raça: (Branco), (Negro), (Índio), (Mestiço), (Oriental)
 40. Doador de sangue? (Não), (Sim), (Ignorado) 41. Data: ____/____/____
 42. Doou outras vezes? (Não), (Sim), (Ignorado) 43. Data: ____/____/____
 44. Transfusão sangüínea: () Data: ____/____/____ 45. N° de bolsas: ____
 Data: ____/____/____ N° de bolsas: ____
 46. Cirurgia: () Data: ____/____/____ Qual? _____ Data: ____/____/____ Qual? _____
 47. Solicitou exame do parceiro? (Sim), (Não), (Ignorado), (Não se aplica)
 48. Resultado do exame/parceiro:(Pos),(Neg),(Aguarda resultado),(Ignor),(Não se aplica)
 49. Caso seja reagente, assinale: AntiHCV: ____/____/____
 HbsAg: ____/____/____ AntiHBs: ____/____/____ AntiHBc IgG: ____/____/____ AntiHBc IgM: ____/____/____

IV. Dados Laboratoriais

50. Exames sorológicos: (+) reagente e (-) não reagente.

51. AntiHBc IgG	()	____/____/____	52. HbsAg	()	____/____/____
53. AntiHBc IgM	()	____/____/____	54. AntiHCV	()	____/____/____
55. AntiHAV IgM	()	____/____/____	56. AntiHBs	()	____/____/____
57. HIV	()	____/____/____	58. VDRL	()	____/____/____
59. Chagas	()	____/____/____	60. HTLV I/II	()	____/____/____

61. PCR qualitativo: genótipo _____

62. Exames laboratoriais:

Data	TGP	TGO	Btotal	Bdireta	TAP	Ptotais	Alb.	Glob.
__/__/__	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
__/__/__	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

V. Doenças relacionadas e Tratamento

63. Tem outra doença? () Quais? _____

64. Vem recebendo algum medicamento regularmente? () Quais? _____

65. Está sendo tratado para HCV? (Sim) (Não) 66. Início do Tratamento: __/__/__

67. Esquema de tratamento: (Iterferon), (Ribavirina), (Iterferon e Ribavirina), (Dno)

68. Dose e frequência: _____

69. Duração do tratamento: _____ meses 70. Tratamento interrompido? (Sim) (Não)

OBSERVAÇÕES:

ANEXO III

Detecção de autoanticorpos por imunofluorescência

Materiais

Preparo do substrato

- Rim, fígado e estômago de rato.
- Kit cirúrgico (tesouras, pinças e bisturis).
- Papel alumínio.
- Luvas de procedimento descartáveis.
- Tissue-Tek.
- Criostato.
- Lâminas para microscopia (borda fosca).
- Salina 0,9%.

Preparo de tampão PBS pH 7,2

- Cloreto de sódio (NaCl) PA 0,15M.
- Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) PA – 0,0072M.
- Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) PA – 0,0028M.
- Água Mili-Q.

Aplicação do teste sorológico

- Soros para teste.
- Soros controle.
- Tampão PBS pH 7,2.
- Pipeta automática.
- Depósito plástico.
- Algodão.
- Ponteira amarela.
- Anti-IgGAM e IgG humana FITC.
- Lamínula.
- Meio de montagem (9/1 glicerol/PBS).
- Azul de Evans.
- Berços de vidro para lavagem de lâminas.

Etapas do procedimento

Preparo do substrato

1. Cortar fígado em cubos de 3-4mm (orientação não importante).
2. Cortar rim sagitalmente e depois em cubos de 3-4mm, contendo pelo menos dois cálices renais do córtex.
3. Lavar cuidadosamente o estômago com salina e cortar em tiras longitudinais.

4. Preparar suporte com uma fina camada de tissue-tek e resfriá-la sem deixar endurecer.
5. Justapor os cubos de fígado e rim e a tira de estômago, formando um bloco homogêneo. Acrescentar mais tissue-tek em torno dos fragmentos.
6. Congelar em criostato a -22°C .
7. Desprezar os primeiros cortes do bloco (corte em grandes fatias) até que a superfície fique homogênea.
8. Cortar o bloco em secções de $3\ \mu\text{m}$ de espessura, sendo submetidas à montagem padrão.
9. Secar os cortes ao ar sem uso de fixadores.
10. Armazenar as lâminas em caixas histológicas à -20°C .

Preparo de tampão PBS pH 7,2

Sais	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl) PA 0,15M	8,77g
Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) PA – 0,0072M ⁽¹⁴²⁾	1,02g
Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) PA – 0,0028M ⁽¹²⁰⁾	0,34g
Água destilada qsp	1000mL

- Ajustar o pH para 7,2 utilizando HCl 1 N.

OBS: Os sais descritos acima, quando não utilizados na forma anidra, deverão ter suas quantidades recalculadas em função das moléculas de água presentes. Verificar sempre no rótulo dos produtos a composição dos sais e o peso molecular.

Aplicação do teste sorológico

1. Pipetar $70\ \mu\text{L}$ do soro diluído 1:20 em tampão PBS pH 7,2.
2. Cobrir os tecidos com soro e deixar em estufa à temperatura de 37°C por 30 minutos em câmara úmida.
3. Lavar 3 vezes abundantemente com PBS com agitação moderada, utilizando Homogeneizados de Bolsas em velocidade 2.
4. Cobrir os tecidos com anti-IgG ou IgGAM humana FITC e deixar à temperatura de ambiente por 30 minutos em câmara úmida.
5. Lavar 2 vezes abundantemente com PBS com agitação moderada, utilizando Homogeneizados de Bolsas em velocidade 2.
6. Lavar, em repouso, com solução de Azul de Evans e PBS (10 gotas para 100mL).
7. Fazer montagem lâmina-lamínula com meio de montagem (9/1 glicerol/PBS).
8. Examinar através de epifluorescência.

Diluição do soro e reagentes com fluoresceína:

- Soros testes: **1:20**
- Conjugado: Diluição em PBS ajustada a partir dos soros padrão.

Controles:

- Positivo e negativo obtidos da população local.

Reatividade em imunofluorescência

→ Objetiva de 10x

FAN:

- Coloração nuclear nos três tecidos (fazer IF em HEp-2).

Anti-SMA:

- Cora paredes das artérias nos três tecidos.
- Cora camada muscular do estômago.
- Cora eixo vascular da lâmina própria da mucosa gástrica.
- Padrões (observar rim):
 - V: cora veias.
 - G: cora glomérulo.
 - T: cora túbulos.
 - VGT – F-actin.

Anti-LKM-1:

- Cora brilhantemente o citoplasma das células hepáticas.
- Cora fortemente a porção P3 dos túbulos renais.
- Cora difusamente as células das glândulas gástricas.

AMA:

- Cora fracamente o citoplasma das células hepáticas.
- Cora fortemente todos os túbulos renais, especialmente, os menores e distais.
- Cora células parietais gástricas com padrão granular brilhante.

ANEXO IV

Andamento do projeto - CAAE - 0005.0.040.000-04						
Título do Projeto de Pesquisa						
PERFIL DE AUTOANTICORPOS EM PACIENTES COM HEPATITE C E A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA E RIBAVIRINA						
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP
Aprovado no CEP	03/02/2005 00:00:00	03/02/2005 00:00:00	03/02/2005 00:00:00	03/02/2005 00:00:00	03/02/2005 00:00:00	03/02/2005 00:00:00
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem		
3 - Protocolo Pendente no CEP	27/12/2004 15:31:15	Folha de Rosto	321/04	CEP		
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	07/12/2004 09:04:41	Folha de Rosto	0005.0.040.000-04	CEP		
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	03/12/2004 14:35:50	Folha de Rosto	FR-54766	Pesquisador		
4 - Protocolo Aprovado no CEP	03/02/2005 10:32:43	Folha de Rosto	321/04	CEP		

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](#)