



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



PATRICIA SEIXAS AUAD BRANDÃO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE
DA CITOCINA *TGFB1* E O ESTÁGIO DA FIBROSE NA
HEPATITE CRÔNICA C**

SALVADOR

2009

PATRICIA SEIXAS AUAD BRANDÃO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS
GENES DA CITOCINA *TGFB1* E O ESTÁGIO DA FIBROSE
NA HEPATITE CRÔNICA C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. André Castro Lyra
Co-Orientador(a): Profa. Dra. Denise C. Lemaire

SALVADOR

2009

B817

Brandão, Patrícia Seixas Auad

Estudo de associação de polimorfismos nos genes da citocina *tgfb* e o estágio da fibrose na hepatite crônica C. ./
Patrícia Seixas Auad Brandão, 2009.
92.

Orientador(a): Prof. Dr. André Castro Lyra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia,
Instituto de Ciências da Saúde, 2009.

1. Hepatite crônica C. 2. Polimorfismo. 3. TGF- β 1.
4. Fibrose. I. Lyra, André Castro. II. Título.

CDU: 616.36-002

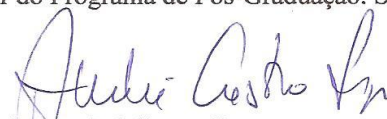


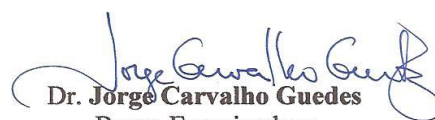
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA




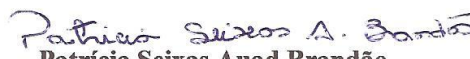
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA PÓS-
GRADUANDA **PATRÍCIA SEIXAS AUAD BRANDÃO**


Aos vinte e oito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e nove, às 14:00 horas, no auditório III no segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. **André Castro Lyra** Orientador, Dr. **Jorge Carvalho Guedes**, Dra. **Kyoko Abe-Sandes**, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: “**Estudo de Associação de Polimorfismos no Gene da Citocina *TGFBI* e o Estágio da Fibrose na Hepatite Crônica C**” da pós-graduanda **PATRÍCIA SEIXAS AUAD BRANDÃO**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação de Mestrado APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 28 de dezembro de 2009.


Dr. **André Castro Lyra**
Orientador


Dr. **Jorge Carvalho Guedes**
Banca Examinadora


Dra. **Kyoko Abe-Sandes**
Banca Examinadora


Patrícia Seixas Auad Brandão
Mestranda


Dr. **Roberto Meyer Nascimento**
Coordenador do PPGIm

Ao meu mestre Jesus, que cada batida do meu coração

renove a gratidão que tenho a Vós, Senhor!

Aos

meus tão lindos e amados pais, Anderson e Elizabeth, por tudo o que já fizeram e continuam a fazer por mim, pelo amor incondicional, exemplo, cuidado, incentivo e orações. Continuo sendo a “filha pequenininha” de vocês, mas tenho buscado ser “grande”, para dar-lhes o orgulho que tanto são merecedores.

Aos

meus adorados irmãos Anderson, Dora, Eduardo e Raul (in memoriam). Vocês não têm ideia do orgulho que tenho de ser irmã de vocês e de ter chegado por último, para tê-los como exemplo em tudo na minha vida.

À

minha avó Solange (Voca), peço perdão pela ausência na condição de recuperar todo o tempo perdido. Quero agora dedicar-me à senhora, como sempre se dedicou

a mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Lyra, pelos conhecimentos prestados durante a execução deste trabalho.

À Profa. Denise Lemaire, pelas sugestões constantes e oportunas ao projeto.

Ao Dr. Ramiro Mascarenhas, amigo que mostrou o caminho para eu chegar até aqui. Agradeço-lhe muito por isso.

Ao Prof. Dr. Luciano Fonseca Júnior – o presente que Deus me deu para a busca do conhecimento de forma tão séria, contagiante e empolgante. Senti-me crescer ao seu lado. Minha gratidão é pouco para agradecer-lhe por tudo.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e do Hospital São Rafael, pela colaboração e busca das lâminas de biópsias para as suas revisões.

Às coletadoras Manuela e Jeane, pela responsabilidade e cuidado nas coletas sanguíneas.

Aos estudantes de medicina e de iniciação científica, João Carvalho, Eilane Azevedo e Leila Lima. Difícil falar de vocês sem emoção, carinho e admiração. Vocês foram companheiros de todas as horas.

À Dra. Profa. e, além de tudo, amiga e conselheira de todos e de todas as horas, Teresita Bendicho. Faltam-me palavras para expressar minha eterna gratidão por tudo que sempre fez por mim e por ter 'segurado minha mão' nos momentos mais difíceis durante a execução deste trabalho e da minha vida.

À amiga Lourianne, como poderia não chamar de amiga alguém que tanto fez por mim e que não permitiu que eu desistisse desse caminho? É enriquecedor estar ao seu lado.

Às amigas Valdirene Carneiro, Ana Luíza Argolo, Jaqueline Dinis e Mabel Proence – quarteto “mãos à obra” – que me ajudaram e realizaram parte deste meu trabalho. Minha gratidão.

Aos meus queridos amigos do Hospital das Clínicas (em especial Cris, Vera e Letícia) e do Hospital São Rafael (Carmen Silveira e Luciano Coelho), pelo apoio e ajuda na confecção do material, na seleção dos pacientes e na coleta das amostras.

À equipe do Ambulatório de Hepatologia do HUPES, pelo acolhimento e disponibilidade na obtenção de dados essenciais ao trabalho.

Aos funcionários do arquivo do Ambulatório de Hepatologia do HUPES, pela preciosa colaboração na revisão dos prontuários dos pacientes deste estudo.

A Dilcéia Oliveira, mais que secretária, também incentivadora e conselheira, dando apoio com toda a simpatia que lhe é tão peculiar, junto de toda a equipe do PPGIm, o que certamente tem muito do perfil do nosso ‘guru’ Prof. Roberto Meyer.

Em especial aos pacientes, que voluntariamente, doaram seu sangue, seus dados e suas esperanças, possibilitando a realização deste trabalho, confiando e acreditando na descoberta de novos caminhos em prol da ciência e na luta contra a doença, ansiando por mais dias de vida.

Sabendo que as relações humanas são infinitamente maiores e mais relevantes do que os contatos acadêmicos e profissionais, agradeço mais uma vez ao PPGIm pela confiança depositada em mim e, por fim, agradeço o carinho que sempre recebi dos colegas e professores, cujos brilhos se fizeram presentes do decorrer desta dissertação.

Brandão, Patrícia Seixas Auad. Estudo de associação de polimorfismos nos genes da citocina *tgfb* e o estágio da fibrose na hepatite crônica C. 92f, 2010. Dissertação (mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia,

Introdução: A hepatite crônica C é um processo inflamatório persistente, de duração superior a seis meses e o seu tratamento é realizado com o uso de interferons associados à ribavirina. Fatores como o genótipo do vírus, a carga viral e características do hospedeiro estão envolvidos com o sucesso da terapia. Os fatores do hospedeiro, especialmente, os imunológicos e genéticos parecem ter um papel importante no resultado do tratamento da hepatite C. Algumas proteínas como a citocina TGF- β 1 tem sido associada com as complicações decorrentes de produção excessiva de fibrose, associada com condições inflamatórias crônicas. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a associação de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 e o estágio da fibrose na hepatite crônica C. **Métodos:** Este é um estudo de caso-controle não pareado, onde foram avaliados pacientes mono infectados com vírus da hepatite C (VHC) tratados com terapia combinada com interferon convencional e/ou peguilado associado a ribavirina, os quais foram divididos em dois grupos, de acordo com os estágios de fibrose: fibrose hepática leve a moderada \leq F2 e fibrose hepática avançada F3 e F4 e um grupo controle de uma amostra histórica de doadores de sangue. Sendo realizada a genotipagem da TGF- β 1 pelo método PCR-SSP (Kit One Lambda). **Resultados:** Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de indivíduos com hepatite crônica C e doadores de sangue. Houve maior frequência do alelo G ($p= 0,0021$) nos indivíduos com hepatite crônica C como também observamos maior frequência do genótipo GG ($p=0,0029$) entre os indivíduos com hepatite crônica C. **Conclusões:** Os dados obtidos sugerem que os polimorfismos do gene *TGFB1* nos códons 10 e 25 não estão associados com a fibrose hepática em indivíduos com hepatite crônica C e que o polimorfismo do gene *TGFB1* no códon 25 tem maior frequência nos indivíduos com hepatite crônica C quando comparados com indivíduos sadios, podendo ser um marcador de susceptibilidade a infecção pela hepatite crônica C.

Palavras-chave: Hepatite crônica C, polimorfismo, TGF- β 1, fibrose

Brandão, Patricia Seixas Auad. Association study of polymorphisms in the cytokine TGF β and stage of fibrosis in chronic hepatitis C. 92f, 2010. Thesis (MA) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia,

Introduction: The chronic hepatitis C is a persistent lawsuit, of superior duration to the six months and his/her treatment is accomplished with the interferons use associated to the ribavirin. Factors as the genotype of the virus, the load viral and characteristics of the host are involved with the success of the therapy. The factors of the host, especially, the immunological and genetic seem to have an important paper in the result of the treatment of the hepatitis C. Some proteins as the cytokine TGF - it has been associated with the current complications of excessive production of fibrosis, associated with chronic inflammatory conditions. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the association of genetic polymorphisms of the cytokine TGF - and the apprenticeship of the fibrosis in the chronic hepatitis C. **Methods:** This is a case-control study no paired, where they were patient appraised monoinfected with virus of the hepatitis C (VHC) treaties with combined therapy of conventional interferon and/or pegylated associated the ribavirin, which were divided in two groups in agreement with the fibrosis apprenticeships: light hepatic fibrosis the moderate <F2 and advanced hepatic fibrosis F3 and F4 and a group control of a historical sample of donors of blood. Being accomplished the genotyping of TGF β 1 for the method PCR-SSP (Kit One Lambda). **Results:** They were found differences significant estatistically among the individuals' group with chronic hepatitis C and donors of blood. There was a larger frequency of the alele G in the individuals with chronic hepatitis C as well as we observed a larger frequency of the genotype GG among the individuals with chronic hepatitis C. **Conclusions:** The obtained data suggest that the polymorphisms of the gene TGFB1 in the códon 10 and 25 are not associated with the hepatic fibrosis in individuals with chronic hepatitis C and that the polymorphisms of the gene TGFB1 in the códon 25 has a larger frequency in the individuals with chronic hepatitis C when compared with healthy individuals, could be a susceptibility marker the infection for the chronic hepatitis C.

Key words: Chronic hepatitis C, polymorphisms , TGF- β 1, fibrosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A2M - alfa-2 macroglobulina

AH - ácido hialurônico

ALT- alaninaminotransferase

APCs – Células apresentadoras de antígenos

CCL-3- Proteína inflamatória de macrófagos

CE - células estreladas

CHC - carcinoma hepatocelular

C-HUPES - Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos

CXCL-10- Quimiocina envolvida no controle da migração e atração celular

CXCL-9- Quimiocina envolvida no controle da migração e atração celular

EDTA – Ácido diaminotetracético

ELISA – Imuno ensaio enzimático

FSC – FibroScan

GGT - Gama Glutamiltransferase

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

H&E - Hematoxilina-Eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência humana

HLA – Antígenos leucocitários humanos

HSR - Hospital São Rafael

IC – Intervalo de Confiança

ICAM - moléculas de adesão intercelular

IFN α - Interferon alfa

IFN β - Interferon beta

IFN-gama - interferon-gama

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

LT – linfócito

MEC – matriz extra celular

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1- Citocina inflamatória de ação antiviral

MMP – metaloproteinases

mRNA - RNA mensageiro

NASH- Esteatohepatite não alcoólica

NK – Natural killer

NR/R – Não respondedor/ reincidivante

OR – Odds-ratio

PCR - reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucleico

RVS - resposta virológica sustentada

TGF- β 1 – Fator Transformador de crescimento β 1

TH1 – T helper 1

TH2 – T helper 2

TIMPs – inibidores tissulares de metaloproteinases

TLR – Receptor Toll Like

TNF-alfa – fator de necrose tumoral alfa

VHB – vírus da hepatite B

VHC – vírus da hepatite C

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Dados clínicos e demográficos dos pacientes distribuídos conforme os estágios de fibrose hepática.....	67
Tabela 2: Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene de TGFB1 (códon 10T/C).....	69
Tabela 3: Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos do gene de TGFB1 (códon 25G/C).	70
Tabela 4: Frequências genótípicas e fenótipos previstos para o polimorfismo do gene de TGFB1 (códon 10T/C; códon 25G/C).	71
Quadro 1: Classificação histológica de fibrose hepática-modelo Metavir.....	45
Quadro 2: Características dos Polimorfismos nos Genes da Citocina TGFB1 .	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático da estrutura do vírus da hepatite C	21
Figura 2: Estrutura do genoma do vírus da hepatite C	21
Figura 3: Representação esquemática da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C	24
Figura 4: Cinética dos marcadores virológicos durante a infecção crônica pelo vírus da hepatite C	26
Figura 5: Interação entre linfócitos, células endoteliais e hepatócitos.....	32
Figura 6: O micro-ambiente sinusoidal e o vírus da hepatite C.....	35
Figura 7: Processo de formação da fibrogênese hepática	43
Figura 8: Localização do gene TGFB1 no cromossomo 19.....	49
Figura 9: SNPs e aminoácidos nas posições +869 e +915 do gene TGFB1. Fonte: Perrey et al., 1998	53
Figura 10: Genótipos, haplótipos e fenótipos para produção de TGF-β1 nas posições +869 e +915.....	53
Figura 11: F0= sem fibrose (Figura 11a); F1= fibrose portal com ou sem emissão de septos incompletos (Figura 11b); F2= fibrose portal com ocasionais septos fibrosos porta-porta (Figura 11c); F3= fibrose portal com numerosos septos fibrosos porta-porta e porta-centrolobular, sem cirrose (Figura 11d) e F4= cirrose (Figura 11e)	58
Figura 12: Imagem de gel de agarose a 2,5% mostrando a genotipagem de um indivíduo TGF-β1 T/T e G/G (1: E-B); controle negativo(1:H).	61

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1 REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1 HEPATITE C.....	20
1.1.1 O Vírus da Hepatite C, Biologia Molecular do VHC, Epidemiologia e Transmissão	20
1.1.2 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C	23
1.1.3 Diagnóstico da Infecção e Tratamento.....	24
1.1.4 Genotipagem do VHC	26
1.1.5 Tratamento da hepatite C	27
1.2 O FÍGADO COMO ÓRGÃO DO SISTEMA IMUNE	29
1.2.1 Histologia do Fígado.....	30
1.2.2 Células endoteliais.....	30
1.2.3 Células NK	32
1.2.4 Células Dendríticas	32
1.2.5 Células de Kupffer.....	33
1.2.6 Células de Ito	34
1.3 IMUNOPATOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHC.....	35
1.3.1 O Vírus C e o Micro-Ambiente Sinusoidal (Figura 2):	35
1.3.2 Infecção Aguda.....	36
1.3.3 Infecção Crônica	39
2 FIBROSE HEPÁTICA	42
2.1 Fibrogênese hepática	42
3 BIÓPSIA HEPÁTICA E MARCADORES BIOLÓGICOS	44
4 O FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR β1 (TGF- β1)	48
4.1 Estrutura gênica, proteína, receptor e expressão do gene <i>TGF β1</i>	48
4.1.1 Biossíntese e função biológica do TGF- β 1	50
4.1.2 Polimorfismos em genes de citocinas	51
4.1.3 Polimorfismo e níveis de expressão do gene <i>TGFB1</i>	52

5 OBJETIVOS.....	54
5.1 OBJETIVO GERAL.....	54
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
L6 MATERIAL E MÉTODOS	55
6.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	55
6.2 DESENHO DO ESTUDO.....	55
6.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	55
6.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	56
6.5 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	56
6.6 AVALIAÇÃO DA HEPATITE CRÔNICA C E RESPOSTA AO TRATAMENTO.....	56
6.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	57
6.8 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA FENOTÍPICA.....	59
6.9 EXTRAÇÃO DE DNA.....	59
6.10 Genotipagem de TGF- β 1	60
6.10.1 Região amplificada.....	62
6.11 Análise estatística.....	62
6.12 Delineamento do estudo.....	63
7 RESULTADOS.....	64
7.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	64
7.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO E ESTÁGIOS DE FIBROSE HEPÁTICA.....	65
7.3 POLIMORFISMOS (CÓDON 10T/C; CÓDON 25G/C) DO GENE DE TGF- β 1.....	67
7.4 CÓDON 10 (T/C)	68
7.5 CÓDON 25 (G/C).....	69
7.6 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS	70
8 DISCUSSÃO	72
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS.....	78

APÊNDICES	85
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA	85
APÊNDICE B – MAPA DE GENOTIPAGEM	87
ANEXOS	89
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	89
ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (RECOMENDAÇÕES)	92
ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (RECOMENDAÇÕES)	94

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 170 milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas com o vírus da hepatite C (CHEVALIEZ, 2006). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que quatro milhões de pessoas estejam contaminadas (BRASIL, 2004). No estado da Bahia, a prevalência é de 1,5% na cidade de Salvador, especialmente entre indivíduos maiores de 35 anos (ZARIFE, 2006).

As alterações hepáticas associadas ao vírus C traduzem-se pelo grau de fibrose que habitualmente é classificada (classificação METAVIR) desde F-0, ausência de fibrose, a F-4, fibrose avançada, já em estágio de cirrose. O estágio de fibrose hepática igual ou superior a F2 é o achado histológico mais importante para indicação de tratamento antiviral e a combinação de interferon com ribavirina apresenta resposta virológica sustentada (RVS) de 55% (SLOANE,2006).

A citocina TGF- β 1 é fator de estímulo mais potente para a transcrição do gene do colágeno tipo I, além de modular a reação inflamatória, influenciando a função das células T. Portanto, a TGF- β 1 é considerada o maior fator de aceleração do processo de fibrose. O efeito do polimorfismo dos genes da TGF- β 1 na progressão da hepatite C foi sugerido por vários pesquisadores(ZARAGOZA,2001).

Alguns estudos sugerem que o polimorfismo de genes da TGF- β 1 também é um fator genético que poderia influenciar a resposta do paciente ao tratamento com ribavirina e interferon. Daí a importância de novos estudos que se proponham a analisar as possíveis associações entre os fatores imuno-genéticos do hospedeiro relacionados à fibrose hepática com a resposta ao tratamento (SUGIMOTO,2003).

O objetivo principal desta pesquisa foi avaliar a possível associação de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 e o estágio da fibrose hepática em indivíduos com hepatite crônica C.

Também, como complemento, o estudo teve como objetivos secundários ou específicos, descrever as frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 (10C/T, 25C/G) em uma amostra de indivíduos com hepatite crônica C com diferentes estágios de fibrose, comparar as frequências observadas dos polimorfismos genéticos entre os grupos de pacientes com hepatite crônica C, conforme estágio de fibrose hepática definidos pela

classificação METAVIR e comparar as frequências observadas dos polimorfismos genéticos entre os grupos de pacientes com hepatite crônica C e controles sadios.

A pesquisa visa complementar ou até confirmar se os resultados encontrados são os mesmos já apresentados em outros estudos realizados com o mesmo objetivo.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HEPATITE C

1.1.1 O Vírus da Hepatite C, Biologia Molecular do VHC, Epidemiologia e Transmissão

Choo *et al.* (1989), identificaram o vírus da hepatite C (VHC), em 1989, a partir de amostras de plasma de chimpanzés infectados experimentalmente com soros de pacientes portadores de hepatite crônica não- A não-B. Utilizando técnicas de biologia molecular, foi possível clonar o genoma viral em leveduras, caracterizar o RNA viral e, posteriormente, expressar as proteínas deste vírus, que viriam a ser de grande valia para a obtenção de reagentes de diagnóstico. A partir da caracterização do vírus, pôde-se constatar que o mesmo foi o responsável por 90% das hepatites pós-transfusionais ocorridas antes de 1992. Os exames sorológicos para detecção da infecção viral só tornaram-se disponíveis, comercialmente, a partir de 1991, na maioria dos países, e no Brasil a partir de 1993.

O VHC é um vírus RNA, fita única positiva, cujo genoma possui 9,5 Kb (figura 1). Ele pertence à família *Flaviviridae*. Diferentemente do vírus da hepatite B, o genoma do VHC não se incorpora ao genoma das células infectadas; o seu RNA funciona diretamente como RNA mensageiro (RNAm) no citoplasma da célula hospedeira onde a tradução é iniciada a partir de codificação de uma poliproteína que é pós-traduzida em 10 proteínas denominadas de proteínas estruturais (core, envelope E1 e E2), p7 e de proteínas não estruturais (NS-2, NS-3, NS-4A, NS-4B, NS-5A e NS- 5B) (CHOO,1989;1991)(figura 2).

Os diferentes graus de similaridade e diversidade genética entre as várias cepas do VHC dividem esse agente em cerca de 6 genótipos principais com mais de 100 subtipos (VAN DOORN,1994; PURCELL,1997); dentro de cada indivíduo coexistem ainda sequências do VHC que apresentam variações distintas à custa da presença de alguns nucleotídeos; embora intimamente relacionadas, são denominadas de *quasispecies*, que ocorrem devido a replicação imperfeita do vírus

por falha de atividade de correção da RNA polimerase viral (REHERMANN, 2005). A existência das *quasispecies* provavelmente dificulta o desenvolvimento de vacinas, além de favorecer a perpetuação do vírus no organismo (ACTA, 2001).

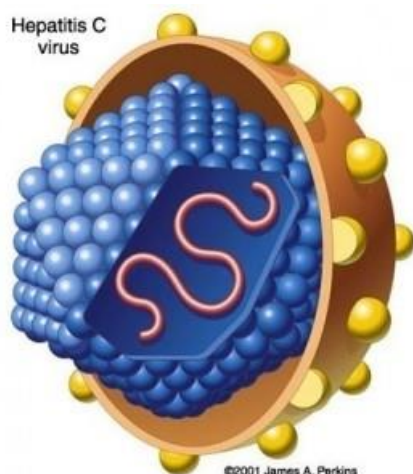


Figura 1: Diagrama esquemático da estrutura do vírus da hepatite C

Fonte: Perkins, 2001

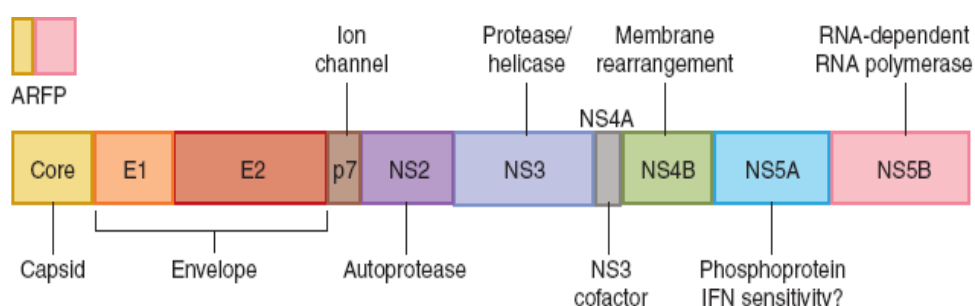


Figura 2: Estrutura do genoma do vírus da hepatite C

Fonte: Dustin and Rice, 2007

Aproximadamente 180 milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas com o vírus da hepatite C (CHEVALIEZ, 2006). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, estima-se que quatro milhões de pessoas estejam contaminadas (BRASIL, 2004). No estado da Bahia, a prevalência é de 1,5% na cidade de Salvador, especialmente entre indivíduos maiores de 35 anos (ZARIFE, 2006). A prevalência da infecção pelo VHC entre afro-descendentes é maior que entre aqueles de ancestralidade europeia (5% vs 1%)(HOWELL, 2000).

A principal via de transmissão é a parenteral (contato com sangue e seus derivados); o uso de drogas ilícitas, notadamente por via endovenosa é, atualmente, considerado como a principal via de contaminação pelo vírus C. Em percentual significativo de casos, não é possível identificar a via de infecção (STRADER, 2004).

São consideradas populações de risco acrescido para a infecção pelo VHC por via parenteral: indivíduos que receberam transfusão de sangue e/ou hemoderivados antes de 1993, usuários de drogas injetáveis, inaláveis, inclusive o uso de *crack*, pessoas com tatuagem, *piercing*, acupuntura, que se submeteram a intervenção médica ou odontológica, acidente com agulhas potencialmente infectadas, além do uso de seringa de vidro com equipamentos não esterilizados ou indevidamente esterilizados (BRANDÃO; FUCHS, 2002; GUADAGNINO *et al.*, 1997). Atualmente, a transmissão do VHC por transfusão de sangue é rara, devido à introdução do teste sorológico de triagem em doadores, desde 1993, pela Portaria MS nº 1.376/93.

A transmissão sexual é menos frequente e ocorre principalmente em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco (sem uso de preservativo). A transmissão vertical (materno-fetal) pode ocorrer em alguns casos, mas é rara. Entretanto, já se demonstrou que gestantes com carga viral do VHC elevada ou co-infectadas pelo HIV, apresentam maior risco de transmissão da doença para os recém-nascidos (STRAUSS, 2001).

O uso de drogas injetáveis e inaláveis, incluindo-se o uso de *crack*, é o principal modo de transmissão da hepatite C atualmente. A droga inalada provoca ulceração da mucosa nasal que possibilita a contaminação do cachimbo utilizado, o qual é compartilhado pelos usuários¹.

Alguns estudos mostram que a taxa de infecção pelo VHC, em jovens usuários de drogas, é quatro vezes maior do que a infecção pelo HIV. Após três anos de uso de drogas, a prevalência da infecção pelo vírus C é de 30%, ultrapassando 50% após cinco anos de uso².

Estudos norte-americanos demonstraram que entre as pessoas infectadas recentemente pelo VHC, 60% são ou foram usuárias de drogas injetáveis, inaláveis,

¹ **Viral Hepatitis is an Important Health Issue for the Nation.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/idu/hepatitis/viral_hep_drug_use.htm>. Acessado em: 16 abr 2007

² Idem

incluindo-se o uso de *crack*. Aproximadamente 20% relataram exposição sexual com parceiro VHC positivo ou múltiplos parceiros; em 10% dos casos, a exposição ocorreu pelo conjunto de outras formas conhecidas (hemodiálise, contato domiciliar, ocupacional e perinatal). Nos 10% restantes, nenhuma exposição pôde ser definida; em comum, a maior parte das pessoas pertencentes a esta última categoria, tem um padrão socioeconômico desfavorável, que geralmente está associado a muitas outras doenças infecciosas (MS-SVS, 2008).

1.1.2 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C

A história natural da infecção pelo VHC pode ser extremamente variável em termos de tempo de evolução da hepatite e da fibrose hepática (Figura 3). Na infecção aguda pelo vírus C, o período de incubação até o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos varia de 15 a 150 dias. A maioria dos indivíduos contaminados com VHC (cerca de 70% dos casos) desenvolve formas anictéricas da hepatite, com evolução para processo infeccioso crônico, assintomático; a infecção é descoberta, geralmente em exames clínicos de rotina, quando são detectadas alterações nos níveis de aminotransferases e em triagem sorológica para doação de sangue e hemoderivados (STRAUSS, 2001).

Apenas um pequeno número de indivíduos (15%) consegue controlar a infecção aguda espontaneamente, sugerindo que a resposta imune ao VHC na maioria das vezes é fraca (FUNG, 2005). Após a infecção aguda, a viremia persiste e cerca de 85% dos indivíduos desenvolvem infecção crônica (COSTA *et al.*, 2002).

A hepatite crônica C é uma doença caracterizada por lesão hepática com inflamação e fibrose. A progressão da fibrose é extremamente variável e o curso natural da doença pode se estender por várias décadas. Fatores virais e do hospedeiro, assim como presença de outras infecções, podem acelerar a progressão da fibrose hepática (KAMAL *et al.*, 2006). Em adultos, a cronificação ocorre em 80% a 85% dos casos, sendo que um terço deles evolui para formas graves em um período de 20 anos. O restante evolui de forma mais lenta e talvez nunca desenvolva hepatopatia grave (STRAUSS, 2001). Cerca de 20% dos pacientes com hepatite crônica C evoluem para cirrose em um período que pode variar de 10, 20 ou

30 anos. Como causas de óbito importantes, incluem-se a cirrose e o hepatocarcinoma (MARCELLIN *et al.*, 1999).

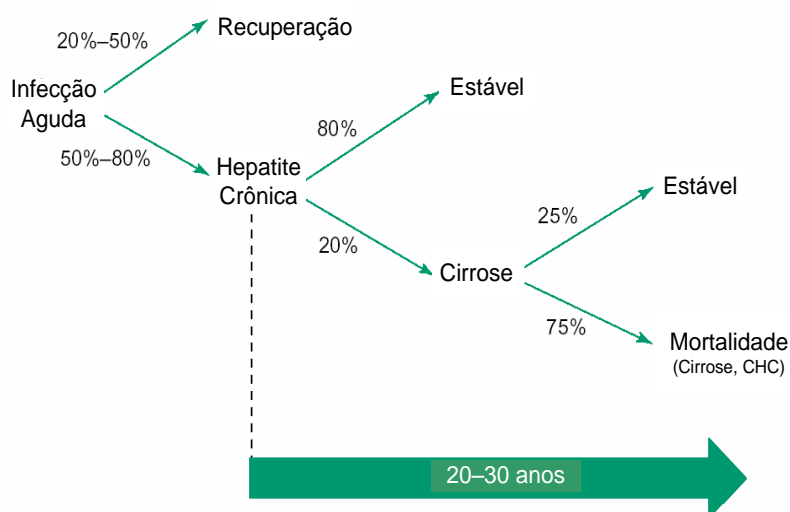


Figura 3: Representação esquemática da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C

Fonte: adaptada- PAWLITSKY, 2004

1.1.3 Diagnóstico da Infecção e Tratamento

Foram várias as tentativas de isolamento dos agentes causadores da hepatite não-A não-B. Choo *et al.* (1989), trabalhando com chimpanzés inoculados com soros de pacientes portadores de hepatite crônica pós-transfusional, conseguiram clonar um peptídeo viral, alvo da resposta imunológica do hospedeiro. Desta maneira, identificaram o 4º vírus hepatotrópico, chamado de vírus da hepatite C. Rapidamente desenvolveu-se um teste sorológico chamado de anti-HCV de 1ª geração (KUO *et al.*, 1989). Seguiram-se os testes de 2ª e de 3ª geração para detecção de anticorpos anti-VHC, os quais somaram ganho na sensibilidade e especificidade (SCHIFF *et al.*, 1998). Adquiriu-se também experiência com a biologia molecular, aplicada ao diagnóstico da hepatite C, onde a PCR (reação em cadeia da polimerase) trouxe benefícios no sentido de aferir a atividade replicativa do vírus no soro (MC GUINNESS *et al.*, 1993). O diagnóstico sorológico da infecção pelo VHC é feito por meio dos testes de triagem que identificam anticorpos contra antígenos virais no soro. A infecção deve ser confirmada a partir da identificação do ácido ribonucleico

(RNA) do VHC por métodos de biologia molecular, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR), a mais utilizada na atualidade (STRAUSS 2001).

Após a soroconversão, estes testes sorológicos permanecem sempre positivos. Anticorpos contra o VHC ainda são detectáveis durante e depois do tratamento, independentemente da resposta; porém, a concentração dos anticorpos anti-VHC diminui gradualmente com o passar do tempo naqueles pacientes cuja infecção foi eliminada espontaneamente. Às vezes, em casos de eliminação espontânea do processo infeccioso, os anticorpos não são detectados devido à baixa sensibilidade dos testes sorológicos (TANAKI *et al.*, 2000).

Anticorpos contra o VHC são identificados através de imunoenaios enzimáticos que são muito sensíveis e muito específicos. Os imunoenaios enzimáticos de 3ª geração, usados no momento, contêm a proteína do core e proteínas não-estruturais, e podem detectar anticorpos dentro de 4-10 semanas de infecção. Pacientes imunossuprimidos podem apresentar resultados falso negativos; entre estes pacientes estão incluídos aqueles HIV-1 positivos, com infecção renal crônica, e aqueles com VHC-associado à crioglobulinemia. Os testes de RNA VHC qualitativo são baseados na técnica de PCR e têm um limite baixo de detecção de menos que 100 cópias de HCV RNA por mL de soro (50 ui/mL) (PAWLOTSKY *et al.*, 1997; 2002).

A detecção de anticorpos específicos em fluidos corpóreos é baseada no uso de imunoenaios enzimáticos tipo sanduíche (EIAs). São usados antígenos recombinantes para capturar anticorpos circulantes. EIAs são baratos, fáceis de usar, podem ser completamente automatizados e são bem adaptados à prova de grandes volumes (BUSCH *et al.*, 2005).

Anticorpos anti-VHC aparecem em média 2-8 semanas depois da fase aguda da infecção e persistem por toda a vida em pacientes que desenvolvem infecção crônica pelo VHC. A presença de ambos os anticorpos para VHC e VHC RNA não permite distinguir entre hepatite aguda C de uma exacerbação aguda de hepatite crônica C ou uma hepatite aguda de outra causa em um paciente com hepatite crônica C. Entretanto, o índice de avidéz da imunoglobulina G do anti-VHC (IgG) dentro dos primeiros 8 dias seguidos do começo dos sintomas clínicos pode ser útil na identificação de casos de infecção atual e aguda pelo VHC (COPPOLA *et al.*, 2007).

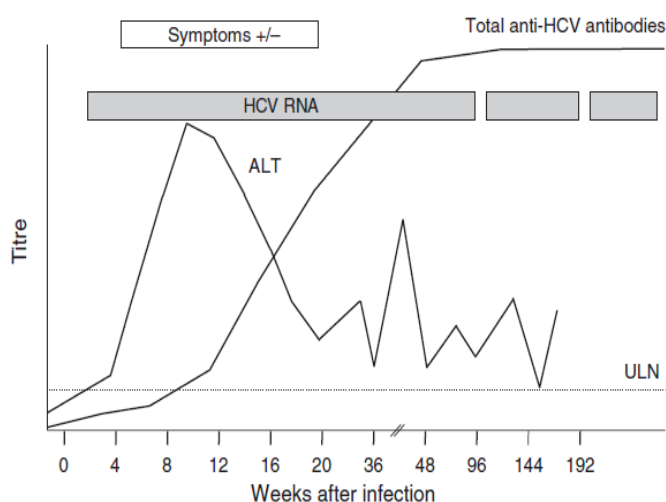


Figura 4: Cinética dos marcadores virológicos durante a infecção crônica pelo vírus da hepatite C
 Fonte: Chevaliez e Pawlosky, 2009

O significado da presença do anti-VHC IgM durante a infecção pelo VHC é obscuro. Foram encontrados Anti-VHC IgM em 50-93% de pacientes com hepatite aguda C e 50-70% de pacientes com hepatite crônica C (HELLSTROM *et al.*, 1993; SAGNELLI *et al.*, 2003). Então, o anti-VHC IgM não pode ser usado como um marcador seguro de infecção aguda pelo VHC; conseqüentemente, os ensaios que utilizam a detecção de anti-VHC IgM não são utilizados na prática clínica. Preconiza-se que determinações consecutivas de anti-VHC IgM (pelo menos três determinações do 5º para o 15º dia do começo dos sintomas) podem identificar os pacientes com hepatite aguda C (SAGNELLI *et al.*, 2005).

1.1.4 Genotipagem do VHC

O genótipo do VHC pode ser determinado por meio de um ensaio de ELISA competitivo que usa antígenos de genótipos-específicos (PAWLOTSKY *et al.*, 1997). Este ensaio permite a identificação dos seis genótipos de VHC (CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006; COPPOLA, *et al.* 2007) mas não o subtipo.

A identificação do RNA do vírus da hepatite C e a sua quantificação podem ser alcançadas usando dois tipos de técnicas baseadas na biologia molecular que são o PCR e a sua amplificação (branched DNA). Seja qual for a técnica usada, as

unidades internacionais por mililitro (ui/mL) do VHC RNA devem ser preferidas a qualquer outra unidade quantitativa e deveriam ser padronizadas em todos os ensaios quantitativos comerciais. Podem ser usados fatores de conversão para estabelecer uma relação entre as unidades internacionais e o número de cópias (PAWLOTSKY, 2002). Estas técnicas, consideradas clássicas para a detecção do genoma viral e a sua quantificação, estão sendo substituídas atualmente, por ensaios de PCR em tempo-real (CHEVALIEZ *et al.*, 2007). Técnicas de PCR em tempo-real têm uma larga dinâmica de quantificação que dão respaldo às necessidades clínicas (gama superior de quantificação: 7-8 log¹⁰ ui/mL). O PCR em tempo-real é mais sensível que o PCR clássico, que apresenta limites mais baixos de detecção da ordem de 10-15 ui/mL. Ensaios de PCR em tempo-real não apresentam resultados falso-positivos devido a contaminações; estes testes podem ser completamente automatizados (CHEVALIEZ *et al.*, 2007).

A detecção do RNA do vírus da hepatite C, e a sua quantificação, é útil na prática clínica para diagnosticar a infecção crônica pelo VHC, para identificar pacientes que precisam de terapia antiviral e monitorar a terapia antiviral (PAWLOTSKY, 2002). Sorologia e marcadores moleculares são usados na prática clínica para diagnosticar a hepatite crônica C, para guia na tomada de decisões do tratamento e monitorar a eficácia antiviral do tratamento. A persistência de VHC RNA por mais de 6 meses define infecção crônica pelo VHC. Tanto anticorpos anti-VHC como a presença de VHC RNA estão presentes em pacientes com hepatite crônica C. Devido à qualidade dos testes utilizados para a detecção de anticorpos anti-VHC, raramente observa-se replicação do vírus C na ausência de anticorpos anti-VHC ; isto é verificado, quase que exclusivamente, em pacientes profundamente imunossuprimidos (HIV-positivos, hemodialisados ou com agamaglobulinemia) (LOK *et al.*, 1993; THIO *et al.*, 2000).

1.1.5 Tratamento da hepatite C

O tratamento padrão atual para a hepatite crônica C é a combinação de interferon peguilado alfa-2a ou alfa-2b e ribavirina (NIH CONSENS STATE SCI STATEMENTS, 2002). Os interferons são citocinas potentes, com ações antivirais,

imunomoduladoras e antifibrogênicas, apresentando maior eficácia e vida média plasmática prolongada quando acrescidos por uma molécula de polietilenoglicol (interferon peguilado). A ribavirina é um análogo nucleotídeo purínico, com efeito virostático, que inibe a síntese do RNA mensageiro viral (SILVA, 2003).

As críticas decisões clínicas em iniciar-se o tratamento ou não, como monitorar o tratamento, a eficácia do tratamento e depois, quando parar prematuramente e se deve considerar ou não o retratamento, tudo depende da disponibilidade de informações providas pelas ferramentas como a PCR e a carga viral. A eficácia do tratamento da hepatite crônica C é aceita universalmente com a resposta virológica sustentada (RVS), definida por VHC RNA indetectável no soro com um ensaio sensível (limite de detecção abaixo de 50 ui/mL) dentro de 24 semanas depois do fim de tratamento (NIH CONSENS STATE SCI STATEMENTS, 2002).

A decisão para tratar hepatite crônica C, depende de múltiplos parâmetros, inclusive uma precisa avaliação da gravidade da doença hepática, a presença absoluta ou relativa das contraindicações para a terapia e a vontade do paciente em ser tratado. O genótipo do vírus da hepatite C deveria ser determinado sistematicamente antes do tratamento, tendo como determinante na indicação e na duração do tratamento, a dose de ribavirina e os procedimentos virológicos que o monitoram (HADZIYANNIS, *et al.*, 2004). Os pacientes infectados com os genótipos 2 e 3 requerem 24 semanas de tratamento e uma baixa dose de ribavirina. Em contraste, os pacientes com os genótipos 1, 4, 5 e 6 requerem 48 semanas de tratamento e uma dose mais alta de ribavirina, diariamente (NIH CONSENS STATE SCI STATEMENTS, 2002; GAD, *et al.*, 2008).

É recomendado monitorar os níveis do RNA do VHC para avaliar o tratamento à resposta virológica atual. Em pacientes infectados pelo VHC e genótipo 1, os níveis de RNA do VHC deveriam ser medidos antes da terapia e 12 semanas após sua iniciação. A ausência de uma resposta virológica precoce na 12ª semana (RVS) indica que o paciente possivelmente não tem nenhuma chance de alcançar uma RVS e deveria parar o tratamento. Em contraste, o tratamento deve ser continuado quando há queda no nível do VHC RNA na semana 12, até a semana 48 e se o VHC RNA for indetectável, e talvez prolongar até a semana 72 se o VHC RNA ainda for detectável na semana 12 (BERG, *et al.*, 2006; SANCHES-TAPIAS, *et al.*, 2006).

Recentes estudos sugeriram que os pacientes que alcançam uma resposta virológica rápida, definida por um VHC RNA (50 ui/mL) indetectável na semana 4 da terapia, poderiam beneficiar-se de um tratamento de duração mais curta, 24 semanas em pacientes infetados com VHC genótipo 1, 4, 5 ou 6 e 12-16 semanas com genótipo do VHC 2 ou 3 (DALGARD, *et al.*, 2004; SHIFFMAN, *et al.*, 2007).

Os genótipos do VHC também têm distribuições geográficas distintas e o genótipo é um marcador de prognóstico essencial da probabilidade de erradicação do VHC durante o tratamento antiviral (HADZIYANNIS, *et al.*, 2004).

A RVS corresponde a uma cura da infecção em mais que 99% de casos. A terapia futura será uma combinação tripla, com a ribavirina, o interferon peguilado e um inibidor específico do VHC, que provavelmente se tornará o tratamento padrão da hepatite crônica C (SHIFFMAN, *et al.*, 2007).

O nível de replicação do VHC não está correlacionado com a gravidade da doença hepática nem com o risco de progressão da doença hepática para a cirrose ou CHC. Avaliações repetidas de aminotransferases são recomendadas para a avaliação da inflamação hepática e da fibrose por meio da biópsia ou por testes não invasivos como sorologias ou ecografia, para avaliar os casos de elevações persistentes ou intermitentes dos níveis de aminotransferases (NIH CONSENS STATE SCI STATEMENTS, 2002).

Os principais objetivos do tratamento são: eliminação permanente do vírus da hepatite C; melhora das lesões necro-inflamatórias; bloqueio ou regressão da fibrogênese; interrupção da progressão da doença, com melhora da sobrevida (POYNARD, *et al.*, 2005; YOSHIDA, *et al.*, 2002).

Dentre os fatores preditivos de resposta favorável à terapia antiviral, incluem-se idade inferior a 40 anos, sexo feminino, genótipo 2 ou 3, carga viral inferior a dois milhões de cópias/mL e menor grau de fibrose à biópsia hepática (BOOTH, *et al.*, 2001).

1.2 O FÍGADO COMO ÓRGÃO DO SISTEMA IMUNE

Através do fígado passa o sangue proveniente da circulação sistêmica. A exposição do fígado a antígenos diversos estimula uma resposta imune local.

Células de Kupffer, células NK, células endoteliais, células de Ito e hepatócitos estão envolvidos na resposta imune a diversos antígenos. As células do sinusóide hepático têm uma posição estratégica para interagir com células imunes que passam com o fluxo sanguíneo pelos sinusóides hepáticos. O fígado é reconhecido como um órgão regulador da imunidade; contribui para a eliminação de patógenos, mas, ao mesmo tempo, favorece a indução de tolerância imune (KNOLLE, GERKEN, 2000; CRISPE, 2003; 2009).

1.2.1 Histologia do Fígado

Em um fígado normal, cerca de 5-10% das células presentes são representadas por linfócitos; 2/3 destas células são linfócitos TCD4+ (mais abundantes) e TCD8+ além de células NK (1/3 do total destas células) e células T $\gamma\delta$ (gama-delta). Poucos linfócitos B são identificados (RACANELLI, et al., 2006).

Os sinusóides hepáticos são capilares de paredes revestidas por células por onde o sangue passa por dentro do fígado. Dentro dos sinusóides hepáticos, são identificados diferentes tipos de células imunologicamente ativas, representadas por células apresentadoras de antígeno, células de Kupffer, células NK, células NKT, células de Ito e células endoteliais (CRISPE, 2009).

Os principais componentes celulares do parênquima hepático são as células hepáticas propriamente ditas (hepatócitos) que se dispõem organizadas em trabéculas separadas por sinusóides onde localizam-se células endoteliais, células de Kupffer, além de células de Ito, células NK (natural killer) e linfócitos T citotóxicos (RACANELLI, et al., 2006).

1.2.2 Células endoteliais

As células endoteliais dos sinusóides hepáticos participam na apresentação de antígenos. Expressam receptores de fagocitose os quais tornam estas células capazes de capturar proteínas circulantes. Elas também expressam MHC classes I e II e moléculas coestimulatórias, tais como CD40, CD80, e CD86, o que confere a

estas células grande capacidade na apresentação antigênica (LE COUTEUR et al.,2002). Contudo, estas células também respondem à ligação TLR4, com secreção de IL-10, que inibe a sua função de apresentar antígenos às células endoteliais, sendo que a principal consequência desta função inibidora da resposta imune é a tolerância (WARREN *et al.*, 2005).

As células endoteliais exibem uma estrutura formada por fenestrações que são apoiadas por filamentos de actina do citoesqueleto. Sinais celulares envolvidos na regulação da actina, como o fator de crescimento transformador (TGF- β 1), influenciam na permeabilidade através de fenestrações. O papel das fenestrações na transferência bidirecional de substratos entre hepatócitos e sangue sinusoidal agora já está bem estabelecido (LE COUTEUR et al., 2005).

Há evidência crescente que hepatócitos podem funcionar como APCs, o que é importante na patogênese da infecção por vírus hepatotrópicos. Hepatócitos expressam altos níveis de moléculas de MHC classe I (CHEN et al., 2005), de moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e CD1d (BUNGARDNER et al.,1990; MANDAL et al., 1998; AGRATI et al.,2005) este um ligante reconhecido por linfócitos NKT (YU, 2005). Estas células são completamente competentes na interação e na ativação de linfócitos por receptores via MHC de classe I.

Linfócitos T poderiam interagir com hepatócitos através de alguns mecanismos (Fig.5) (LE COUTEUR et al.,2001; COGGER et al.,2001):

A) Por meio de fenestrações das células endoteliais, via extensão do citoplasma de linfócitos, que penetram no espaço de Disse e entram em contato com extensões do citoplasma dos hepatócitos, no interior do espaço de Disse.

B) Por meio de extensões do citoplasma de hepatócitos que se estendem aos sinusoides pelas fenestrações das células endoteliais.

C) Por meio de especializações de membrana das células endoteliais.

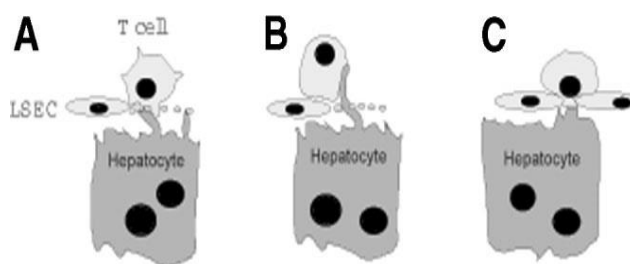


Figura 5: Interação entre linfócitos, células endoteliais e hepatócitos.

Fonte: Warren et al., 2006

1.2.3 Células NK

As células NK constituem uma população de linfócitos derivados da medula óssea, possuem grânulos citoplasmáticos e compõem de 10 a 15% das células mononucleares sanguíneas; estão envolvidas na resposta imune inata com função de destruir células infectadas por vírus ou outros microorganismos intracelulares e tumores (MURPHY *et al*, 1993). É a célula mais abundante no fígado (RACANELLI ; REHERMANN, 2006) e possui atividade citolítica contra células infectadas além de produzir grande número de citocinas incluindo fatores hematopoiéticos, tais como: interleucina 3 (IL-3), fator estimulante do crescimento de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a citocina inflamatória interferon- γ (INF- γ); o INF- γ interfere diretamente na replicação viral; promove acúmulo de linfócitos e células inflamatórias no local estimulando a resposta do perfil Th1. (TAY; WELSH, 1997; GUIDOTTI *et al*, 1999). Por outro lado, a estimulação de células dendríticas, a partir de citocinas produzidas por células NK, em pacientes com hepatite crônica C está prejudicada, pois, nestes casos, existe produção aumentada de IL-10 e TGF- β produzidas por vários tipos de células, principalmente monócitos e LTCD4+, o que pode inibir a função das células dendríticas (JINUSHI *et al.*, 2004).

1.2.4 Células Dendríticas

As células dendríticas, quando ativadas, expressam, em sua superfície, grande quantidade de moléculas coestimulatórias, que auxiliam na ativação dos linfócitos T. Têm um papel importante na resposta inata, pois secretam altos níveis

de IFN- α . Estas células são de suma importância como sentinelas que capturam os antígenos estranhos e como iniciadoras da resposta imune, pela apresentação de antígenos e ativação das células T, fazendo o elo entre a imunidade inata e a adaptativa, além de possuir tanto as moléculas do MHC de classe I como de classe II e são as únicas células que conseguem ativar as células T virgens (PAWLOTSKY, 2004). Por outro lado, as CDs têm sido associadas ao desenvolvimento de várias infecções virais crônicas; existem relatos que associam a hepatite crônica C com a função prejudicada das CDs a partir da expressão, por estas células, de proteínas E1 e do core do VHC (ROLLIER et al, 2003).

1.2.5 Células de Kupffer

O fígado contém uma população de macrófagos grande; são as células de Kupffer. Além da atividade fagocitária, estas células expressam moléculas do MHC e moléculas coestimulatórias, fazendo-as em potentes APCs (CALLERY et al., 1991; RACANELLI ; REHERMANN, 2006). Devido à sua localização, as células de Kupffer influenciam na função dos hepatócitos (THURMAN,1998). Quando há uma lesão hepática, essas células sofrem proliferação e aumento de tamanho (THUNG; GERGER, 1997), reconhecem determinado patógeno (JANEWAY, et al., 2007) e podem ter papel semelhante às células endoteliais no fígado, sinalizando o processo de adesão para o contato com os linfócitos (WINNOCK et al., 1993); fagocitam também fragmentos de hepatócitos que sofreram apoptose (corpúsculos de Councilmann) (RACANELLI ; REHERMANN, 2006). O reconhecimento de patógenos induz a produção de citocinas tais como a IL1, IL6, IL8, IL10, IL12, TGF- β e TNF- α , que agem no local ou podem ter ação em outras partes do organismo (RACANELLI; REHERMANN, 2006; JANEWAY, et al., 2007). As células de Kupffer ativadas por TNF- α têm efeito citotóxico nos hepatócitos (THURMAN, 1998).

1.2.6 Células de Ito

As células estreladas (CE), também denominadas células de Ito ou células armazenadoras de gordura, localizam-se no espaço de Disse, em contato direto com os hepatócitos e com as células endoteliais. Estas células sintetizam fatores de crescimento, prostaglandinas, citocinas e diversas outras substâncias bioativas; regulam, também, o fluxo sanguíneo hepático, pois emitem processos expansivos citoplasmáticos, os quais têm capacidade contráctil (KAUFMANN et al., 2007).

Um aspecto intrigante da função das células estreladas é a capacidade para expressar um duplo fenótipo. Em um fígado saudável, as células mostram o "fenótipo inativo", quer dizer, elas contêm vitamina A rica em lipídios e mostram uma taxa baixa de proliferação. No fígado cronicamente infectado, as células adquirem o "fenótipo ativado" – elas se diferenciam como os miofibroblastos – células com alta capacidade proliferativa, perdem a vitamina contida em seus reservatórios e assim desenvolvem um retículo endoplasmático áspero e proeminente, extensos microtúbulos e pacotes de filamentos de actina com condensações locais (SPRINGER-VERLAG,1997). Apresentam então, maior capacidade proliferativa, além de maiores motilidade e contratilidade; exibem também maior síntese de colágeno e dos demais componentes da matriz extracelular (KOBOLD et al., 2006). Desta forma, o evento central da fibrogênese é a ativação de células estreladas hepáticas (células de Ito) em miofibroblastos (HENRI et al., 2002).

Quando a hepatite é induzida por sobrecarga de ferro, consumo de álcool, infecção por vírus B ou C, NASH, hepatite autoimune, obstrução dos tubos biliares, inflamação local e hepatócitos lesados, ocorre a ativação das CE. Gressner, et al., 1995; OKUYAMA, et al., 2002; Kojima et al. (2008), mostraram que o TGF- β é ativado através de proteases na superfície das células estreladas hepáticas (CE) durante a patogênese da fibrose hepática, sendo essas células também as principais fontes produtoras de TGF- β no fígado, o que leva a um aumento na fibrose hepática. (FRIEDMAN, 2003).

1.3 IMUNOPATOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHC

O VHC tem tropismo pelo tecido hepático, ou seja, o fígado é o principal órgão alvo da infecção e replicação pelo VHC e a lesão deste órgão pode levar a sérias repercussões clínicas no organismo (WIELAND et al., 2005).

1.3.1 O Vírus C e o Micro-Ambiente Sinusoidal (Figura 2):

Os hepatócitos produzem IFN- α/β em resposta à infecção pelo VHC; esta citocina induz células de Kupffer residentes a produzir MIP-1 e CCL-3. CCL-3 estimula células NK para sintetizar IFN- γ que, subsequentemente, induz células endoteliais hepáticas a produzir CXCL-9 e CXCL-10. Os linfócitos T CD4 e CD8 são atraídos por CXCL-9 e CXCL-10 e entram em contato com as células endoteliais, células de Ito e hepatócitos. As células endoteliais, células de Kupffer e células dendríticas do fígado (DCs) induzem tolerância no lugar da ativação completa de células de T circulantes (LINDERBACH; RICE, 2005).

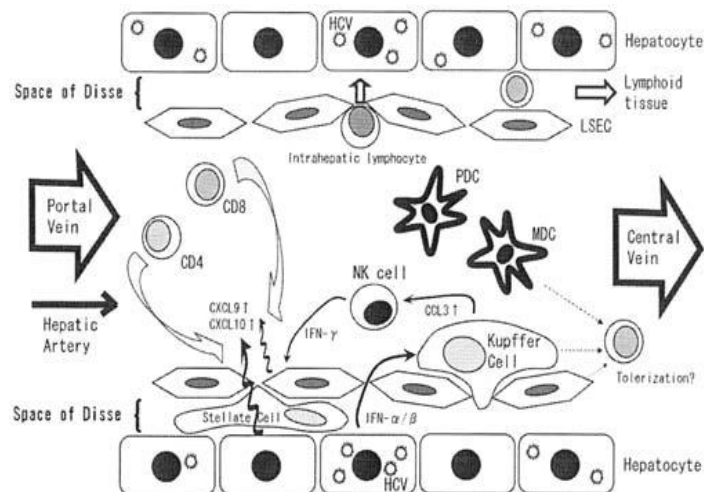


Figura 6: O micro-ambiente sinusoidal e o vírus da hepatite C.

Fonte: RICE, 2005

Além da molécula de superfície E2, a proteína E1 do envelope tem sido implicada na participação da entrada do VHC na célula alvo (POLYAK, 2003). Após a interação do envelope do vírus com a membrana da célula do hospedeiro, ocorre a endocitose; no citoplasma do hepatócito ocorre tradução do RNA mensageiro e

processamento das lipoproteínas; em seguida, ocorre replicação do RNA viral e transporte do mesmo até a superfície da célula hospedeira completando-se o ciclo de infecção produtiva (LINDERBACH; RICE, 2005).

Os hepatócitos infectados pelo VHC produzem IFN- α/β ; estas citocinas induzem a produção de citocinas quimiotáticas (MCP-1) ou (CCL2) por macrófagos residentes, o que contribui com a quimiotaxia de macrófagos; estes macrófagos produzem citocinas inflamatórias (MIP-1 α) ou (CCL3) que têm direta ação antiviral (KALAMS SA, WALKER, 1998) e ainda recrutam células NK direcionando-as para o foco da inflamação. Estas células NK também produzem IFN- γ (SALAZAR-MATHER; HOKENESS, 2006).

Poucos dias após a infecção, semanas antes do pico de alanina aminotransferase (ALT), ocorre um aumento no número de linfócitos T específicos. Estas células penetram no fígado pela veia porta e pela artéria hepática e entram em contato com as células apresentadoras de antígenos sinusoidais (células endoteliais e células NK) e com as células de Kupffer (POLYAK, 2003).

O VHC não exerce efeito citopático em células infectadas. O dano tissular decorre, principalmente, da resposta imune-mediada contra hepatócitos infectados pelo VHC; a consequente produção excessiva de tecido conjuntivo fibroso pela ativação de células de Ito representa o principal efeito adverso decorrente do processo infeccioso (GUIDOTTI, et al., 2001; SALAZAR-MATHER, et al., 2006; CASTELLINO, et al., 2006).

1.3.2 Infecção Aguda

O conhecimento sobre a resposta imune celular vírus específica, durante a infecção aguda, foi obtido de experimentos com chimpanzés infectados. A resolução da hepatite C aguda é determinada pela interação entre o vírus e o sistema imune do hospedeiro. Aproximadamente de 8-14 semanas, após a infecção, ocorre a resposta imune no fígado que coincide com a doença hepática. Aproximadamente 30% das infecções resolvidas espontaneamente estão associadas com uma vigorosa resposta imune celular através dos linfócitos TCD4+ e/ou TCD8+ contra múltiplos antígenos do vírus (WOOLLARD et al, 2003). Os linfócitos TCD4+,

produtores de citocinas no fígado, podem se diferenciar em subtipos Th1 e Th2, sendo que principalmente os linfócitos com perfil Th2 favorecem a fibrogênese no fígado lesado (FRIEDMAN, 2003). A resposta imune de células TCD4+ na fase aguda da infecção VHC é determinante, pois esta fase é marcada por uma resposta de células TCD4+ VHC específica, forte e sustentada. Nesta fase há uma grande proliferação destas células e intensa secreção de citocinas do perfil Th1, tais como: INF- γ e IL-2. Estas citocinas ativam respectivamente linfócitos TCD8+ citotóxicos e a proliferação de todas as células envolvidas na imunidade para patógeno intracelular, principalmente células TCD4+ (ULSHEIMER et al., 2003). A intensidade da resposta de células TCD4+ na fase precoce da infecção aguda parece ser decisiva para a resolução e o controle da infecção viral.

No decorrer da infecção aguda, os pacientes podem apresentar três padrões de resposta imune, celular:

- Pacientes com resposta imune celular adaptativa vigorosa e sustentada que leva à eliminação do vírus C na fase aguda da infecção.
- Pacientes que apresentam resposta imune celular específica, porém não sustentada, também chamada de resposta imune transitória; este tipo de resposta imune é considerado como o responsável pela persistência da infecção viral, e evolução crônica do processo infeccioso.
- Pacientes em que a resposta das células TCD4+ está ausente ou indetectável ocasionando a forma crônica da doença.

Os mecanismos inatos são inespecíficos, porém são importantes para o controle da disseminação e replicação viral, sendo necessários ao desenvolvimento da resposta adaptativa das células T CD4+ e TCD8+, as quais são as grandes efetoras na eliminação espontânea da infecção na fase aguda (HOWARD et al., 2004; SHER et al., 2003).

A falha da resposta imune adaptativa contra o vírus C não está relacionada somente com a viremia prolongada (GERLACH et al.; 1999; SEMMO et al., 2007). Acredita-se que células T CD4+ e CD8+ específicas aos epítomos do VHC podem não estar funcionalmente ativas, o que levaria à ausência ou transitoriedade da resposta imune Th1 com consequente persistência viral (DUSTIN et al., 2007; WOOLLARD et al., 2003; THIMME et al., 2001). Além dos linfócitos T CD4+ os

linfócitos TCD8+ desempenham um papel importante no controle da infecção pelo VHC. Estes linfócitos reconhecem o VHC presentes em hepatócitos assim como em outras células; este reconhecimento promove a secreção de citocinas com atividade antiviral (INF- γ) e consequente proteção de células vizinhas. Na fase aguda da infecção, a resposta de células TCD8+ VHC específica é detectada facilmente; esta resposta é ampla e multiespecífica contra peptídeos virais o que contribui para a eliminação viral; por outro lado, a presença de células ativadas no local da infecção correlaciona-se com a elevação de alanina aminotransferase (ALT) (KLENERMAN et al., 2002).

A infecção aguda pelo VHC quando eliminada, apresenta uma resposta de células TCD8+ vigorosa, dirigida contra múltiplos epítomos. Esta resposta é detectada aproximadamente de 4-8 semanas após infecção e seu aparecimento está relacionada com o início da doença no fígado. Na fase precoce da infecção, as células TCD8+ vírus específica não são capazes de secretar citocinas antivirais como o INF- γ , devido ao fenótipo “stunned” (THIMME et al., 2001). Este fenótipo é atribuído à infecção aguda, onde a secreção desta citocina antiviral é baixa ou ausente, provocada pela exposição constante a múltiplos antígenos virais, e que se apresentado por muito tempo, permite o aparecimento de escape viral conduzindo à infecção crônica (KLENERMAN et al., 2002).

Na fase tardia da infecção aguda, se as células TCD8+ vírus específica recuperam a sua capacidade secretória de INF- γ , a viremia declina e o vírus é eliminado. Esta resposta das células TCD4+ e TCD8+, após resolução da infecção, persiste por décadas e supera a resposta humoral. Por outro lado, quando não ocorre recuperação da atividade citotóxica e da produção de INF- γ pelos linfócitos TCD8+ ocorre a infecção aguda persistente com uma resposta TCD8+ vírus específica, enfraquecida e reduzida, demonstrada em estudos experimentais com chimpanzés e humanos (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2007).

A mutação dos epítomos realizada pelo vírus C permite que ele escape dos CTL VHC-específicos, contribuindo para diminuir o controle imune e causar a permanência do vírus no hospedeiro. Esta mutação dos epítomos, também causa a falha das células TCD4+ VHC-específicas, com consequente diminuição da proliferação celular e da produção de citocinas pelas células TCD4+, contribuindo para a evolução da cronicidade (ERICKSON et al., 2001).

1.3.3 Infecção Crônica

A hepatite crônica C varia nos seus aspectos clínicos e na sua evolução. Alguns doentes podem não ter qualquer sintoma nem sinais de doença no fígado e ter níveis de ALT inteiramente normais. Existem doentes que não apresentam sintomas, mas uma ligeira ou moderada elevação da ALT e que tem um prognóstico que se desconhece. Os casos mais graves são os pacientes com hepatite grave e sintomas de doença hepática, grande elevação de ALT que desenvolvem cirrose e falência hepática (FIELDS, 2001).

Estudos verificaram que quando a resposta do sistema imune enfraquece, o vírus naturalmente apresenta mutação ao longo do conjunto de 3.000 aminoácidos, o estado mais razoável para o vírus. Durante a fase aguda, sob intensa pressão imune, o vírus é forçado a distanciar-se do grupo de sequência ancestral (sequência consenso), usando mutações que permitem escapar do sistema imune. Uma vez que o vírus foi bem sucedido em escapar do sistema imune, ocorre reversão na sua sequência de aminoácidos para o grupo consenso. Assim é proposto que este direcionamento genético seja o mecanismo pelo qual o vírus escapa da resposta imune aguda e estabelece o estado crônico da infecção (BOWEN; WALKER, 2005).

Na infecção pelo VHC quando é estabelecida a cronicidade, as respostas imunes celulares são raramente detectáveis pelos métodos atuais, os quais analisaram respostas de células TCD4+ VHC- específicas na cronicidade da infecção, detectando uma resposta de baixa frequência no sangue e dirigida contra um número limitado de epítomos VHC (GERLACH et al, 1999). A resposta de células TCD4+ persiste na infecção crônica, porém com falhas na proliferação e produção da citocina (IFN- γ), a qual aumenta a expressão do receptor de IL-2 de cadeia α (CD25). Este receptor é um marcador precoce da ativação de células TCD4+ no sangue, através da estimulação com proteínas recombinantes do VHC. (ULSNHEIMER et al., 2003).

A perda da capacidade de proliferação celular é diretamente proporcional à perda de populações de células T específicas. Na infecção pelo VHC, quando há viremia, as populações de células TCD4+ VHC- específicas, produzem IFN- γ por antígeno estimulação, mas existem falhas na capacidade proliferativa, devido à

produção quase ausente de IL-2 (FULLER; ZAJAC, 2003). A falha global de células TCD4+ é um fator chave na persistência de VHC e claramente na doença crônica. Há relativamente poucas células funcionais; isto se deve à perda da funcionalidade e especificidade das células TCD4+. Mesmo considerando que a resposta TCD4+ VHC- específica seja fraca na monoinfecção crônica pelo VHC, elas são ainda mais fracas na coinfeção VHC/HIV. Deixando claro que na infecção crônica pelo VHC as células TCD4+ desempenham um papel significativo mesmo com baixa eficiência (SEMMO et al., 2007).

Na infecção crônica pelo VHC a resposta de células TCD8+ é fraca ou mesmo ausente, a qual alveja poucos epítomos. A função citotóxica das células TCD8+ durante a infecção crônica é bastante prejudicada bem como sua proliferação e secreção de citocinas antivirais. Esta resposta é incapaz de dirigir-se a novos epítomos, mas dirige-se para epítomos antigos. Isto é possível devido aos diferentes mecanismos usados pelo vírus para fazer mutações, a fim de escapar da resposta imune e contribuir para a persistência viral e a cronicidade da infecção (WEDEMEYER et al., 2002).

Fatores virais e do hospedeiro, inter-relacionados ou não, influenciam no curso da infecção pelo VHC (RODRIGUEZ, 2007).

Os fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro são: o gênero masculino, a idade acima de 40 anos no momento da exposição ao VHC, a “raça negra”, o diabetes melitus, o índice de massa corpórea (IMC) e a obesidade, a imunidade do hospedeiro, fatores genéticos como alguns haplótipos de HLA e depósito de ferro no fígado (RODRIGUEZ, 2007).

Os fatores extrínsecos do hospedeiro relacionados à progressão da hepatite C crônica são: o uso abusivo de álcool, o tabagismo, a aquisição do VHC por via endovenosa, a coinfeção com outros vírus como HIV, VHB e HTLV e a duração da infecção pelo VHC (RODRIGUEZ, 2007).

Os fatores da resposta imune ao VHC relacionados à progressão da doença crônica são: resposta das células NK, resposta humoral e formação de imunocomplexos; resposta TCD8+: lesão direta da célula infectada; resposta TCD4+: polarização Th1/Th2 inapropriada e secreção de citocinas (GREMION; CERNY, 2005).

Na interação hospedeiro e VHC, a constituição genética é um importante fator envolvido na persistência do vírus (GREMION; CERNY, 2005), pois influencia desde o reconhecimento e apresentação do antígeno até o tipo de resposta Th (THURSZ et al.,1997).

2 FIBROSE HEPÁTICA

A fibrose hepática é uma reação típica a uma lesão crônica com a persistência de infecções virais e helmínticas. É um processo dinâmico, regulado, não estático; caracteriza-se, morfológicamente, por um acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (PMEC) que compõem o tecido conjuntivo do fígado, formado, principalmente, de colágenos dos tipos I (C-I) e IV (C-IV), em suas formas fibrilares, e de substâncias glicoconjugadas, que incluem os proteoglicanos, a fibronectina e o ácido hialurônico (AH). A fibrose hepática decorre de um desequilíbrio entre a produção e a degradação da matriz conjuntiva (FRIEDMAN, 2000).

A fibrose, na hepatite C, decorre de uma resposta imune ineficiente para eliminar o vírus; a persistência do processo inflamatório promove necrose e, conseqüentemente, favorece o desenvolvimento de fibrose que pode evoluir para cirrose (STRAUSS, 2001).

A fibrose hepática e a cirrose representam as conseqüências de um processo regenerativo sustentado em resposta a uma lesão persistente, de diversas causas, como, por exemplo, a infecção crônica pelo VHC. A cirrose é o resultado final do processo de fibrose com a formação de nódulos e conseqüente comprometimento da função hepática; o fígado cirrótico contém cerca de seis vezes mais colágeno e proteoglicanos do que o órgão normal (AFDHAL et al., 2004).

A fibrose é o principal fenômeno das doenças crônicas do fígado, especialmente da hepatite crônica C. Representa um marcador histopatológico fundamental para a avaliação do estágio da doença crônica do fígado; é fundamental, também, para a avaliação da resposta ao tratamento antiviral (DESMET et al., 1994).

2.1 FIBROGÊNESE HEPÁTICA

A fibrogênese hepática determina persistência das lesões. A lenta e progressiva formação de fibrose decorre da liberação de metabólitos tóxicos

(acetoaldeído, por exemplo) que estimulam uma inter-relação entre dois tipos celulares residentes nos sinusoides hepáticos: as células de Kupffer e as células estreladas de Ito (FRIEDMAN et al., 2003).

Quando uma causa de fibrose está atuante, há os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), produzidos principalmente por miofibroblastos que se originam tanto de células estreladas hepáticas ativadas ou de fibroblastos portais e perivasculares ativados, que formam a família de proteínas que impedem a ação degradativa das enzimas sobre o excesso de matriz extracelular, que está sendo formada. A ação continuada do agente lesivo (álcool, por exemplo) permite, portanto, a acumulação progressiva e lenta do colágeno, ao longo do tempo; o excesso de colágeno, que persiste sem ser degradado, vai adquirindo pontes inter e intramoleculares de lisina, através da ação de uma lisiloxidase, que aumenta sua resistência à degradação (ANDRADE et al., 2005) (figura 7).

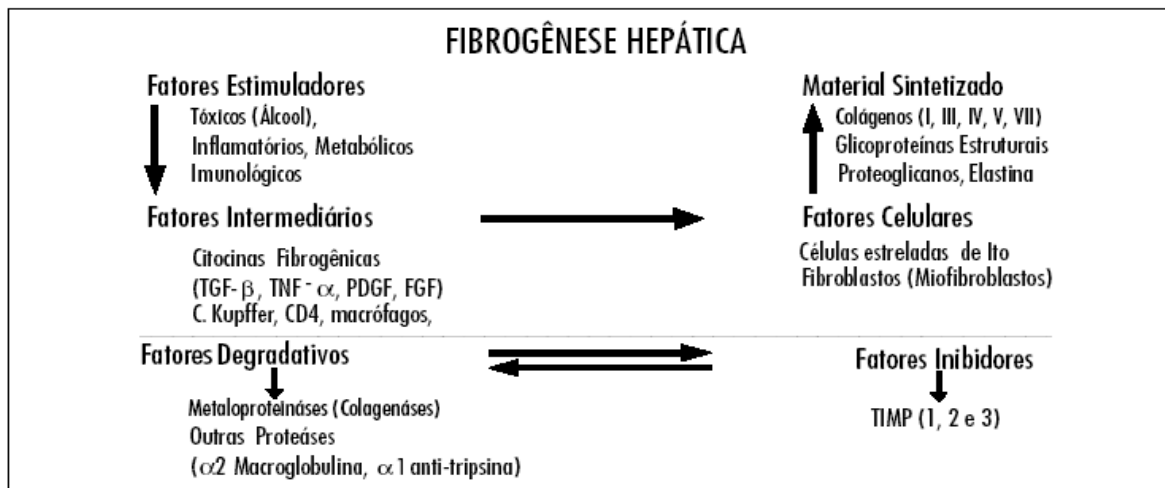


Figura 7: Processo de formação da fibrogênese hepática

Fonte: Andrade et al., 2005

3 BIÓPSIA HEPÁTICA E MARCADORES BIOLÓGICOS

A determinação da natureza da lesão, do estadiamento da hepatopatia e do grau de lesão hepática (necrose, inflamação e fibrose) é melhor estimada pela biópsia hepática, que tem assumido importância crescente com relação ao estadiamento e ao prognóstico da doença, principalmente como forma de acompanhamento dos pacientes submetidos a tratamento específico (GISH et al., 2001).

Em pacientes com hepatite crônica, a biópsia hepática é útil na determinação da natureza e extensão da lesão hepática, e na determinação da intensidade do processo inflamatório; é importante também para caracterizar os tipos de células inflamatórias envolvidos, os antígenos virais intra-hepáticos e sua localização assim como a distribuição de fibrose e o tipo de colágeno depositado. Conseqüentemente, a biópsia hepática fornece informações relevantes para o diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento (WHITMIRE et al., 1985).

O estágio da hepatopatia é fundamental para determinar o tratamento e a sua duração (POYNARD et al., 2003).

Entretanto, a biópsia hepática é um procedimento invasivo e, portanto, pode apresentar complicações. Após o procedimento, 30% dos pacientes sentem dor, 0,3% têm complicações graves (incluindo sangramento) e 0,03% morrem. Além disso, existe o alto custo do exame; problemas relacionados à amostragem geram variação na interpretação do estágio da hepatopatia (LICHTINGGHAGEN BAHR, 2004). Variações entre observadores podem ser observadas em até 20% dos casos; o tamanho da amostra e a fragmentação da mesma também influenciam no estabelecimento do parecer final (SCOTT et al., 2003).

Existem vários sistemas para graduar e estabelecer o estágio da hepatite crônica. O mais utilizado é o Metavir (POYNARD et al., 1997).

Estágio	Descrição
F0	Ausência de fibrose
F1	Fibrose portal com ou sem emissão de septos incompletos
F2	Fibrose portal com ocasionais septos fibrosos porta-porta
F3	Fibrose portal com numerosos septos fibrosos porta-porta e porta-centrolobular, sem cirrose
F4	Cirrose

Quadro 1: Classificação histológica de fibrose hepática-modelo Metavir. Fonte: Bedossa, 2003

Em conformidade com os protocolos e diretrizes atuais de tratamento da hepatite C, os pacientes sem fibrose ou com fibrose mínima apresentam evolução mais lenta da hepatopatia e o tratamento pode ser postergado com segurança. O tratamento deve ser considerado para aqueles pacientes com fibrose a partir de F2, em razão do risco de evolução para cirrose (EASL, 2007).

Bataller et al. (2005), classificam os testes não invasivos de fibrose hepática em dois grupos: testes simples ou indiretos e testes complexos ou diretos. Os testes simples são os de menor custo, de técnica fácil ou automatizada e geralmente são realizados no seguimento dos pacientes com hepatite crônica C, sendo chamados testes indiretos por não avaliarem diretamente os produtos da MEC. Os testes complexos são mais caros, tecnicamente mais difíceis de serem realizados e não são utilizados de rotina. São testes que investigam diretamente os produtos ou derivados da MEC.

Entre os testes simples, os mais estudados são a contagem de plaquetas, a relação AST/ALT e outros marcadores séricos (SCHMIDT *et al.*, 1985).

A redução de plaquetas no sangue periférico é um indicador do estágio de fibrose hepática, especialmente em pacientes portadores de hepatite crônica C (SCHMIDT *et al.*, 1985); o valor absoluto das plaquetas em sangue periférico tem sido amplamente investigado como índice preditivo positivo para o estabelecimento da fibrogênese (ONO, *et al.*, 1999). A dosagem sérica das enzimas hepáticas AST e ALT tem sido utilizada para a investigação e monitoramento das doenças hepáticas (KARMEN *et al.* 1995). A despeito do grande interesse em correlacionar os níveis das aminotransferases com o estágio de fibrose, diversos estudos têm comprovado que estes exames, isoladamente, não são adequados para avaliar a fibrose hepática (LUO *et al.*, 1998; PERSICO *et al.*, 1993).

Outros testes simples são o APRI ou relação AST/plaquetas (WAI, et al., 2003) e o índice de Forns que é determinado através de uma fórmula que utiliza o número de plaquetas, a dosagem de g-glutamyl transferase, a idade do paciente e a dosagem de colesterol (FORNS, et al., 2002). Apesar de demonstrarem excelente valor preditivo para fibrose leve e cirrose e relação risco/benefício superior à biópsia, esses testes ainda apresentam resultados falso-negativos e positivos e encontram dificuldades em diagnosticar níveis intermediários de fibrose (POYNARD et al., 2004, 2005).

Dentre os testes complexos, os mais estudados são a dosagem de ácido hialurônico (AH), de metaloproteinases (MMP) e seus inibidores (TIMP), de alfa-2 macroglobulina (A2M), de haptoglobina, de colágeno tipo IV (C-IV), de pró-colágeno tipo III (PC-III) e seu peptídeo n-terminal (PPIII), laminina (LN), além de modelos matemáticos que incluem, simultaneamente, alguns desses testes (POYNARD et al., 2004, 2005).

Outros marcadores bioquímicos séricos ou a sua combinação estão sendo testados em diferentes países, inclusive no Brasil. Os mais estudados e testados são o FibroTest e ActiTest. O FibroTest faz a análise de um conjunto de dados bioquímicos sanguíneos usando a combinação de 5 marcadores (a-2 macroglobulina, g-glutamyl transferase, haptoglobulina, apolipoproteína A1 e bilirrubina total) para avaliar o estágio da fibrose, e o ActiTest usa a combinação dos mesmos 5 marcadores do FibroTest incluindo a alanina amino transferase (ALT) para avaliar o grau de atividade necro-inflamatória hepática. A haptoglobina é uma proteína diretamente ligada à hemoglobina livre no sangue e se encontra reduzida na presença de fibrose; a apolipoproteína A-I é o principal constituinte proteico das lipoproteínas de alta densidade do sangue; é uma proteína sintetizada pelo fígado, que transporta o colesterol; a alfa-2 macroglobulina é uma das 500 proteínas identificáveis no plasma humano, sendo esta uma proteína inflamatória sintetizada pelo fígado; a bilirrubina total é o pigmento predominante na bile, resultante da degradação da hemoglobina; a gama glutamil transpeptidase (GGT) é uma enzima presente nas membranas celulares, sintetizada nos hepatócitos e aumentada com a deposição de fibrose (POYNARD et al., 2002).

O FibroScan (FSC) é outro sistema não invasivo que avalia a fibrose hepática através da ultrassonografia de execução rápida e fácil, muito bem aceito pelos

doentes. Tem boa acuidade para avaliar a fibrose e apresenta utilidade clínica para o diagnóstico de cirrose (MARINHO et al., 2007).

Deve-se ressaltar que nenhum destes testes possui ainda um valor de prognóstico efetivo para substituir a biópsia hepática. Consequentemente, o exame histopatológico do fígado continua sendo o “padrão-ouro” para a avaliação da fibrose hepática (DIENTAG; MCHUTCHISON, 2006).

4 O FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR β 1 (TGF- β 1)

4.1 ESTRUTURA GÊNICA, PROTEÍNA, RECEPTOR E EXPRESSÃO DO GENE *TGF β 1*

O fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1) tem ação reguladora de atividades celulares com múltiplos efeitos biológicos. O TGF- β 1 foi identificado por De Larco e Todaro (1978) como um produto de células transformadas pelo vírus de sarcoma murino, no entanto, atualmente sabe-se que é sintetizado por diferentes tipos celulares incluindo linfócitos, macrófagos, fibroblastos, miócitos, condrócitos, astrócitos, células epiteliais, células renais, células de placenta e plaquetas, assim como por algumas células tumorais (LYONS *et al.*, 1990; CUNHA *et al.*, 1992).

Na década de 1990, o desenvolvimento e análise do TGF- β 1 em camundongos sedimentou o papel central desta citocina na inibição da inflamação e doenças autoimunes, estimulando um interesse crescente nesta citocina (SHULL, 1992; KULKARNI, 1993).

Nos anos 2000, o desenvolvimento de modelos experimentais utilizando ratos com inativação da sinalização célula tipo-específica do TGF- β , revelaram sua rede regulatória *in vivo* (GORELIK *et al.*, 2000).

Os membros da superfamília do TGF- β são reguladores multifuncionais da proliferação e diferenciação de uma ampla variedade de tipos celulares. As isoformas TGF- β 1, 2 e 3 compartilham uma alta homologia de sequência de aminoácidos, têm distintos padrões de expressão e suas funções são mediadas pelos mesmos receptores, e são encontradas nos tecidos de mamíferos (MASSAGUE *et al.*, 1990; SPORN *et al.*, 1992; GOVINDEN ;BHOOLA , 2003).

As isoformas são reguladas por genes específicos localizados nos cromossomos humanos nos *loci* 19q13 mostrado na figura 1, 1q41 e 14q24, respectivamente (FUJII *et al.*, 1986, GOVINDEN ;BHOOLA , 2003).

Dessa família, o TGF- β 1 é o membro mais amplamente estudado e pode atuar como um mitôgeno indireto sobre células mesenquimais ou como estimulador da síntese de proteínas de matriz extracelular. No entanto, é também um potente inibidor da proliferação de células epiteliais, endoteliais, linfoides e mieloides. (ZARAGOZA, 2001). O seu efeito inibidor *in vitro* está ausente em muitas linhagens celulares neoplásicas transformadas, incluindo células de carcinoma, de câncer de mama e de carcinoma de pulmão, onde estão alterados os mecanismos de regulação celular induzidos pelo TGF- β 1 (SHIPLEY *et al.*,1986; KNABBE *et al.*,1987; MASUI *et al.*,1996).

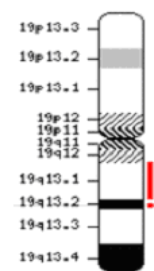


Figura 8: Localização do gene *TGFB1* no cromossomo 19

Fonte: (FUJII *et al.* 1986)

O TGF- β 1 é a isoforma mais importante no reparo tecidual e na imunoregulação, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo. As três isoformas humanas do TGF- β são sintetizadas como moléculas precursoras que são processadas proteoliticamente para a produção das formas ativas do TGF- β , formadas de duas cadeias idênticas de polipeptídeos que consistem de 112 aminoácidos na porção C-terminal da proteína precursora onde a sequência de aminoácidos da forma ativa nos mamíferos é altamente conservada (LETTERIO; ROBERTS,1997).

Esta forma ativa, que corresponde a um homodímero de 24k Da, está associada de maneira não-covalente a uma proteína chamada LAP (Peptídeo Associado à Latência) importante para que o TGF- β 1 seja secretado de maneira eficiente, impedindo que ocorram ligações a receptores não-específicos nas superfícies celulares, e também para manter sua disponibilidade imediata em um grande reservatório extracelular (GOVINDEN ; BHOOLA , 2003).

Os receptores para TGF- β 1 estão amplamente distribuídos na membrana, são expressos pela maioria dos tipos celulares e foram identificados três tipos, os quais foram nomeados tipos I, II e III, baseados nos seus tamanhos aproximados de 53, 70 a 80, e 200 a 300 kDa, respectivamente (MASSAGUE, 1990; LIN ;LODISH, 1993; ATTISANO *et al.*, 1994).

Os receptores do tipo I e II são proteínas transmembrânicas, com uma região extracelular relativamente pequena, rica em cisteína, uma hélice transmembrânica hidrofóbica e um domínio citoplasmático com atividade serina-treonina quinase. O receptor tipo II, que tem constitutivamente atividade de quinase, fosforila e ativa o receptor tipo I, que então propaga os sinais para os substratos intracelulares. Muitas células também expressam o receptor tipo III, também conhecido como betaglicano, que é um proteoglicano com um grande domínio extracelular, um único domínio transmembrânico e uma curta cauda citoplasmática sem motivo conhecido. (MASSAGUE, 1998; BROWN *et al.*, 1999).

O TGF- β 2 e TGF- β 3 são importantes reguladores da diferenciação celular e afetam o desenvolvimento e a embriogênese, enquanto os efeitos do TGF- β 1 estão mais relacionados como processo da inflamação.

4.1.1 Biossíntese e função biológica do TGF- β 1

O TGF- β 1 é uma molécula regulatória com efeitos pleiotrópicos na proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular, afetando muitos processos biológicos, que incluem o desenvolvimento, a carcinogênese, fibrose, cicatrização de feridas e respostas imunológicas (BLOBE *et al.*, 2000).

Esta citocina foi denominada como TGF- β 1 por sua função de induzir reversivelmente a transformação e inibir a proliferação de fibroblastos normais, mas atualmente já tem sido possível isolá-lo de fontes como o glioblastoma humano e de medula óssea bovina (ZARAGOZA, 2001).

O TGF- β 1 inibe a resposta sistêmica, mas estimula a resposta inflamatória local, e pode suprimir a proliferação e diferenciação dos linfócitos T, linfócitos B e monócitos. (MASSAGUE, 1990). Ainda inibe a síntese de IFN- γ , IL-2, IL-3, GM-CSF e TNF- α induzida por mitógenos, suprime a hematopoese pela inibição da célula tronco e regula os receptores para SCF, IL-3 e GM-CFS nas células hematopoéticas (YELEVARTHI&HUNT, 1993). No sítio inflamatório, induz a quimiotaxia de neutrófilos, monócitos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos (REIBMAN *et al.*, 1991; WAHL *et al.*, 1993), ativando essas células a produzirem citocinas inflamatórias (IL-1,

TNF, IL-6) e aumentando a adesão leucocitária à parede dos vasos e matriz extracelular (WAHL, 1992).

O TGF- β 1 é sintetizado principalmente por monócitos e linfócitos T CD4+ que se diferenciam em células Th3. (GORELIK et al., 2002). Pode inibir ou estimular o crescimento de diversas células, estimular a angiogênese e sintetizar proteínas da matriz extracelular (colágeno) (TAYLOR et al. 2006). O TGF- β 1 é um potente desativador de macrófagos, controlando o processo inflamatório e um indutor da produção de anticorpos IgA (STAVNEZER,1995). No fígado, agrava a perda de hepatócitos, aumenta a resposta fibrogênica e inibe a expressão de RNAm de perforinas (WANG et al., 2005). De acordo com Nelson et al. (1997), esta citocina está aumentada na hepatite crônica C e parece estar envolvida na progressão da fibrose, o que não é aceito por Roulot et al. (1995). Em outro estudo, é sugerido que esta citocina pode contribuir para a apoptose (TAYLOR et al., 2006).

4.1.2 Polimorfismos em genes de citocinas

Polimorfismo genético é a coexistência de formas alélicas múltiplas para um mesmo locus gênico, como componentes estáveis, presentes em pelo menos 1% da população (SYVANEN, 2001). Os genes de citocinas são polimórficos em sítios específicos e certas mutações localizadas em regiões não codificantes ou reguladoras estão associadas com baixa ou alta produção de determinada citocina. (WILSON et al.,1997; BIDWELL et al., 1999; KEEN, 2002; TABOR, 2002). Além disso, há evidências de que a produção de citocinas é dependente da ativação transcricional dos seus genes (PRAVICA *et al.* 1999).

Até o momento foram identificados diversos polimorfismos em genes de diferentes citocinas assim como em seus receptores (BIDWELL et al., 1999). Tais mutações, ao se perpetuarem por seleção adaptativa, geram possibilidades de variações alélicas com frequências definidas para os diversos grupos populacionais apresentando variação racial e geográfica (DEAN; CARRINGTON *et al.*, 2002).

Têm sido utilizadas diferentes abordagens no estudo destes polimorfismos. Os estudos do tipo caso-controle comparam a frequência do polimorfismo de uma citocina entre um grupo de indivíduos que apresentam a doença e outro grupo sem a

doença, e tem como objetivo identificar marcadores de proteção ou susceptibilidade para uma dada condição mórbida. Outra abordagem realizada é a comparação direta do genótipo da citocina dos indivíduos com a respectiva doença e o aspecto clínico da mesma. Estudos realizados *in vitro* permitem verificar os níveis de RNA de citocinas ou dos seus receptores, possibilitando identificar sua maior ou menor expressão. Os estudos de família permitem obter informações da segregação da doença (BIDWELL *et al.*, 1999; GAMBARO *et al.*, 2000).

4.1.3 Polimorfismo e níveis de expressão do gene *TGFB1*

A produção do TGF- β 1 está sob controle genético e a variação individual nos níveis de produção do mesmo é influenciada pela existência de variações genéticas. A expressão do TGF- β 1 é regulada em resposta a uma variedade de estímulos externos, nos níveis transcricional e pós-transcricional, dependendo do tipo celular e da isoforma específica (PERREY *et al.*, 1998).

Até o momento foram identificados cinco tipos de variações polimórficas no gene *TGFB1*: duas na região do promotor, nas posições -800 (G/A) e -509 (C/T); uma na posição +72 (inserção de C), em uma região não transcrita; e duas na sequência sinal no primeiro éxon, nas posições +869 (T/C) e +915 (G/C) (PERREY *et al.*, 1998).

Ao estudar uma mutação do TGF- β 1 na posição +869 observou uma mudança do aminoácido leucina para prolina no códon 10, enquanto a da posição +915 altera o códon 25, substituindo a arginina para prolina, conforme apresentado na figura 2. Um indivíduo será considerado alta produtora de TGF- β 1 se no códon 10 determinar o aminoácido leucina, e o códon 25 a arginina. Ao contrário, para ser baixa produtora, deverá traduzir para prolina em ambos os códons (figura 3) (PERREY *et al.*, 1998).

<i>TFGB1</i>		
Posição	+869	+915
Códon	10	25
SNP	T ⇒ C	G ⇒ C
Aa	Leucina ⇒ Prolina	Arginina ⇒ Prolina

Figura 9: SNPs e aminoácidos nas posições +869 e +915 do gene *TFGB1*.

Fonte: Perrey et al., 1998

Awad et al. (1998), também estudaram a relação entre as variantes polimórficas de TGF- β 1 e a sua produção por leucócitos de sangue periférico de 34 indivíduos saudáveis. Verificaram que os indivíduos com o genótipo homozigoto arginina/arginina no códon 25 tiveram uma média de produção de TGF- β 1 maior que os de genótipo prolina/arginina.

<i>TFGB1</i>		
Genótipos	Fenótipos	Haplótipos
<i>TG/TG</i>	Alto	<i>Leu/Leu Arg/Arg</i>
<i>TG/CG</i>	Alto	<i>Leu/Pro Arg/Arg</i>
<i>TG/CC</i>	Interm.	<i>Leu/Pro Arg/Pro</i>
<i>CG/CG</i>	Interm.	<i>Pro/Pro Arg/Arg</i>
<i>TG/TC</i>	Interm.	<i>Leu/Leu Arg/Pro</i>
<i>CG/CC</i>	Baixo	<i>Pro/Pro Arg/Pro</i>
<i>CC/CC</i>	Baixo	<i>Pro/Pro Pro/Pro</i>
<i>TC/TC</i>	Baixo	<i>Leu/Leu Pro/Pro</i>
<i>TC/CC</i>	Baixo	<i>Leu/Pro Pro/Pro</i>

Figura 10: Genótipos, haplótipos e fenótipos para produção de TGF- β 1 nas posições +869 e +915

Fonte: Perrey et al., 1998

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível associação de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 e o estágio da fibrose hepática em indivíduos com hepatite crônica C.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 (10C/T, 25C/G) em uma amostra de indivíduos com hepatite crônica C com diferentes estágios de fibrose;
2. Comparar as frequências observadas dos polimorfismos genéticos entre os grupos de pacientes com hepatite crônica C conforme estágio de fibrose hepática definidos pela classificação METAVIR;
3. Comparar as frequências observadas dos polimorfismos genéticos entre os grupos de pacientes com hepatite crônica C e controles sadios.

L6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O estudo teve como população de referência os pacientes com diagnóstico de hepatite crônica C atendidos no ambulatório de Hepatologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (C-HUPES), Hospital São Rafael (HSR) e Hospital Aliança, no período de abril de 2007 a dezembro de 2008. Todos estes pacientes foram submetidos à biópsia hepática.

Procedeu-se a revisão histopatológica de todas as biópsias hepáticas por único médico anatomopatologista.

O grupo de indivíduos controles foi constituído de 210 doadores voluntários de sangue de uma amostra histórica.

6.2 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de caso controle retrospectivo não pareado.

6.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com infecção crônica pelo VHC:

- Idade \geq 18 anos;
- Submetidos à biópsia hepática previamente ao tratamento antiviral;
- Submetidos ao tratamento antiviral com interferon / ribavirina e que obtiveram resposta sustentada ao tratamento, que não obtiveram resposta sustentada ao tratamento ou recidivaram a infecção;
- Ingestão de bebida alcoólica \leq 40g de etanol/dia para mulheres e \leq 60g/dia de etanol/dia para homens

- Assinatura do termo de consentimento livre e pré-esclarecido.

6.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Co-infecção com vírus da hepatite B ou HIV.

Para inclusão no estudo após assinatura do termo de consentimento livre e pré-esclarecido (vide anexo), os pacientes foram entrevistados (ficha clínica) (vide anexo) e submetidos à coleta de sangue. Os prontuários foram revisados para confirmação dos dados clínicos e obtenção de informações no período da realização do tratamento antiviral.

6.5 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Estudo realizado conforme aspectos éticos e bioéticos de acordo com as normas vigentes, sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia, conforme Parecer-Resolução número 16/2007 (vide anexo). Folha de Rosto – CONEP número 111755 (vide anexo).

6.6 AVALIAÇÃO DA HEPATITE CRÔNICA C E RESPOSTA AO TRATAMENTO

Os portadores do vírus da hepatite C foram caracterizados pela positividade no soro do HCV-RNA qualitativo ou quantitativo por um período mínimo de seis meses. Todos os pacientes incluídos no estudo tinham exame clínico e exames laboratoriais utilizados para o acompanhamento dos portadores de infecção pelo vírus da hepatite (plaquetas, hemograma, Alanino-aminotransferase – ALT, Aspartato-aminotransferase – AST, Tempo de Protrombina, Proteínas totais, Albumina, Globulina, Fosfatase Alcalina, Gama – Glutamiltransferase – GGT), incluindo HCV-RNA e genotipagem do vírus C.

Os pacientes foram questionados quanto à existência de fatores de risco para aquisição da infecção pelo vírus da hepatite C (hemotransfusão, uso de drogas endovenosas ou inalatórias, compartilhamento de seringas, tatuagens e tratamento dentário sem materiais descartáveis, entre outros), além da presença de outros fatores que pudessem contribuir para lesão hepática (alcoolismo, esteato-hepatite não alcoólica, doenças metabólicas, etc.).

Todos os pacientes tinham sido previamente submetidos à biópsia hepática a fim de ser avaliada a indicação de tratamento ou re-tratamento. Procedeu-se a revisão histopatológica de todas as biópsias hepáticas por único médico anatomo-patologista.

6.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O material, emblocado em parafina, foi cortado a uma espessura de 5 μ , corado em Hematoxilina-Eosina (H&E), Picrossirius para avaliação da matriz conjuntiva colagênica, impregnação pela prata para fibras reticulínicas, PAS, PAS com diastase e Perls para avaliação de sobrecarga de ferro. A amostra foi considerada suficiente quando continha pelo menos oito espaços-porta.

A fibrose foi avaliada conforme a classificação METAVIR (BEDOSSA & POYNARD,1996) em: F0= sem fibrose (Figura 11a); F1= fibrose portal com ou sem emissão de septos incompletos (Figura 11b); F2= fibrose portal com ocasionais septos fibrosos porta-porta (Figura 11c); F3= fibrose portal com numerosos septos fibrosos porta-porta e porta-centrolobular, sem cirrose (Figura 11d) e F4= cirrose (Figura 11e). A atividade necro-inflamatória foi classificada em: A0= sem atividade histológica; A1= atividade histológica leve; A2= atividade histológica moderada; A3= atividade histológica severa.

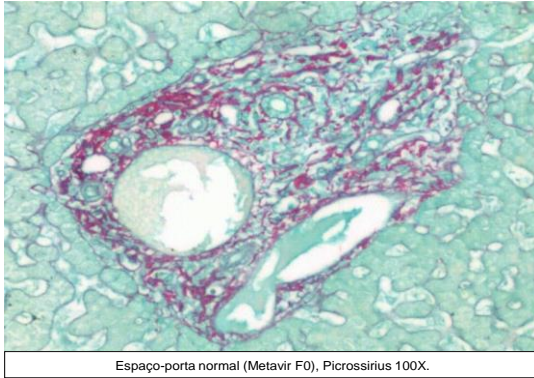


Figura 11a

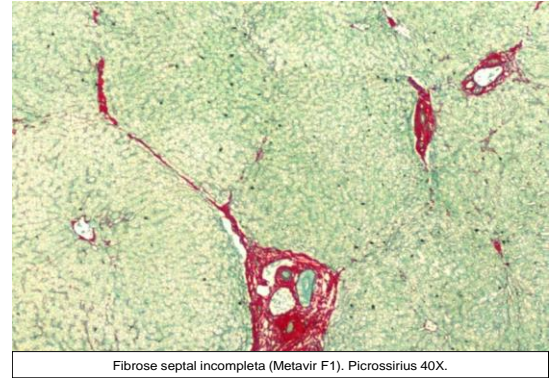


Figura 11b

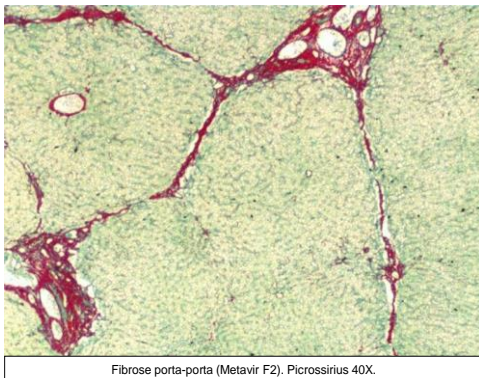


Figura 11c

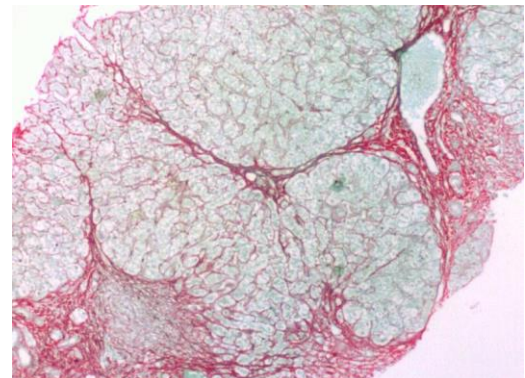


Figura 11d

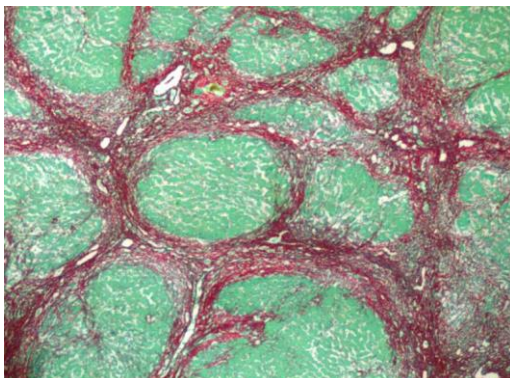


Figura 11e

Figura 11: F0= sem fibrose (Figura 11a); F1= fibrose portal com ou sem emissão de septos incompletos (Figura 11b); F2= fibrose portal com ocasionais septos fibrosos porta-porta (Figura 11c); F3= fibrose portal com numerosos septos fibrosos porta-porta e porta-centrolobular, sem cirrose (Figura 11d) e F4= cirrose (Figura 11e)

Após avaliação histopatológica, foram formados dois grupos de acordo com os estágios de fibrose:

- Grupo \leq F2 (pacientes com estágio de fibrose hepática leve a moderada)
- Grupo F3 e F4 (pacientes com estágio de fibrose hepática acentuada)

6.8 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA FENOTÍPICA

A classificação morfológica fenotípica foi realizada por dois examinadores previamente treinados para realizar esta análise conforme classificação proposta por Krieger *et al.* (1965). Foram consideradas as seguintes características:

- Cor da pele da região interna do braço ou abdome: branca, marrom ou preta.
- Textura de cabelo: liso, ondulado ou crespo.
- Nariz: achatado, médio ou afilado (fino).
- Formato dos lábios: finos, médios ou grossos.
- Cor do Cabelo: loiro, castanho, ruivo ou preto.
- Cor dos Olhos: claro ou escuro.

A determinação do formato do nariz e dos lábios foi feita por comparação com os tipos descritos no atlas das raças humanas (THOMAS-DOMENECH; PADILLA-BOLIVAR, 1965).

Conforme características morfológicas avaliadas, os indivíduos de pele branca, cabelo liso ou ondulado, nariz afilado, arrebitado ou mediano, lábios finos ou medianos, independente da cor do cabelo ou pigmentação dos olhos, foram classificados como brancos. Os indivíduos de pele preta, cabelo crespo, olhos escuros e lábios grossos foram classificados como negros. Os demais participantes foram classificados como mulatos em 3 categorias a depender da quantidade de características compartilhadas (mulatos claros, mulatos médios ou mulatos escuros) (AZEVEDO, 1979).

6.9 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de células mononucleares do sangue periférico, separadas após a coleta de 5 mL sangue com tubo *vacuntainer* (Labnew Ltda. SP – BRA). A extração foi realizada com a utilização do kit INVITROGEN de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram conservadas em freezer a menos 20°C.

6.10 GENOTIPAGEM DE TGF- β 1

Foi usado o kit para genotipagem de citocinas da One Lambda Incorporation - "Cytokine Genotyping Tray", contendo, tubo controle negativo e 4 tubos com dois pares de iniciadores: um par com sequências específicas que amplificam seletivamente regiões regulatórias polimórficas dentro de genes que codificam *TGF- β 1* (10C/T, 25C/G); o segundo par de iniciadores amplifica uma sequência controle.

A mistura para as reações de PCR (*Mix*) foi preparada conforme as instruções do fabricante: D-Mix (solução fornecida pelo fabricante, contendo dNTPs, sal sódico de vermelho de fenol, sacarose, gelatina, KCl, MgCl₂.6H₂O, Tris.HCl), ao qual foi adicionado DNA teste e Taq polimerase. Após misturar os reagentes com auxílio de um agitador de tubos, 10 μ L do *Mix* foram distribuídos em cada um dos tubos, exceto no tubo controle negativo, ao qual tinha sido adicionado o *Mix* sem DNA teste. Os tubos foram, então, selados com filme apropriado (termo-resistente, fornecido pelo fabricante) e colocados no termociclador, o qual foi previamente programado com os seguintes parâmetros: um ciclo de 96°C por 130 segundos seguidos de 63°C por 60 segundos; nove ciclos de 96°C por 10 segundos e 63°C por 60 segundos; vinte ciclos de 96°C por 10 segundos, 59°C por 50 segundos e 72°C por 30 segundos; ciclo final de 4°C.

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O gel de agarose 2,5% foi preparado com 0,75g de agarose (Invitrogen), 30 mL de tampão TBE1X (Tris-Borato 89mM; EDTA 2mM pH 8.0) e 0,05 μ g/mL de brometo de etídio. A cuba de eletroforese utilizada foi desenvolvida pela One Lambda de forma a permitir a análise concomitante de 96 produtos de PCR em um curto tempo de migração; assim, em cada gel, foram analisados os resultados de PCR de seis diferentes amostras de DNA (16 reações para cada amostra). O gel foi recoberto com 10,0 mL de TBE 1X contendo 0,05 μ g/mL de brometo de etídio e todo o conteúdo de cada reação de PCR (10 μ L) foi transferido para o poço correspondente. A corrida eletroforética foi então realizada a 120-130V (~30 mA) durante 4 a 5 minutos, ou até

que o corante (vermelho de fenol) migrasse cerca de dois terços da distância entre duas linhas de poços no gel.

A interpretação dos resultados de PCR-SSP é baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA específico amplificado. Desde que a amplificação durante a PCR pode ser afetada por vários fatores (erro de pipetagem, baixa qualidade do DNA, presença de inibidores, etc.) um par de iniciadores-controle é incluído em cada reação de PCR. O par de iniciadores-controle amplifica uma região conservada do gene da β -globina humana, o qual está presente em todas as amostras de DNA humano e é usado para verificar a integridade da reação de PCR. Na presença de uma banda positiva de tipagem (amplificação de uma sequência específica de um alelo da citocina), o produto dos iniciadores-controle pode ser mais fraco ou ausente devido à diferença na concentração e temperatura de hibridização entre o par de iniciadores específicos e o par de iniciadores do controle interno. Os fragmentos de DNA amplificado do par de iniciadores específicos da citocina foram menores do que o produto do par de iniciadores do controle interno, mas maiores que a banda do par de iniciadores quando não incorporados. Desta forma a reação positiva para um alelo ou grupo de alelos de citocina específico foi visualizada no gel como um fragmento de DNA amplificado entre a banda produto do controle interno e a banda de iniciadores não incorporados.

Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados usando luz ultravioleta e fotografados com o auxílio de um transluminador, conforme a figura 1. Os resultados foram interpretados usando mapas das placas de genotipagem de citocinas fornecidas pelo fabricante do kit de PCR (vide anexo).

H G F E D C B A

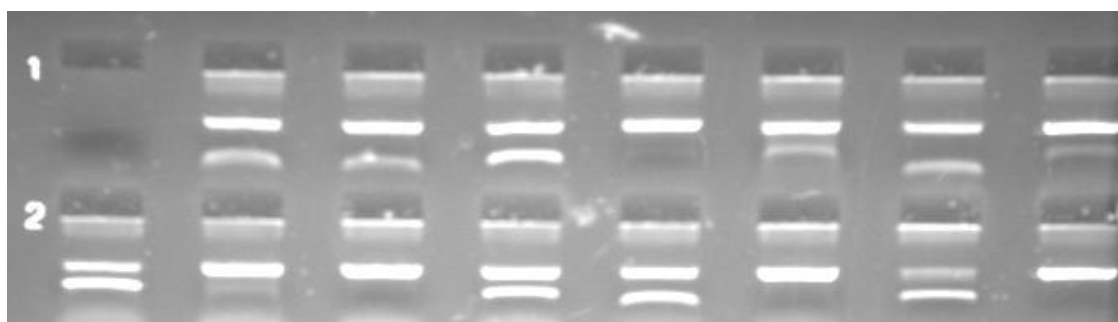


Figura 12: - Imagem de gel de agarose a 2,5% mostrando a genotipagem de um indivíduo TGF- β 1 T/T e G/G (1: E-B); controle negativo(1:H).

6.10.1 Região amplificada

Foram analisadas mutações de único nucleotídeo no gene da citocina *TGFB1* (Quadro 2).

Foi realizada a amplificação de duas regiões, uma de 175 pb no códon 10 do gene, na qual há substituição de uma timina (T) por uma citosina (C), e outra de 125 pb no códon 25, onde ocorre a substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C). Estas mutações resultam em nove genótipos que correspondem aos fenótipos previstos: alto, intermediário e baixo produtor da citocina.

Gene	Posição de Polimorfismos	Alelos/Haplótipos	Genótipos/Haplótipos	Fenótipos previstos de produção de citocina
<i>TGFB1</i>	Códons 10 (+869) 25 (+915)	T,C e C,G	T/T G/G	Alto
			T/C G/G	Alto
			T/C G/C	Intermediário
			C/C G/G	Intermediário
			T/T G/C	Intermediário
			C/C G/C	Baixo
			C/C C/C	Baixo
			T/T C/C	Baixo
			T/C C/C	Baixo

Quadro 2: Características dos Polimorfismos nos Genes da Citocina *TGFB1*
Modificado de Barrett et al. (2003)

6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados testes bicaudais, o valor α de 0,05 e intervalo de confiança de 95%. Para descrever a amostra do estudo, foram utilizadas proporções para variáveis categóricas, a mediana e a média, mais desvio padrão para variáveis contínuas. A significância entre as diferenças encontradas para variáveis categóricas foram calculadas com os testes Chi-quadrado e teste exato de Fisher. As variáveis

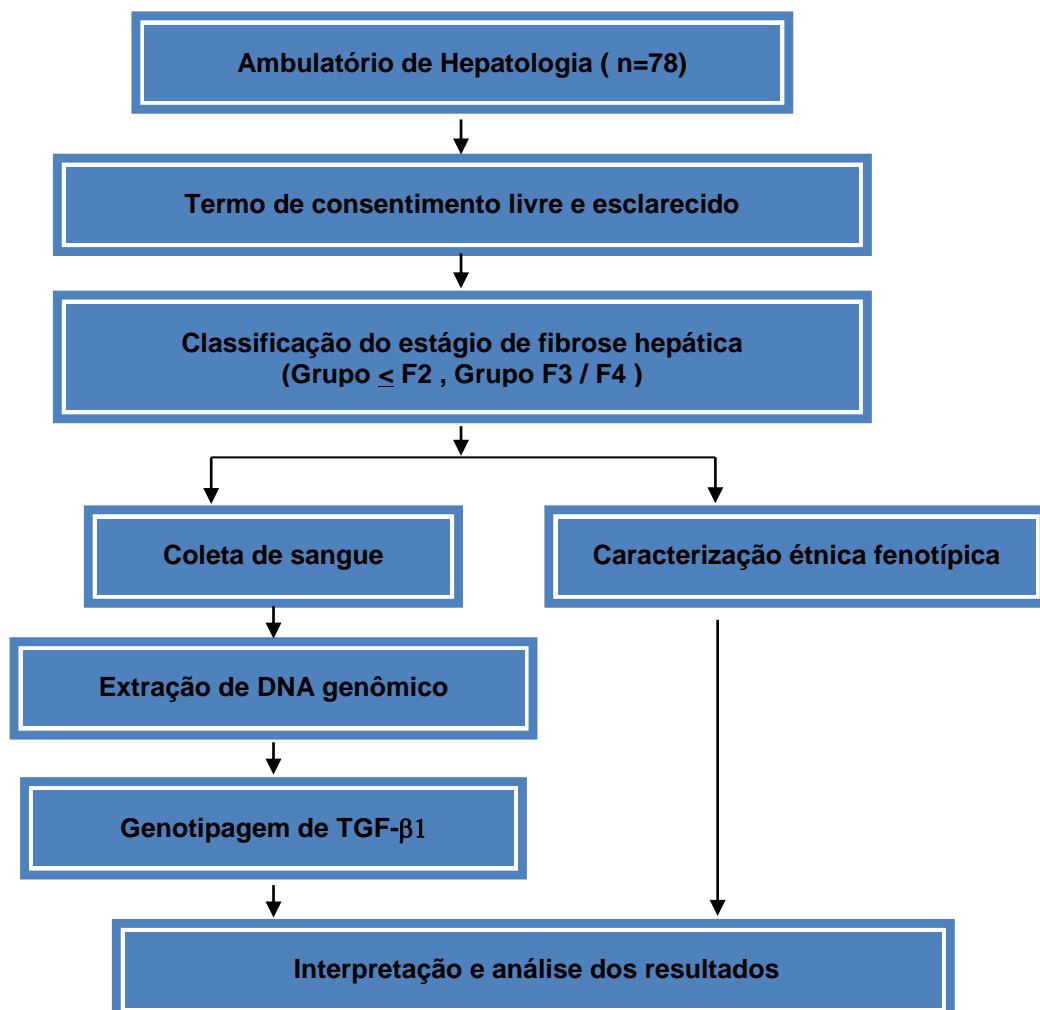
contínuas foram comparadas pelo teste t de Student para variáveis paramétricas e o teste de Mann-Whitney para as distribuições não paramétricas.

A frequência genotípica foi obtida com a contagem direta dos alelos identificados no PCR. A frequência alélica foi calculada pela divisão do número de alelos encontrados pelo número total de alelos analisados por loco.

Para os fenótipos previstos de produção de TGF- β 1 foi utilizado o padrão do fabricante do kit de genotipagem que seguem os descritos na literatura (CAMBIEN *et al.*, 1996; AVAD *et al.*, 1998).

A comparação entre as frequências alélicas e genotípicas, entre os diferentes grupos, foi feita com o teste exato de Fisher, sendo estabelecido o nível de significância $p < 0,05$. O programa "GraphPad In stat 3.Inl" foi utilizado nas análises.

6.12 DELINEAMENTO DO ESTUDO



7 RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

No período compreendido entre abril de 2007 e dezembro de 2008 foram incluídos no estudo 78 pacientes com diagnóstico de hepatite crônica C, submetidos a biópsia hepática e previamente tratados com terapia antiviral combinada com interferon e ribavirina. A idade média dos indivíduos desta amostra foi de 50,5 anos \pm 9,0 anos, com mediana de 52 anos, sendo também observada a maior prevalência do sexo masculino, com 53 (67,9 %) indivíduos do sexo masculino e 25 (32,1 %) do sexo feminino.

Quanto à resposta ao tratamento antiviral com interferon e ribavirina, haviam 55 (64,5 %) não respondedores, 6 (7,9 %) recidivantes e 21 (27,6 %) indivíduos que alcançaram a resposta virológica sustentada.

Foram obtidas informações sobre o grau de instrução dos indivíduos, sendo observado que 25 (34,2 %) eram analfabetos e/ou estudaram até o ensino médio incompleto e 48 (65,8 %) deles estudaram do ensino médio completo ao nível superior e 5 não informaram sobre a escolaridade.

Quanto ao uso de bebida alcoólica, 53 (71,6%) indivíduos referiram uso, entretanto obedeciam aos critérios de inclusão, com ingestão média de bebida alcoólica inferior a 40g de etanol/dia para mulheres e 60g de etanol/dia para homens.

Todos os 78 pacientes foram submetidos à biópsia hepática, sendo avaliado o estágio de fibrose hepática conforme escore METAVIR. Nesta amostra, sendo observado que 42 (53,8%) pacientes tinham estágio de fibrose leve a moderada (METAVIR < F2) e 36 (46,2%) tinham estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4).

O genótipo 1 do VHC foi observado em 71(91%) indivíduos, o genótipo 2 em 1 e o genótipo 3 em 6 indivíduos.

A classificação étnica realizada através da análise morfológica fenotípica, demonstrou maior proporção de mulatos e negros na população estudada com 42 (55,3%), seguida de brancos 34 (44,7%) e 2 indivíduos que não foram classificados.

Em relação à carga viral do vírus C, a média geral observada na amostra estudada foi de $5,85 \pm 0,59 \log^{10}$ UI/mL e com mediana de $5,93 \log^{10}$ UI/mL.

O grupo controle foi constituído por 210 doadores voluntários de sangue de um Serviço de Hemoterapia de Salvador. Todos com sorologias para hepatite C e B e HIV (Anti-HCV, HBSag, Anti HIV I e II negativos, respectivamente).

No grupo controle, haviam 159 indivíduos do sexo masculino com idade média de $38,7 \text{ anos} \pm 10,2 \text{ anos}$ e 51 indivíduos do sexo feminino com idade média de $38,6 \pm 11,1 \text{ anos}$. A classificação dos grupos étnicos conforme a análise morfológica fenotípica demonstrou que no grupo do sexo masculino 8 indivíduos eram fenotipicamente brancos, 151 fenotipicamente mulatos e nenhum indivíduo foi considerado negro.

7.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO E ESTÁGIOS DE FIBROSE HEPÁTICA

A mediana da idade na amostra entre os indivíduos com estágio de fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2) foi de 50,5 anos e em indivíduos com estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4) de 53 anos ($p= 0,98$). Foi observada proporção semelhante de indivíduos de ambos os sexos, com 28 (52,8%) homens e 24 (47,2%) mulheres ($p=0,775$; OR=0,85 e IC=0,32-2,26) (Tabela 3).

Não houve diferença significativa quando analisada a resposta à terapia antiviral combinada entre os indivíduos com diferentes estágios de fibrose hepática. No grupo com fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2), 29 indivíduos foram não respondedores ou recidivantes e apenas 11 obtiveram resposta virológica sustentada; já no grupo fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4), haviam 26 indivíduos não respondedores e 10 alcançaram RVS(($p=1,0$;OR=1,01, IC 95% 0,37-2,78) (Tabela 3).

Foram obtidas informações sobre o grau de instrução dos indivíduos, sendo observado que entre os que eram analfabetos e/ou estudaram até o ensino médio incompleto, 16 (64,0%) apresentavam estágio de fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2) e 9 (36,0%) estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4); já no grupo com maior escolaridade, que estudou do ensino médio completo ao nível superior, 25 (52,1%) indivíduos tinham estágio de fibrose leve a moderada

(METAVIR \leq F2) e 23 (47,9%) estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4). Não houve associação significativa nesta análise ($p=0,44$; OR=1,63; IC=0,59-4,52) (Tabela 3).

Também não foi observada diferença significativa entre o consumo de bebidas alcoólicas entre o grupo de indivíduos com diferentes estágios de fibrose hepática (todos os indivíduos tinham consumo inferior a 40g etanol/dia para mulheres e 60g etanol/dia para homens). No grupo de indivíduos com estágio de fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2), 31(58,5%) referiram consumo, e no grupo de indivíduos com estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4) 22 (41,5%) indivíduos referiram consumo de bebidas alcoólicas ($p=0,52$; OR=0,64; IC= 0,22-1,82 (Tabela 3).

O genótipo 1 do HCV foi observado em 39 (54,9%) indivíduos com estágio de fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2) e em 32 (45,1%) dos indivíduos com estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4); os genótipos 2 e 3 em 3 (42,9%) indivíduos com estágio de fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2) e em 4 (57,1%) indivíduos com estágio de fibrose avançada (METAVIR F3 ou F4). Não houve associação significativa nesta análise ($p=0,697$; OR=1,64; IC=0,34-7,79) (Tabela 3).

De acordo com a classificação étnica através da análise de caracteres morfológicos fenotípicos, no grupo com fibrose leve a moderada (METAVIR \leq F2), haviam 27 (64,3%) indivíduos fenotipicamente mulatos e negros e 15 fenotipicamente brancos. Há entre aqueles com fibrose hepática avançada, 15(35,7%) indivíduos fenotipicamente mulatos ou negros e 19 (55,9%) brancos ($p=0,142$; OR=0,51; IC=0,20-1,32) (Tabela 3).

A atividade inflamatória no tecido hepático, também analisada pela classificação METAVIR, demonstrou que os indivíduos com atividade inflamatória mais intensa (A2-A3) tinham uma chance 3,5 vezes maior de estarem no grupo de fibrose avançada conforme a classificação METAVIR. Por outro lado, também observamos maior proporção de indivíduos com atividade inflamatória mais leve (A0-A1) no grupo com fibrose leve a moderada, ambos analisados pela classificação METAVIR ($p=0,46$; OR=3,54; IC=1,08-11,49) (Tabela 3).

A mediana da carga viral do VHC foi semelhante entre os grupos com diferentes estágios de fibrose, sendo observada mediana de 5,93 em ambos os grupos, com fibrose leve a moderada e avançada ($p=0,61$). Também não houve

diferença estatisticamente significativa entre os níveis de transaminases (AST e ALT) entre os grupos com diferentes estágios de fibrose (tabela 1).

Tabela 1: Dados clínicos e demográficos dos pacientes distribuídos conforme os estágios de fibrose hepática

n=78	Estágios de fibrose		R	IC
	≤F2	F3-F4		
Idade(anos) p (25;75)*	50,5 (42,3; 55,8)	53 (50; 60)	,98	
Sexo				
Masculino N(%)	28 (52,8)	25 (47,2)	,775	,85 0,32-2,26
Feminino n(%)	14 (56,0)	11 (44,0)		
Escolaridade (n=73)				
Analfabeto a médio incompleto	16 (64,0)	9 (36,0)	,44	,63 0,59-4,52
Médio completo a superior	25 (52,1)	23 (47,9)		
Etilismo				
Não	10 (47,6)	11 (52,4)	,52	,64 0,22-1,82
Sim	31 (58,5)	22 (41,5)		
Genótipo				
1	39 (54,9)	32 (45,1)	,697	,64 0,34-7,79
2 e 3	3 (42,9)	4 (57,1)		
Resposta ao tratamento				
NR	26 (53,1)	23 (46,9)	,0	,01 0,37-2,78
REC	3 (50)	3 (50)		
RVS	11 (52,4)	10 (47,6)		
Idade anos (desvio padrao)	48,04 (9,32)	51,96 (7,81)	,112	
Classificação Fenotípica				
Branco	15 (44,1)	19 (55,9)	,142	,51 0,20-1,32
Mulatos e Negros	27 (64,3)	15 (35,7)		
HCVRNA Log ¹⁰ p (25;75)*	5,93 (5,73;6,18)	5,93 (5,61;6,25)	,61	
AST p (25;75)*	64 (40,0;99,0)	86 (51,5;150)	,1	
ALT p (25;75)*	90,0 (62,3;151,0)	120 (79,9;177)	,35	
Atividade inflamatória				
A0-A1	37 (61,7)	23 (38,30)	,046	,54 1,08-11,49
A2-A3	5 (31,3)	11 (68,8)		

p=valor de p (erro alfa=0,05)

OR = odds ratio

IC = intervalo de confiança de 95%

Variáveis contínuas expressas por mediana e interquartis 25% e 75%, m(p25;p75)

7.3 POLIMORFISMOS (CÓDON 10T/C; CÓDON 25G/C) DO GENE DE TGF-β1.

Foram analisadas as frequências dos polimorfismos estudados, em quatro grupos: Fibrose leve a moderada, que consiste nos pacientes com hepatite C que

têm grau de fibrose ≤ 2 ; Fibrose avançada, que são os pacientes com hepatite C com grau de fibrose de 3 ou 4; hepatite C, composto pela soma dos dois grupos anteriores e grupo controle, composto por 210 doadores de sangue que têm sorologia negativa para VHC.

7.4 CÓDON 10 (T/C)

Foram comparadas as distribuições das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo no códon 10 T/C do gene *TGFB1* observadas nos grupos de pacientes com hepatite crônica C com fibrose leve a moderada e com fibrose avançada. A frequência alélica observada nestes grupos foi semelhante, sendo para o alelo T 0,4884 no grupo com fibrose leve a moderada e 0,5142 para o grupo de fibrose avançada. A frequência alélica observada para o alelo C no grupo com fibrose leve a moderada foi de 0,5116 e 0,4858 no grupo de fibrose avançada. A análise destes dados com o teste exato de Fisher não revelou diferença significativa entre as frequências observadas ($p > 0,05$) (vide tabela 2).

A frequência alélica observada para o alelo T no grupo composto por todos os indivíduos com hepatite crônica C foi de 0,50 e no grupo controle a frequência foi de 0,5190. A frequência alélica observada para o alelo C no grupo composto por todos os indivíduos com hepatite crônica C foi 0,50 e no grupo controle a frequência foi de 0,4810. Não houve diferença estatisticamente significativa nesta análise (vide tabela 2).

As frequências observadas para os genótipos TT, TC e CC foram 0, 2093, 0,5581 e 0,2326 respectivamente no grupo com fibrose leve a moderada e, no grupo com fibrose avançada, as frequências observadas foram 0,2572, 0,5142 e 0,2286 para os genótipos TT, TC e CC respectivamente. A análise destas variáveis não revelou diferenças estatisticamente significantes entre as frequências observadas ($p > 0,05$) (vide tabela 2).

As frequências observadas para os genótipos TT, TC e CC no grupo com hepatite C foram 0,2307, 0,5384 e 0,2307 respectivamente. No grupo controle as frequências observadas para os genótipos TT, TC e CC foram de 0,2667, 0,5048 e

0,2285 respectivamente. A comparação das frequências dos genótipos entre os grupos não revelou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (vide tabela 2).

Tabela 2: Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos do gene de TGFB1 (códon 10T/C).

Alelo / Genótipo	Fibrose			Doadores de sangue (DS)	P	
	Fibrose leve a moderada n=43	avançada n=35	Hepatite C n=78		Fibrose leve X Fibrose avançada	Hepatite C X DS
T	(42) 0,4884	(36) 0,5142	(78) 0,50	(218) 0,5190	0,8722	0,7081
C	(44) 0,5116	(34) 0,4858	(78) 0,50	(202) 0,4810		
TT	(09) 0,2093	(09) 0,2572	(18) 0,2307	(56) 0,2667	0,8774 ^a	0,6492 ^a
TC	(24) 0,5581	(18) 0,5142	(42) 0,5384	(106) 0,5048		
CC	(10) 0,2326	(08) 0,2286	(18) 0,2307	(48) 0,2285	0,5696 ^b	1,0000 ^b

7.5 CÓDON 25 (G/C)

Foram comparadas as distribuições das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo no códon 25 G/C do gene *TGFB1* observadas nos grupos de pacientes com hepatite crônica C com fibrose leve a moderada e com fibrose avançada. A frequência alélica observada nestes grupos foi semelhante, sendo para o alelo G 0,9419 no grupo com fibrose leve a moderada e 0,9572 para o grupo de fibrose avançada. A frequência alélica observada para o alelo C no grupo com fibrose leve a moderada foi de 0,0581 e 0,0428 no grupo de fibrose avançada. A análise destes dados com o teste exato de Fisher não revelou diferença significativa entre as frequências observadas ($p > 0,05$) (vide tabela 3).

Foi observada maior frequência do alelo G no grupo de indivíduos com hepatite crônica C e maior frequência do alelo C no grupo de doadores de sangue, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0021$). A frequência alélica observada para o alelo G no grupo composto por todos os indivíduos com hepatite crônica C foi 0,9487 e no grupo controle a frequência foi de 0,8595. A frequência

alélica observada para o alelo C no grupo composto com hepatite crônica C foi 0,0513 e no grupo controle a frequência foi de 0,1405 (vide tabela 5).

As frequências observadas para os genótipos GG, GC e CC foram 0,9070, 0,0698 e 0,0232 respectivamente no grupo com fibrose leve a moderada enquanto, no grupo com fibrose avançada, as frequências observadas foram 0,9143, 0,0857 e 0,0000 para os genótipos TT, TC e CC respectivamente. A análise destas variáveis não revelou diferenças estatisticamente significantes entre as frequências observadas ($p > 0,05$) (vide tabela 5).

Na análise das frequências genotípicas foi observada maior frequência do genótipo GG no grupo com hepatite crônica C com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0029$). As frequências observadas para os genótipos GG, GC e CC no grupo com hepatite C foram 0,9102, 0,0769 e 0,0129 respectivamente. No grupo controle, as frequências observadas para os genótipos GG, GC e CC foram de 0,7524, 0,2333 e 0,0143 respectivamente (vide tabela 3).

Tabela 3: Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene de TGFB1 (códon 25G/C).

Alelo / Genótipo	Fibrose leve n=43		Fibrose avançada n=35		Hepatite C n=78		P
	Doadores de sangue (DS) n=210		Fibrose leve X Fibrose avançada		Hepatite C X DS		
G	(81) 0,9419	(67) 0,9572	(148) 0,9487	(361) 0,8595	0,7314	0,0021	
C	(05) 0,0581	(03) 0,0428	(08) 0,0513	(59) 0,1405			
GG	(39) 0,9070	(32) 0,9143	(71) 0,9102	(158) 0,7524	0,6885 ^a	0,0029 ^a	
GC	(03) 0,0698	(03) 0,0857	(06) 0,0769	(49) 0,2333			
CC	(01) 0,0232	(0) 0,0000	(01) 0,0129	(03) 0,0143	1,0000 ^b	0,9221 ^b	

7.6 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS

A distribuição das frequências dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene TGF-1 (códon 10T/C; códon 25G/C), observada nos grupos de grupos de

pacientes com fibrose leve a moderada, com fibrose avançada, com hepatite crônica C e um grupo controle é mostrada na tabela 4.

As frequências fenotípicas inferidas com base na análise dos genótipos foram 0,7210; 0,2325 e 0,0465 para o grupo de fibrose leve para alto, intermediário e baixo produtor de TGF- β 1, respectivamente. Já no grupo de fibrose avançada foram 0,6858, 0,3143 e 0 respectivamente para alto, intermediário e baixo produtor de TGF- β 1. Não houve diferença estatisticamente significativa nestas análises (vide tabela 4)

As frequências fenotípicas inferidas com base na análise dos genótipos foram 0,7, 0,27 e 0,03 para o grupo de indivíduos com hepatite crônica C para alto, intermediário e baixo produtor de TGF- β 1, respectivamente. Já no grupo de doadores de sangue foram 0,5953, 0,3333 e 0,0714 respectivamente para alto, intermediário e baixo produtor de TGF- β 1. Não houve diferença estatisticamente significativa nestas análises (vide tabela 4).

Tabela 4: Frequências genotípicas e fenótipos previstos para o polimorfismo do gene de *TGFB1* (códon 10T/C; códon 25G/C).

Genótipo / Fenótipo	Fibrose leve n=43	Fibrose avançada n=35	Hepatite C n= 78	Doadores de sangue (DS) n=210	P	
					Fibrose leve X Fibrose avançada	Hepatite C X DS
T/T G/G ¹	(09) 0,2093	(08) 0,2286	(17) 0,22	(53) 0,2524		
T/C G/G ¹	(22) 0,5117	(16) 0,4572	(38) 0,50	(72) 0,3429		
T/C G/C ²	(02) 0,0466	(02) 0,0572	(04) 0,05	(34) 0,1619		
C/C G/G ²	(08) 0,1861	(08) 0,2286	(16) 0,20	(33) 0,1571		
T/T G/C ²	(0) 0,0000	(01) 0,0286	(01) 0,01	(03) 0,0143		
C/C G/C ³	(01) 0,0233	(0) 0,0000	(01) 0,01	(12) 0,0571		
C/C C/C ³	(01) 0,0233	(0) 0,0000	(01) 0,01	(03) 0,0143		
T/T C/C ³	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(0) 0,0	(0) 0,0000		
T/C C/C ³	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(0) 0,0	(0) 0,0000		
Alto produtor ¹	(31) 0,7210	(24) 0,6858	(55) 0,7	(125) 0,5953	P=0,8054 RR= 1,08 IC95% 0,6852-1,703	P=0,1007 RR= 0,8824 IC95% 0,7687-1,13
Intermediário ²	(10) 0,2325	(11) 0,3143	(21) 0,27	(70) 0,3333	0,418 RR=1.51 IC95%0.49-4.65	0,298 RR=1,36 IC95%0.74-2.52
Baixo produtor ³	(02) 0,0465	(0) 0,0000	(02) 0,03	(15) 0,0714	P=0,4988 RR= 0,5395 IC95% 0,438-0,6641	P=0,1704 RR= 1,226 IC95% 1,015-1,481

8 DISCUSSÃO

Nesse estudo, buscamos avaliar a associação de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 e o estágio da fibrose na hepatite crônica C a fim de avaliar um possível marcador imunogenético que pudesse ser utilizado para previsão de gravidade de fibrose hepática na hepatite C, considerando a hipótese de que polimorfismos de citocinas pró-fibróticas estariam associados com a gravidade da fibrose nessa doença.

A morbidade e a mortalidade na hepatite C estão relacionadas com a fibrose hepática e com as consequências decorrentes do processo fibrogênico. Na hepatite C, uma resposta imune ineficiente para eliminar o vírus vai gerar a fibrose que pode levar à cirrose, insuficiência hepática e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001; MYERS et al., 2002; KAMAL et al., 2006).

Portanto, a avaliação da severidade da fibrose hepática é de extrema importância na determinação de estratégias de tratamento, além de orientar no prognóstico e risco de complicações em pacientes com doenças hepáticas crônicas. A biópsia hepática é o padrão-ouro para avaliar o estágio/gravidade da fibrose hepática, mas é um procedimento invasivo, com riscos de sangramento e dor, além de apresentar erros de amostragem e alto custo (LICHTINGHAGEN; BAHR, 2004).

Nesse sentido, o presente estudo avaliou a associação de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 e o estágio da fibrose na hepatite crônica C, descreveu as frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos de polimorfismos genéticos da citocina TGF- β 1 (10C/T, 25C/G) em uma amostra de indivíduos com hepatite crônica C com diferentes estágios de fibrose; e comparou as frequências observadas dos polimorfismos genéticos entre os grupos de pacientes com hepatite crônica C com estágio de fibrose hepática com classificação METAVIR F3/ F4 e \leq F2 e um grupo de controles, constituído de 210 doadores de sangue.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência do alelo G para o polimorfismo do códon 25 no gene do *TGFB1*, quando comparados entre o grupo de hepatite C e o grupo controle, com maior frequência do alelo G ($p= 0,0021$) no grupo de hepatite C. Também foi observada diferença estatisticamente significativa entre o genótipo GG ($p=0,0029$) no grupo de hepatite C em relação ao grupo controle.

A combinação do polimorfismo no códon 10 e no códon 25 determinam nove genótipos diferentes, distribuídos em três fenótipos previstos: alto produtor, produtor intermediário e baixo produtor de TGF- β 1 (HOFFMANN et al., 2001).

Em relação à distribuição das frequências dos fenótipos previstos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o fenótipo de alto produtor e produtor intermediário ($p=0,8054$) e, também, entre o fenótipo de alto produtor comparado ao de produtor intermediário mais baixo produtor ($p=0,4988$), quando comparados entre os grupos de fibrose leve a moderada e o grupo com fibrose avançada. Quando comparadas a distribuição das frequências dos fenótipos previstos entre o grupo de hepatite C e o grupo controle, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o fenótipo de alto produtor e produtor intermediário ($p=0,1007$) e, também, entre o fenótipo de alto produtor comparado ao de produtor intermediário mais baixo produtor ($p=0,1704$). A progressão da fibrose na hepatite C é extremamente variável, e a história natural da doença pode durar décadas. Em vários estudos sobre hepatite crônica C, foi demonstrado que fatores como idade, duração da infecção, uso de álcool, sexo masculino e coinfeção com HIV, hepatite B e esquistossomose têm sido relacionados com maior risco de progressão para fibrose e atividade inflamatória severas. Embora, não existam muitas evidências de que fatores virais como genótipo e carga viral influenciem a progressão da fibrose, eles são importantes na avaliação da duração e resposta ao tratamento (COSTA et al., 2002; FREEMAN et al., 2003; POYNARD et al., 2003; KAMAL et al., 2004; 2006).

Na hepatite C, a maioria dos pacientes apresentaram grau de fibrose F1 e atividade inflamatória A1, sendo consideradas fibrose e atividade inflamatória leve ou não significativa clinicamente. Esse achado está de acordo com trabalhos já publicados (POYNARD; BEDOSSA; OPOLON, 1997; KAMAL et al., 2004, 2006) em que se demonstrou que a hepatite C é uma doença de evolução lenta, onde a taxa de progressão da fibrose na hepatite C é de 0,1 unidades por ano e desenvolvimento de cirrose num período de 20-40 anos, quando comparada com a taxa de 0,61 unidades por ano na coinfeção e desenvolvimento de cirrose dentro de 10 anos.

Os polimorfismos dos genes de citocinas podem potencialmente afetar a progressão da doença por diversos mecanismos, incluindo o controle da produção das citocinas.

Sabendo que TGF- β 1 é uma citocina pró-fibrogênica e que dados sobre fibrose hepática são ainda pouco esclarecidos na população estudada, coortes com doença hepática moderada/severa precisam ser estudados para determinar o papel destes polimorfismos nos genes de citocinas na progressão da infecção pelo VHC.

Variações em genes que codificam citocinas fundamentais envolvidas na fibrogênese humana podem regular a progressão da fibrose. Estas citocinas incluem o TGF-beta a angiotensina II que desempenham um papel importante na fibrose hepática experimental e são os principais determinantes de progressão da fibrose em algumas séries de pacientes com hepatite crônica C. Interessantemente, pacientes que têm mutações em ambos os genes progridem mais rapidamente que aqueles que têm apenas um polimorfismo (POWELL, 2000).

A presença de alelos susceptíveis em múltiplos alelos não leva necessariamente à doença porque a interação com fatores ambientais também tem papel importante na patogênese. O conhecimento dos polimorfismos genéticos pode auxiliar a selecionar os pacientes candidatos à prevenção de determinadas patologias e como eles podem influenciar em relação aos sintomas, ao prognóstico e reações aos tratamentos.

Muitos estudos demonstraram que a cirrose, geralmente um processo irreversível, e a fibrose hepática, regridem com a remoção do agente patogênico e seu tratamento específico (HAMMEL et al., 2001; DESMET; ROSKAMS, 2004).

Comparando nossos resultados com dados da literatura, alguns estudos demonstram resultados contraditórios quanto à indução da fibrose hepática pelo VHC sobre a influência dos polimorfismos no gene da citocina TGF- β 1 como destacou (GEWALTING, 2002) onde caucasianos heterozigotos (GC) no códon 25 apresentaram progressão mais rápida e grau mais elevado de fibrose hepática.

Wang et al. 2005, também observou que em caucasianos com VHC com pelo menos uma prolina no códon 10 apresentaram maior risco de desenvolver fibrose hepática mais pronunciada.

Muitos estudos confirmatórios se fazem registrados. Em animais, com uma super expressão do TGF- β 1, onde níveis de TGF- β 1 e do seu RNAm apresentavam-se elevados em órgãos fibróticos como os rins, fígado e pulmões. (BORDER et al., 1994).

Roulot et al. (1995), também demonstrou em um estudo que a expressão do gene do TGF- β 1 medida pela concentração intra-hepática do RNAm apresentava-se significativamente aumentada na infecção crônica pelo VHC.

Outro estudo feito por Letterio e Roberts 1998, demonstrou uma produção aumentada do TGF- β 1 e a ativação de sua forma latente, associada com complicações fibróticas e associadas também a condições inflamatórias crônicas.

Níveis plasmáticos de TGF- β 1 corresponderam aos níveis encontrados no fígado com VHC. Após terapia com IFN- α - níveis plasmáticos decresceram simultaneamente com a regressão da fibrose hepática (TSUSHIMA et al.,1999).

Pereira et al. 2008, sugeriram que a presença do genótipo G/G no códon 25 do TGF- β 1 encontra-se associado com a infecção pelo VHC e que o polimorfismo do alelo C no códon 25 da TGF- β 1 pode ser interpretado como um alelo protetor contra a infecção pelo VHC ou fibrose hepática.

Award et., al.1998, identificaram que leucócitos de indivíduos com o genótipo G/G no códon 25 tiveram uma produção significativamente mais alta de TGF- β 1 que indivíduos com o genótipo G/C;

Também Gewaltig et al. (2002), observaram que em pacientes fibróticos com o genótipo homozigoto G/G tiveram valores mais altos de TGF- β 1 no plasma que heterozigotos. Sugerindo que o genótipo G/G tem maior impacto na fibrogênese hepática.

Ainda não sabemos como as substituições de aminoácidos nos códons 10 e 25 contribuem para a formação da fibrose hepática; estudos adicionais são necessários para avaliar como estas alterações contribuem na modulação das atividades biológicas do TGF- β 1 observando as manifestações fenotípicas desses polimorfismos no fígado de pacientes com VHC.

Faz-se importante ressaltar que muitos estudos feitos buscando encontrar marcadores de resistência e/ou susceptibilidade pelo VHC e seu papel, comparam indivíduos cronicamente infectados com indivíduos saudáveis. O ideal é que compare indivíduos que conseguiram eliminar o vírus com aqueles que cronificaram, evitando assim um erro no desenho do estudo com (fenótipos clínicos rigorosamente definidos; n° suficiente de casos e controles (força estatística); casos e controles da mesma população) já que estima-se que de 54 a 86% dos indivíduos saudáveis, se expostos ao VHC, fatalmente cronificariam.

Estudos de associação genética na saúde e na doença necessitam que sejam feitos para identificar novos polimorfismos, associando esses polimorfismos e as doenças, compreendendo funcionalmente seus efeitos em suas variantes e interagindo-as com o meio ambiente.

Trabalhos em populações distintas podem apresentar frequências genotípicas diferentes, devido à heterogeneidade dos grupos étnicos estudados.

Estes polimorfismos devem interagir com outros fatores ambientais e genéticos determinando a susceptibilidade à cronicidade pelo VHC e à fibrose, não sendo um polimorfismo em uma determinada posição do gene do *TGF-β1*, isoladamente, o responsável por isso.

Estudos de associações permitem explicar o aumento da susceptibilidade à doença, a heterogeneidade clínica e de severidade, podendo auxiliar no manejo clínico das doenças, no “Estilo de vida”, a busca de novos alvos farmacológicos para terapias e na farmacogenética. Enfim, auxiliando no entendimento à susceptibilidade, severidade, etiopatogênese, estimativa de risco da doença e na terapêutica.

Dados da literatura sugerem a inclusão na prática clínica de estudo de polimorfismos de citocinas para avaliação do estágio de fibrose na hepatite C para uma futura substituição ou diminuição de realização de biópsias hepáticas. A utilização desses marcadores, como um método não invasivo é extremamente importante para avaliar a progressão da fibrose, do prognóstico e decisões de tratamento nessa doença.

Diante disso, como perspectiva de nosso trabalho, sugerimos a realização de uma próxima etapa, com estudo prospectivo, aumentando o número de pacientes com hepatite C e dosando os marcadores bioquímicos associados com fibrose e inflamação e polimorfismos de citocinas.

Por fim, tentar correlacioná-lo com estágio de fibrose em outras doenças hepáticas crônicas e, como acompanhamento da regressão da fibrose nessa doença, após o tratamento antiviral com a diminuição dos níveis de marcadores.

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que os polimorfismos do gene *TGFB1* nos códons 10 e 25 não estão associados ao estágio histológico de fibrose hepática em indivíduos com hepatite crônica C.

O polimorfismo do gene *TGFB1* no códon 25 tem maior frequência nos indivíduos com hepatite crônica C quando comparados com indivíduos saudáveis, podendo ser um marcador de susceptibilidade a infecção pela hepatite crônica C.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z.T. et al. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. **World J Gastroenterol**, v.11, n.42, nov 14, p.6656-61, 2005.
- AFDHAL N.H. The natural history of hepatitis C. **Seminars in Liver Diseases**, v.24, n.2, p.3-8, 2004.
- AGRATI, C. et al. CD1d expression by hepatocytes is a main restriction element for intrahepatic -cell recognition. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 19, p. 41-48, 2005.
- ANDRADE, Z.A. As relações entre álcool e fibrose hepática - Relations Between Alcohol and Liver Fibrosis Z. **Arq Méd ABC**, Supl.2, p.17-8, 2006.
- ANDRADE, Z.A. Regressão da fibrose hepática. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, v.38, p.514-20, 2005.
- ARTHUR, MJP. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. **Gastroenterology**, v.122, p.1525-8, 2002.
- ATTISANO, L. et al. TGF- β receptors and actions. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1222, p.71-80, 1994.
- AWAD, M. R. et al. Genotypic variation in the Transforming growth factor β gene: association with Transforming growth factor β production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**, v.66, p.1014-20, 1998.
- BARRET, S. et. al. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferongamma, and outcome of hepatitis C virus infection. **J Med Virol**, v.71, p.212-218, 2003.
- BAUER, M.; SCHUPPAN, D. TGFbeta1 in liver fibrosis: time to change paradigms? **FEBS Lett**, v. 502, n.1-2, p.1-3, 2001.
- BERG, T. et al. Extended treatment duration for hepatitis C virus type 1: comparing 48 versus 72 weeks of peginterferon-alfa-2a plus ribavirin. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1086-97, 2006.
- BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor β in human disease. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.1350-58, 2000.
- BOOTH, M. et al. Periportal fibrosis in human schistosoma mansoni infection is associated with low IL-10, low IFN- gamma, high TNF- alpha, or low RANTES, depending on age and gender. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, p.1295-1303, 2004.
- BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. **N Engl J Med**, v.331, p.1286-92, 1994.

BUMGARDNER, G. L. et al. Comparison of in vivo and in vitro immune response to purified hepatocytes. **Transplantation**, v. 49, p. 429-436, 1990.

BUSCH, M.P. et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. **Transfusion**, v.45, p. 254–64, 2005.

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. **Endocr. Rev.**, v.23, n.6, p.787–823, 2002

CHEN, M. et al. Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway. **J Immunol**, v.175, p.1047-1055, 2005.

CHEVALIEZ, S. et al. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reactionbased method. **Hepatology**, v.46, p. 22–31, 2007.

_____; PAWLOTSKY, J. M. HCV genome and life cycle. In: Tan S-L, (ed.) **Hepatitis C viruses: Genome and molecular biology**. Horizon Bioscience, Norwich: UK, 2006. p. 5–47.

CHOO, Q.L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.

_____. et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, p. 2451-5, 1991.

CONSTANTINI, P. K. et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. **Liver**, v.22, n.5, Oct, p.404-12. 2002.

COOGER, V. C. et al The effect of acute oxidative stress on the ultrastructure of the perfused rat liver. **Pharmacol Toxicol**, v.89, p.306-311, 2001.

COPPOLA, N. et al. Anti-HCV IgG avidity index in acute hepatitis C. **J Clin Virol**, v.40, p.110–5, 2007.

COSTA, L. B. et al. Effect of host-related factors o the intensity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C vírus infection. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 6, n. 5, p. 219-224, 2002.

CRISPE, I.N. et al. The liver as a lymphoid organ. **Immunology**, v. 27, p. 147-63, 2009.

CRISPE, I. N. Hepatic T cells and liver tolerance. **Nat Rev Immunol**, v.3, p.51–62, 2003.

CUNHA, A da.; VITKOVIC, L. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta) expression and regulation in rat cortical astrocytes. **J Neuroimmunol**, v.36, p.157-169, 1992.

DALGARD, O. et al. Treatment with pegylated interferon and ribavirin in HCV infection with genotype 2 or 3 for 14 weeks: a pilot study. **Hepatology**, v.40, p.1260-5, 2004.

FRIEDMAN, S.I. Liver fibrosis – From bench to bedside. **J. Hepatol**, v.38, p.38-53, 2003.

FUNG, S. K.; LOK, A. S. F. Update in viral hepatitis in 2004. **Current Opinion in Gastroenterology**, Philadelphia, v. 21, p. 300-307, 2005.

GAD, R. R.; MALES, S.; MAKHZANGY H. et al. Predictors of a sustained virological response in patients with genotype 4 chronic hepatitis C. **Liver Int**, v.28, p.1112-9, 2008.

GEORGE, J. et al. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 96, n.22, p.12719- 24, U S A, 1999.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J. ; OSBORNE, B.A. Kuby Immunology, 5.th. New York : W.H.Freeman, 2000.

GORELIK, L.; FLAVELL, R. A. Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. **Immunity**, v. 12, p.171-81, 2000.

_____. Transforming growth factor- β in T-cell biology. **Nat. Rev.Immunol**, v.2, p.46-53, 2002.

GOVINDEN, R.; BHOOLA, K. D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . **Pharmacol. Ther.**, v.98, p.257-65, 2003.

GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Human Molecular Genetics**, v.8, p. 93-97, 1999.

GRAMANTIERI, L. et al. Imbalance of IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist mRNA in liver tissue from hepatitis C virus (HCV)-related chronic hepatitis. **Clin Exp Immunol**, v.115, n.3, Mar, p.515-20, 1999.

GRESSNER, A. M.; BACHEM M. G. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis – a homage to the role of activated fat-storing cells. **Digestion**, v.56, p.335-46, 1995.

_____. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci**, v.7, p.d793-807, 2002.

GUIDOTTI L, G; et al. Noncytopathic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. **J Exp Med**, v. 189, p. 1555-1564, 1999.

HADZIYANNIS, S. J. et al. Peginterferonalpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Ann Intern Med**, v.140, p.346–55, 2004.

HAO, W. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. **World J Gastroenterol**, v.11, n.13, p.1929-1936, 2005.

HELLSTROM, U. B. et al. Immunoglobulin M reactivity towards the immunologically active region sp75 of the core protein of hepatitis C virus (HCV) in chronic HCV infection. **J Med Virol**, v.39, p.325–32, 1993.

HOWARD C.J. et al. The role of dendritic cells in shaping the immune response. **Anim. Health Res. Rev**, v.5, p.191-195, 2004.

HOWELL, C.; JEFFERS, L.; HOOFNAGLE, J.H. Hepatitis C in African Americans: summary of a workshop. **Gastroenterology**, v. 119, n.5, p.1385-96, 2000.

JINUSHI M et al. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-Induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 6072–6081, 2004.

KALAMS, S. A.; WALKER, B. D. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. **J. Exp. Med.**, v.188, p.2199–204, 1998.

KAMAL, S. M. et al. Progression of fibrosis in hepatitis C with and without schistosomiasis: correlation with serum markers of fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 43, n. 4, p. 771-779, 2006

KAUFMANN. Ito Cells are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses. **Immunity**, v.26, p.117-129, 2007.

KNOLLE, P. A.; GERKEN, G. Local control of the immune response in the liver. **Immunol Rev**, v.174, p. 21–34, 2000.

LARCO, J. E. de; TODARO, G. J. A human fibrosarcoma cell line producing multiplication stimulating activity (MSA)-related peptides. **Nature**, 272, p.356-8, 1978.

LE COUTEUR, D. G. et al. Pseudocapillarization and associated energy limitation in the aged rat liver. **Hepatology**, v.33, p.537-543, 2001.

_____. The hepatic sinusoid in aging and cirrhosis – effects on hepatic substrate disposition and drug clearance. **Clin Pharmacokinet** , v.44, p.187–200, 2005.

_____. Hepatic pseudocapillarisation and atherosclerosis in ageing. **Lancet**, v.359, p.1612-1615, 2002.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta 1. **Annu Rev Immunol**, v.16, p.137-161, 1998.

_____. TGF- β : A Critical Modulator of Immune Cell Function. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.84, n.3, p.244-250, 1997.

LINDENBACH, B. D. et al. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 991-1041. v. 1

LOK, A. S. et al. Antibody response to core envelope and nonstructural hepatitis C virus antigens: comparison of immunocompetent and immunosuppressed patients. **Hepatology**, v.18, p.497–502, 1993.

MANDAL, M. et al. Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. **Mol Immunol**, v.35, p.525-536, 1998.

MURPHY, W.J. Natural killer cells and bone marrow transplantation. **J Natl Cancer Ins**, v.85, n.18, p.1475-82, 1993.

NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C:2002 NIH Consensus State Sci Statements, v.19, p.1–46, 2002.

OKUYAMA, H.; SHIMAHARA, Y.; KAWADA, N. The hepatic stellate cell in the post-genomic era. **Histol Histopathol**, v.17, p.487–95, 2002.

PAWLOTSKY, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 96-102, 2004.

PAWLOTSKY, J. M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology**, v.36, p.S65–73, 2002.

PAWLOTSKY, J. M. et al. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. **Hepatology**, v. 32, p. 654–59, 2000.

_____. et al. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. **J Clin Microbiol**, v. 35, p.1734–9, 1997.

PERALTA-ZARAGOVA, O.; LAGUNAS-MARTÍNEZ, A.; MADRID-MARINA, V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. **Salud Publica Mex**, v. 43, p.340-351, 2001.

PEREIRA, F. A. et al. Association of TGF- β 1 Codon 25 (G915C) Polymorphism With Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p.58–64, 2008.

PERREY, C.; PRAVICA, V.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. Genotyping for polymorphisms in interferon- γ , interleukin-10, transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor- α genes: a technical report. **Transplant Immunology**, v.6, p.193-197, 1998.

POYNARD, T. et al. Fibrotest-Fibro Sure: towards a universal biomarker of liver fibrosis? **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2005.

_____.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. the obsvirc, metavir, cliniver and dosvirc groups. **Lancet**, v.349, p.825-32, 1997.

RACANELLI V, REHERMANN B. The liver as immunological organ. **Hepatology**, v.43, p. 54-62, fev. 2006

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 5, p. 215-229, 2005.

ROLLIER, C. et al. Chronic hepatitis C virus infection established and maintained in chimpanzees independent of dendritic cell impairment. **Hepatology**, v. 38, p. 851-858, 2003.

SAGNELLI, E. et al. Diagnosis of HCV related acute hepatitis by serial determination of IgM to HCV: a preliminary observation. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.17, p. 207-10, 2003.

_____. et al. Diagnosis of hepatitis C virus related acute hepatitis by serial determination of IgM anti-HCV titres. **J Hepatol**, v.42, p.646-51, 2005.

SALAZAR-MATHER, T. P.; HOKENESS, K. L. Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.303, p.29-46, 2006.

SANCHEZ-TAPIAS, J. M. et al. Peginterferonalfa2a plus ribavirin for 48 versus 72 weeks in patients with detectable hepatitis C virus RNA at week 4 of treatment. **Gastroenterology**, v.131, p.451-60, 2006.

SHER, A.; PEARCE, E.; KAYE, P. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. **Curr. Opin. Immunol**, 2003;15:421-429.

SHIFFMAN, M. L. R. et al. Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. **N Engl J Med**, v.357, p.124-34, 2007.

STRADER, D.B. et al. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C. **Hepatology**, v. 39, n. 4, p. 1147-71, 2004

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.34, supl. 1, p. 69-82, 2001.

TANAKI, A. et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. **Nat Med**, v.6, p.578-82, 2000.

TAY, C.H.; WELSH, R.M. Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. **J Virol**, v.71, p. 267-275, 1997.

THIO, C. L. et al. Screening for hepatitis C virus in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J Clin Microbiol**, v. 38, p.575-7, 2000.

_____. et al. Racial differences in HLA class II association with hepatitis C virus outcomes. **J Infect Dis**, v.184, p.16-21, 2001.

THURMAN, I. I. R. G. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. **Am J Physiol**, v.275, p.G605-11, 1998.

ULSNHEIMER, A. et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.37, p. 189-198, 2003.

VIRAL hepatitis is an important health issue for the nation. Disponível em: <http://www.cdc.gov/odu/hepatitis/viral_hep_drug_use.htm>. Acessado em: 26 de nov. 2008

WARREN, A. et al. Hepatic pseudocapillarization in aged mice. **Exp Gerontol**, v.40, p.807-812, 2005.

WOOLLARD, DJ. et al. Characterization of HCV-specific CD4+ T cell responses in an acutely infected chimpanzee. **Hepatology**, v. 38, p.1297-1306, Ago. 2003.

YU, K.O.; PORCELLI, S. A. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. **Immunol Lett**, v.100, p.42-55, 2005.

YU, M.L. et al. Different viral kinetics between hepatitis C virus genotype 1 and 2 as on-treatment predictors of response to a 24-week course of high-dose interferon-alpha plus ribavirin combination therapy. **Transl Res**, v.148, n.3, p.120-7, 2006.

ZARIFE, M.A. et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.100, n.7, p.663-8, 2006.

TSUSHIMA, H.; KAWATA, S.; TAMURA, S.; ITO, N.; SHIRAI, Y.; KISO, S.; DOI, Y.; YAMADA, A.; OSHIKAWA, O.; MATSUZAWA, Y. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. **J. Hepatol**, v. 30, p. 1-7, 1999.

Warlé MC, et al., Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection. **Liver Transpl.** v. 8, n.7, p.603-11, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA		
IDENTIFICAÇÃO:	Data: _____	
NOME COMPLETO:	_____	
PROCEDÊNCIA:	HUPES() HSR() BANCO SANGUE() OUTRO()-QUAL?	
REGISTRO:	_____	
DATA NASCIMENTO:	_____	
GÊNERO:	FEM() MAS()	
GRAU DE INSTRUÇÃO:	FUNDAMENTAL() MÉDIO() SUPERIOR()	
PROFISSÃO:	_____	
ENDEREÇO:	_____	
TELEFONE:	_____	
CLASSIFICAÇÃO ÉTNICA:		
Auto-classificação:	brancos() mulato() negro() Outro:(Qual?)	
Cabelos COR:	loiro() ruivo() castanho() preto()	
Cabelos TEXTURA:	liso() ondulado() crespo()	
Olhos COR:	verde/azul/castanho-claro() preto/castanho-escuro()	
Lábios:	finos() médios() grossos()	
Cor da pele:	branco() marrom() preta() OBS: _____	
<i>Ascendência familiar:</i>		
Mãe:	branco() negro() mulato() índio() asiático() NS()	
Pai:	branco() negro() mulato() índio() asiático() NS()	
Avó materna:	branco() negro() mulato() índio() asiático() NS()	
Avó materno:	branco() negro() mulato() índio() asiático() NS()	
Avó paterna:	branco() negro() mulato() índio() asiático() NS()	
Avó paterno:	branco() negro() mulato() índio() asiático() NS()	
CLASSIFICAÇÃO:	branco() mulato: claro() médio() escuro() negro()	
ANTECEDENTES MÉDICOS E HÁBITOS DE VIDA:		
ETILISMO:	NÃO() SIM()	
DOSE:	TEMPO DE USO: _____	
<i>*ver doses de equivalência no fim da página</i>		
ETANOL (g/dia): <20() 20-40() 40-60() 60-80() >80()		
TIPO: DESTILADOS() FERMENTADOS()		
SE ABSTÊMIO, TEMPO SEM USO: _____		
USO DE DROGAS:	NÃO() SIM()	
INALATORIA() VENOSA()		
QUAL? _____		
TEMPO DE USO: _____		
SE ABSTÊMIO, TEMPO SEM USO: _____		
COMPARTILHOU PERFURO-CORTANTES	NÃO() SIM()	
TEM TATUAGEM/PIERCING?	NÃO() SIM() QUANDO? _____	
JÁ FOI HEMOTRANSFUNDIDO?	NÃO() SIM() QUANDO? _____	
FEZ TTO DENTÁRIO?	NÃO() SIM() QUANDO? _____	
HISTÓRIA DE CIRURGIA PRÉVIA?	NÃO() SIM() QUANDO? _____ QUAL? _____	
FOI RECEPTOR EM Tx ORGAOS ?	NÃO() SIM() QUANDO? _____ QUAL? _____	
FAZ USO DE CHÁS?	NÃO() SIM() QUAL(IS)? _____	
OUTRAS COMORBIDADES?	NÃO() SIM() QUAL(IS)? _____	
<i>* Equivalência entre dose de bebida e teor de álcool (gramas de etanol/dia)</i>		
Dose bebida	% álcool	Gramas de etanol
1 lata de cerveja - 350 ml	5%	17
1 copo de chopp - 300 ml	5%	15
1 copo de vinho - 90 ml	12%	10
1 garrafa de vinho - 750 ml	12%	80
1 dose de destilados		
(whisky, pinga, vodka, etc.) - 50 ml	40-50%	20-25
1 garrafa de destilados - 750ml	40-50%	300-370

TIPO DE TRATAMENTO:				DATA INICIO:	DATA FINAL:
CHILD-PUGH:	A ()	B ()	C ()	SCORE(0-15):	
GENOTIPO	1 ()	2 ()	3 ()		
CARGA VIRAL VHC:	DATA:	LOCAL:	CV:	V. REF:	
PCR-RNA Qualitativo:	DATA:	LOCAL:	Detectável ()	Indetectável ()	
BIOPSIA HEPÁTICA:	DATA:	LOCAL:	N°:	METAVIR:	
MEDICAÇÃO USO:	PEG-INF ALFA-2A ()		DOSE:		
	PEG-INF ALFA-2B ()		DOSE:		
	INF-STANDARD ()		DOSE:		
	RIBAVIRINA ()		DOSE:		
Durante o tratamento:	Granulokine ()	Tempo uso:			Dose:
	Eritropoetina ()	Tempo uso:			Dose:
Efeitos Colaterais:					
RESPOSTA:	NÃO RESPONDENDOR ()	RECIDIVANTE ()	RESPOSTA SUSTENTADA ()		

Exames Laboratoriais:	PRE-TTO	3ºMÊS	6ºMÊS	12ºMÊS	6ºMÊS Pós-TTO
Hb/ Ht					
leucocitos/ NE					
plaquetas					
AST / ALT					
Prot T/ Albumina					
FA/GGT					
Bilirrubinas totais					
BD/BI					
tempo protrombina					
glicemia					
TSH / T4 LIVRE					
ferritina					
PCR-RNA VHC					

OBS: Colocar Valores de Referência ao lado de cada exame

TIPO DE TRATAMENTO:				DATA INICIO:	DATA FINAL:
CHILD-PUGH:	A ()	B ()	C ()	SCORE(0-15):	
GENOTIPO	1 ()	2 ()	3 ()		
CARGA VIRAL VHC:	DATA:	LOCAL:	CV:	V. REF:	
PCR-RNA Qualitativo:	DATA:	LOCAL:	Detectável ()	Indetectável ()	
BIOPSIA HEPÁTICA:	DATA:	LOCAL:	N°:	METAVIR:	
MEDICAÇÃO USO:	PEG-INF ALFA-2A ()		DOSE:		
	PEG-INF ALFA-2B ()		DOSE:		
	INF-STANDARD ()		DOSE:		
	RIBAVIRINA ()		DOSE:		
Durante o tratamento:	Granulokine ()	Tempo uso:			Dose:
	Eritropoetina ()	Tempo uso:			Dose:
Efeitos Colaterais:					
RESPOSTA:	NÃO RESPONDENDOR ()	RECIDIVANTE ()	RESPOSTA SUSTENTADA ()		

Exames Laboratoriais:	PRE-TTO	3ºMÊS	6ºMÊS	12ºMÊS	6ºMÊS Pós-TTO
Hb/ Ht					
leucocitos/ NE					
plaquetas					
AST / ALT					
Prot T/ Albumina					
FA/GGT					
Bilirrubinas totais					
BD/BI					
tempo protrombina					
glicemia					
TSH / T4 LIVRE					
ferritina					
PCR-RNA VHC					

ANEXOS

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
 MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 IORG 0003460, April 1, 2004 – IRB 00004123, April 8, 2007

Rua Padre Feijó 240, Camela – Ambulatório Magalhães Neto 3º andar, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
 Cep: 40.160-170 – Salvador-Bahia tele fax: (71) 3203-2740 e-mail: cepcco@ufba.br

PARECER/RESOLUÇÃO Nº 16/2007

Registro CEP: 141 – 20.10.06

CAAE: 0128.0.054.000-06

Título do Projeto. “Identificação de polimorfismos genéticos associados à evolução e a resposta ao tratamento da hepatite crônica C”.

Patrocínio/Financiamento. Projeto submetido à FAPESB.

Pesquisador Responsável. André Castro Lyra, Médico, Doutor em Medicina e Professor Adjunto da UFBA. “Currículo Vitae” apenso.

Instituição. Ambulatório do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, (AC-HUPES) e do Hospital São Rafael, e em pacientes sadios do Serviço de Transfusão de Sangue, (STS).

Área do Conhecimento. 4.01, Nível D, Grupo III.

Objetivo. Identificar marcadores genéticos do hospedeiro que possam influenciar na evolução clínica da hepatite crônica C, na resposta ao tratamento anti-viral e na estratégia terapêutica.

Sumário. A infecção pelo vírus da hepatite C é uma das principais causas de doença hepática no mundo, sendo que mais de 55% dos pacientes infetados se tornam crônicos. O vírus não é estável geneticamente e pode variar em sua apresentação conforme a raça, idade na infecção, co-morbidades como a infecção pelo HVB, HIV, etc. Como na população bahiana há uma grande diversidade genética por causa da miscigenação e uma ausência de estudos nesta região, justifica-se fazer um levantamento da prevalência das alterações genéticas e a busca de diferentes opções terapêuticas para esta população. Será realizada a seleção dos pacientes no HUPES e HSR, além de indivíduos sadios de STS. Está informado na Folha de Rosto que o número de pacientes será de 200 no Centro. Não há considerações sobre o tamanho da amostra para justificar que o protocolo pode ser eficaz e eticamente justificável. Não há referência ao cumprimento da legislação específica sobre análise de genoma humano (Res. CNS 340/04 e 347/05, <http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>).

Crítérios de inclusão — Pacientes com Hepatite crônica C acima de 18 anos, sem história de ingestão de álcool importante e divididos em 03 grupos (com tratamento anti-viral com ou sem resposta, não tratados e indivíduos sadios do STS); **Crítérios de exclusão** — outras doenças hepáticas, tratamento associações com outros vírus; distúrbio psiquiátrico grave. Risco mínimo de coleta de sangue e entrevista. Não informa sobre a garantia de sigilo dos dados. Através da melhora dos conhecimentos da dinâmica das mutações podem ser sugeridas mudanças nas estratégias de diagnóstico e de tratamento, trazendo potenciais benefícios para o “sujeito de pesquisa” e/ou para a comunidade.

Prof. Dr. Antônio dos Santos Barral
 Coordenador do Comitê de Ética
 em Pesquisa de Humana
 UFBA - Universidade Federal da Bahia



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IOORG 0003460, April 1, 2004 – IRB 00004123, April 8, 2007

Rua Padre Feijó 240, Canela – Ambulatório Magalhães Neto 3º andar, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
 Cep: 40.160-170 – Salvador-Bahia telefix.: (71) 3203-2740 e-mail: cep@ufba.br

O Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido, “**TCLPE**” contém justificativa, porém a linguagem utilizada é inacessível para pessoas que não sejam da área de saúde e os objetivos, procedimentos com as amostras de sangue, riscos e benefícios, participação voluntária, compensação de danos, confidencialidade das informações colhidas e privacidade dos dados, durante e após o protocolo, gratuidade da intervenção, endereço e telefone dos investigadores e do Comitê de Ética em Pesquisa não estão claramente explicitados.

Comentários. Trata-se de um protocolo de prevalência de mutações do HVC. O protocolo está bem argumentado, seus fins são éticos e o conhecimento advindo pode trazer benefícios aos pacientes e a comunidade. Não há considerações estatísticas, tampouco é explicado o número de pacientes arrolados. O “**TCLPE**” está extremamente simplificado, devendo ser reformulado para atender à Resolução CNS 196/96, item IV.1, 2 e 3. Há que se referir a todos os pontos da legislação de investigação genética. Protocolo tem valor e pode ser eticamente conduzido após correções. **Projeto com pendências.**

Salvador, 12 de Fevereiro de 2007


Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata
Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apensas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (RECOMENDAÇÕES)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
 MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 IORG 0003460, April 1, 2004 – IRB 00004123, April 8, 2007

Rua Padre Feijó 240, Canela – Ambulatório Magalhães Neto 3º andar, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
 cep: 40.110-170 - Salvador, BA. telefax: (71) 3203-2740 e-mail: cepmco@ufba.br

Recomendações Adicionais ao Parecer/Resolução N.º 16/2007.

Senhor (a) Investigador (a).

O “sujeito de pesquisa” tem liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo à sua assistência médica, (Res. CNS/MS 196/96 – Item IV. 1. f), e deve receber uma cópia do **Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido (TCLPE)** na íntegra, por ele e por Vossa Senhoria assinada (Item IV. 2. d).

O (a) Pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuação pelo CEP que aprovou, (Res. CNS/MS 196/96 Item III.3 z e Res. 346 Item II N.º 5), aguardando novo e respectivo Parecer, exceto quando no curso da mesma possa ocorrer risco ou dano não previsto ao passivo participante ou quando for constatada a superioridade do regime oferecido a um dos grupos da pesquisa, (Res. 196/96 Item V.3), hipóteses que requeiram ação imediata.

Informamos ao (à) Senhor (a) Pesquisador (a) que, no cumprimento da legislação, (Res. CNS/MS 251/97 Item 2 letras C.D.E.F.H), este CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que ocorram ou alterem o curso normal da pesquisa, (Res. CNS/MS 196/96 Item V.4 e Res. 346 Item II 5ª). É papel do (a) Pesquisador (a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a **evento adverso grave ocorrido**, (mesmo que tenha sido em outro centro), e enviar notificação ao CEP com seu posicionamento científico-profissional, (Res. 346 Item II N.º 5a). Deve também encaminhar ao CEP **relatórios trimestrais** ou **semestrais** sobre o andamento (de acordo com o tempo de duração da mesma), e o **final, completo**, ao seu término da pesquisa, quando não demarcadas datas específicas.

Eventuais modificações ou emendas ao Protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando individualmente a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas enviá-las, junto ao Parecer Aprobatório do 1.º CEP quando for o caso, para serem anexadas ao Protocolo inicial, (Res. CNS/MS 251/97 – Item III.2 e Res. 346 Item III N.º 4 letra a, b).

Este CEP deverá ser informado quando da inclusão do primeiro paciente. Além do relatório final, ao término da pesquisa/estudo, parciais devem ser apresentados *a cada semestre*.

Em 12/02/2006

Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata,
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP/MCO/UFBA.

VIDE VERSO →

Disposições que Assistem os Direitos do Consumidor (“Sujeitos da Pesquisa”).

Constituição Federal Brasileira (1988) — em particular art. 5.º, incisos X e XIV ; Código Civil — arts. 20 - 21; Código Penal — arts. 153 - 154; Código de Processo Civil — arts. 347, 363 e 406; Código de Defesa do Consumidor — arts. 43 - 44; Medida Provisória 2.200-2, de 24 de Agosto de 2001; Resoluções da ANS. (Lei 9.961 de 28/01/2000) em particular a RN n.º 21; Código de Ética Médica CFM arts. 11, 70, 102, 103, 105, 106 e 108; Resoluções do CFM N.ºs 1605/2000, 1.638/2002, 1.642/2002; Padrões de Acreditações hospitalares do Consórcio Brasileiro de Acreditação, em particular, GI.2 – GI 1.12; Parecer CFM N.º 08/2005; Normas da Instituição quanto ao acesso ao prontuário. Considera-se, ainda, essencial, para a preservação e proteção do sujeito da pesquisa, a anuência do médico responsável pelo paciente e da autoridade responsável pelos prontuários.

ANEXO C – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (RECOMENDAÇÕES)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À EVOLUÇÃO E RESPOSTA AO TRATAMENTO DA HEPATITE CRÔNICA C

Durante a leitura do documento abaixo fui informado (a) que posso interromper para fazer qualquer pergunta com objetivo de tirar dúvidas e ter melhor esclarecimento

Posso também levar para casa para leitura mais detalhada antes de assinar.

EU,-----fui convidado(a) por membro da equipe de Pesquisa do Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia a participar de um projeto sobre a importância dos exames de laboratório na hepatite crônica C, coordenado pelo Prof. Dr. André Castro Lyra.

O objetivo do projeto é analisar um segmento dos genes de algumas citocinas, substâncias produzidas pelas células do sistema imune que são liberadas na corrente sanguínea e fazem parte da resposta imunológica (sistema de defesa do organismo), com função de destruir células quando infectadas por vírus ou outros microorganismos intracelulares. O estudo irá analisar se os referidos genes podem determinar uma predisposição ao tipo de evolução clínica ou de resposta ao tratamento da minha condição clínica (hepatite C). Esta predisposição não seria o único fator determinante da minha doença, nem o mais importante.

Durante a pesquisa, um membro da equipe coletará dados pessoais meus e amostra de sangue para realização de exames laboratoriais. A retirada de sangue da veia será feita com material inteiramente descartável e poderá causar dor de fraca intensidade ou pequena equimose que geralmente desaparece depois. O DNA extraído do sangue será utilizado exclusivamente para fins de pesquisa clínica, sendo identificados apenas por um código.

Claudiana Lins dos Santos
Secretaria Administrativa
CEAD/UFBA



Terei o direito de saber os resultados desta pesquisa, os quais somente serão divulgados em revistas científicas nacionais ou internacionais, documentos de trabalhos, relatórios congressos científicos etc., mas a equipe médica garantiu-me que jamais poderei ser identificado(a) como participante desta pesquisa, mantendo sigilo absoluto sobre meus dados.

Caso não queira participar ou queira desistir do estudo, não terei nenhum prejuízo algum. Se aceitar, surgindo alguma dúvida, ela poderá ser esclarecida pessoalmente no Serviço de Gastroenterologia do Hupes no Ambulatório Magalhães Neto, terça-feira, das 15-17h., Assim, considero-me satisfeito (a) com as explicações dadas e concordo em participar como voluntário. Atesto que a autora e/ou membro da equipe leu esse documento e esclareceu as minhas dúvidas e como tem a minha concordância para participar do estudo coloquei a minha assinatura (ou impressão digital).

Salvador(BA) _____ de _____ 200_

Assinatura do voluntário

Assinatura pesquisador

~~Cláudia Diniz dos Santos
Secretária Administrativa
CLÁUDIA DINIZ DOS SANTOS~~

