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

MILENA SANTANA CABRAL

CÉLULAS TH17 NA HEPATITE C CRÔNICA

Salvador, BA
2017

MILENA SANTANA CABRAL

CÉLULAS TH17 NA HEPATITE C CRÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta
Co-Orientação: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta

Salvador, BA
2017

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Santana Cabral, Milena
Células Th17 na Hepatite C Crônica / Milena Santana Cabral. -- Salvador, 2017.
79 f. : il

Orientadora: Maria Luiza Brito de Sousa Atta.
Coorientador: Ajax Mercês Atta.
Tese (Doutorado - Doutorado em Imunologia) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

1. Hepatite C. 2. Th17. 3. IL-17A. 4. IL-17F. 5. IL-21. I. Brito de Sousa Atta, Maria Luiza. II. Mercês Atta, Ajax. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu suporte no momento mais difícil desta caminhada, me ajudando a continuar e permanecer firme no meu propósito.

A minha mãe Angélica, exemplo de mulher, de mãe e de profissional, sendo meu grande orgulho. É meu apoio, meu braço direito, minha admiradora maior, meu sim, quando tudo parecia dizer não.

A meu pai, que por mais distante que possa estar fisicamente, acredita com muita fé no meu sucesso. Eu sou o seu grande orgulho.

À professora Maria Luiza, por estar presente durante toda esta jornada, mesmo com todas as adversidades da vida, acreditando e impulsionando-me a ser uma profissional melhor.

Ao professor Ajax, que nos ensina dia a dia a sermos líderes, pesquisadores e professores.

À minha amiga, irmã, parceira, companheira fiel, Mariana. Sem você, a execução deste trabalho seria árdua. Mas com seu apoio incondicional, tudo pareceu mais leve e possível.

À Ana Paula e Taciana, que fizeram todas as dificuldades parecerem menores. Foram verdadeiras amigas, socorros nos momentos mais difíceis e grandes contribuições para a realização desta tese.

À Isabela e Iza, minhas companheiras do dia a dia, que me ajudaram a suportar todas as dificuldades e me ajudaram a crescer.

Às mais recentes moradoras do meu coração: Mônica, por todo apoio na execução deste trabalho, companheirismo e dedicação e Taiana, pela alegria e incentivo.

À toda família DILDA/LAPIM, que ajudei a construir ao longo desses 11 anos e que fez valer a pena todos os momentos.

Ao Instituto de Ciências da Saúde-ICS (UFBA) e aos grandes professores do curso de Pós-Graduação em Imunologia por ter me proporcionado grandes momentos de aprendizado.

Ao Dr. Raymundo Paraná e Dra. Maria Izabel Schinoni pela colaboração para realização deste trabalho e aos pacientes do Ambulatório Magalhães Neto e HUPES, assim como os pacientes do Hospital Manoel Vitorino que, voluntariamente, participaram desse estudo juntamente com a colaboração de Dra. Rosimeire Dourado.

Ao Biomédico Geraldo Pedral pela gentil colaboração e treinamento em Citometria de Fluxo.

À FAPESB pelo auxílio financeiro concedido a mim.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto (Processo 477008/2013-5).

RESUMO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) é um problema grave de saúde pública. O envolvimento das respostas imunes do hospedeiro está intimamente associado à persistência viral, à evolução para a cronicidade, assim como a ocorrência de lesão hepática. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o papel de populações linfocitárias, especialmente as células Th17, em relação à sua frequência e resposta funcional, em pacientes com infecção crônica pelo VHC, genótipo 1, sem tratamento antiviral e comparar após 12 semanas de tratamento antiviral, com pacientes não-respondedores, assim como indivíduos sadios. Para a avaliação da frequência das populações celulares, foi utilizada citometria de fluxo (FACS Canto II) e anticorpos monoclonais específicos. Foi realizada a análise da produção de citocinas associadas ao perfil Th17, por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com hepatite C crônica, estimuladas com antígenos do VHC. Detectou-se que a infecção crônica pelo vírus da hepatite C (genótipo 1) apresentou frequência mais baixa de células Th17 no sangue periférico do que indivíduos sadios e, aparentemente, esta alteração celular não está relacionada com a carga viral ou lesão hepática. Em relação à produção *ex-vivo* de citocinas associadas ao perfil Th17, identificou-se que os pacientes não tratados apresentaram uma produção de IL-17A, em resposta ao estímulo *in vitro* pelas células estimuladas com o antígeno do Core e o antígeno NS3 do VHC. Contudo, os indivíduos não-respondedores produziram IL-17A e IL-17F apenas para o estímulo do Core, evidenciando, portanto, uma diferença na elaboração da resposta imune, por estes pacientes.

Palavras-chave: Hepatite C, Th17, IL-17A. IL-17F. IL-21.

ABSTRACT

Chronic infection with the hepatitis C virus (HCV) is a serious public health problem. Involvement of immune responses of the host is closely associated with viral persistence, evolution to chronicity, as well as the occurrence of liver injury. The aim of this study was to evaluate the role of lymphocyte subsets, especially Th17 cells, in relation to their frequency and function, in patients with chronic HCV infection, genotype 1, without antiviral treatment, and to compare after 12 weeks of antiviral treatment, with non-responders patients, as well as healthy individuals. For the evaluation of the frequency of cell subpopulations, flow cytometry (FACS Canto II) was used and specific monoclonal antibodies. It was made the analysis of the production of cytokines associated to the Th17 profile by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with chronic hepatitis C, stimulated with HCV antigens. Chronic infection by hepatitis C virus (genotype 1) was found to have a lower frequency of Th17 cells in the peripheral blood than healthy individuals, and apparently, this cellular change is not related to viral load or liver injury. Regarding the *ex vivo* production of cytokines associated with the Th17 profile, untreated patients were found to have IL-17A in response to stimulation in vitro by cells stimulated with the HCV Core and NS3 antigens. However, non-responders produced IL -17A and IL-17F only for the Core stimulus. This shows, therefore, a difference in the development of the immune response for these patients.

Keywords: Hepatitis C, Th17, IL-17A, IL-17F, IL-21

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 Citometria de fluxo ("gates") para determinação de linfócitos Th17 ($CD3_+CD4_+CD161_+IL\text{-}17A_+$). a) Seleção de linfócitos do sangue periférico, identificados por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). b) Seleção de linfócitos T. c) Seleção de linfócitos T $CD4^+$. d) Seleção de linfócitos T $CD4^+CD161^+$. e) Seleção de linfócitos T $CD4^+CD161^+$ secretores de IL-17A (Q2). 45

ARTIGO 2

Figura 1 Produção de IL-17A em CMSP de pacientes com HCC não tratados (T0) (n=18), indivíduos que apresentaram resposta virológica precoce (RVP) na 12ª semana de tratamento antiviral (n=15) e de pacientes não respondedores a esta terapia (n=10). Os níveis de IL-17A foram determinados nos sobrenadantes da cultura de CMSP não estimuladas e estimuladas com antígenos do core do VHC e as proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 (mostradas como mediana e intervalo interquartil). Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando células não estimuladas como controle da ausência de estimulação antigênica (SE) *p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001. 62

Figura 2 Produção de IL-17F em CMSP de pacientes com HCC não tratados (T0) (n=18), indivíduos que apresentaram resposta virológica precoce (RVP) na 12ª semana de tratamento antiviral (n=15) e de pacientes não respondedores a esta terapia (n=10). Os níveis de IL-17F foram determinados nos sobrenadantes de culturas de CMSP não estimuladas e estimuladas com antígenos do core do VHC e proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5. Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando células não estimuladas como controle da ausência de estimulação antigênica. As barras representam mediana e intervalo interquartil, ** p <0,01. 63

Figura 3 A produção de IL-21 em CMSP de pacientes com HCC não tratados (T0) (n=18), indivíduos que apresentaram resposta virológica (RVP) na 12ª semana de tratamento antiviral (n=15) e de pacientes que não respondedores (NR) a esta terapia (n=10). Os níveis de IL-21 foram determinados nos sobrenadantes das culturas de CMSP não estimuladas e estimuladas com antígenos do core do VHC e as proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 (mostradas como mediana com intervalo interquartil). Análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando células não estimuladas como o controle da ausência de estimulação antigênica. 64

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Características demográficas, virológicas e clínicas de pacientes com hepatite C crônica (HCC) não-tratada e pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (NR).	46
Tabela 2	Achados laboratoriais em pacientes com hepatite C crônica (HCC) não-tratada e pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (NR).	47
Tabela 3	Proporção e contagem absoluta das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica (HCC) não-tratada, pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (NR) e indivíduos saudáveis (controles).	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A0 – Atividade necroinflamatória grau 0 (ausência de atividade necroinflamatória hepática)

A1 – Atividade necroinflamatória grau 1

A2 – Atividade necroinflamatória grau 2

AA – Aminoácido

ALT – Alanina aminotransferase

AML – Anticorpo antimúsculo liso

ANA – Anticorpo antinuclear

Anti-CCP – Anticorpo anti-peptídeo cíclico citrulinado

Anti-CD161 – Anticorpo monoclonal anti-CD161 (clone de diferenciação 161)

Anti-CD3 – Anticorpo monoclonal anti-CD3 (clone de diferenciação 3)

Anti-CD4 – Anticorpo monoclonal anti-CD4 (clone de diferenciação 4)

Anti-IL-17A – Anticorpo monoclonal anti-IL-17A (interleucina 17A)

Anti-VHC - Anticorpo específico contra o vírus da hepatite C

APC – Aloficocianina

AST – Aspartato aminotransferase

CCR4 – Receptor de quimiocina do tipo 4

CCR6 – Receptor de quimiocina do tipo 6

CD161 – Clone de diferenciação 161

CD25 – Clone de diferenciação 25

CD81 – Clone de diferenciação 81

CDC – Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos

CEP-HUPES – Comitê de ética do Hospital Professor Edgar Santos

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Core – Proteína estrutural do vírus da Hepatite C presente no nucleocapsídeo

CXCL8 – Quimiocina precursora da IL-8

E1 – Glicoproteína 1 de superfície do envelope lipídico do vírus da hepatite C

E2 – Glicoproteína 2 de superfície do envelope lipídico do vírus da hepatite C

ELISA – Enzima imunoensaio

EUA – Estados Unidos da América

F0 – Estadiamento de fibrose grau 0 (ausência de fibrose hepática)

F1 – Estadiamento de fibrose grau 1

F2 – Estadiamento de fibrose grau 2

F3 – Estadiamento de fibrose grau 3

F4 – Estadiamento de fibrose grau 4 (cirrose hepática)

FDA - Food and Drug Administration (Estados Unidos da América)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FOXP3 – Fator de transcrição intracelular para a diferenciação de células T regulatórias

FR – Fator Reumatóide

Gen 1 – Genótipo do tipo 1 do vírus da hepatite C

HCC – Hepatite C crônica

Hep-2000 – Células epiteliais humanas 2000

HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazina ácido etanosulfônico (tampão)

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HTLV – Vírus Linfotrópico da Célula Humana

IFAT – Técnica de Imunofluorescência Indireta

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN – Interferon

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G do subtipo 1

IgG3 – Imunoglobulina G do subtipo 3

IgM – Imunoglobulina M

IL– Interleucina

ILC's 3 – Células residentes do fígado do tipo 3

iNKT – Células Natural Killer invariante

IPS-1 – Proteína adaptadora do promotor de interferon-1

IRF4 – Fator 4 Regulador do Interferon

KDa – Kilodálton

LTi – Células indutoras do tecido linfóide

MASV – Sinalização antiviral mitocondrial

METAVIR – Algoritmo para estadiamento da fibrose/atividade necroinflamatória hepática

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NK – Células Natural Killer

NKT – Linfócito T natural killer

NOSA – Autoanticorpos não-órgão específicos

NR – Paciente Não-respondedor à terapia antiviral para hepatite C

NS– Proteína não-estrutural, presente no vírus da Hepatite C

OMS – Organização Mundial da Saúde

P7 – Proteína 7 de membrana, do tipo viroporina, presente no vírus da Hepatite C

PE – Ficoeritrina

PE-CY5 – Ficoeritrina cianina-5

PerCP-CyTM 5.5 – Proteína peridinina-clorofila 5.5

PHA – Fitohemaglutinina

PKR – Proteína quinase R

PMA – 12-Miristato 13-Acetato de Forbol

RIG-I – Gene I induzível do ácido retinóico

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

ROR – Receptor órfão relacionado ao ácido retinóico

ROR-c – receptor órfão relacionado ao ácido retinóico do tipo c

ROR-$_{\gamma}$t – receptor órfão relacionado ao ácido retinóico do tipo $_{\gamma}$t

RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura para células) 1640

RRPs – Receptores de reconhecimento de padrões

RVP – Resposta Virológica Precoce

RVS – Resposta Virológica Sustentada

SRB1 – Receptor do tipo Scavenger B1

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador 3 de transcrição

SUS – Sistema Único de Saúde

T0 – Tempo zero (pacientes não tratados)

TCD4^{+} – Linfócito T CD4^{+} ou linfócito T auxiliar

TCD8^{+} – Linfócito T CD8^{+} ou linfócito T citotóxico

TGF-β – Fator transformador de crescimento β

Th – Linfócitos T auxiliares ou T *helper*

Th1 – Linfócitos T *helper* ou auxiliar 1

Th17 – Linfócitos T *helper* 17

Th2 – Linfócitos T *helper* ou auxiliar 2

Th22 – Linfócitos T *helper* 22

TLR-3 – Receptor *toll-like* do tipo 3

TNF-α – Fator de necrose tumoral-alfa

Treg – Linfócitos T regulatórios

Tγδ – Linfócitos T gama delta

UV – Ultravioleta

VHC – Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO GERAL**	13
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	15
2.1	Hepatite C – A doença	15
2.2	O diagnóstico	18
2.3	O vírus	18
2.4	Tratamento na Hepatite C crônica	21
2.5	Resposta Imune na Hepatite C crônica	25
2.6	Caracterização das Células Th17	28
2.7	O papel das Células Th17 na Hepatite C crônica	31
3	**HIPÓTESE E OBJETIVOS**	34
4	**CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Células Th17 na Hepatite C crônica: Envolvimento com Autoimunidade, Viremia e Lesão hepática.**	35
4.1	Introdução	35
4.2	Material e métodos	36
4.3	Resultados	39
4.4	Discussão	40
4.5	Referências	42
4.6	Conclusões	48
5	**CAPÍTULO 2 Artigo Científico 2: Resposta imune de citocinas associadas à Th17 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite C.**	49
5.1	Introdução	50
5.2	Material e Métodos	51
5.3	Resultados	53
5.4	Discussão	55
5.5	Referencias	58
6	**CONCLUSÃO GERAL**	65
7	**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	66
8	**ANEXOS**	75

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em pleno século XXI, o mundo passa por uma revolução tecnólogica, com avanços substanciais em diversas áreas e um ganho inigualável no que diz respeito às conquistas materiais, sociais e intelectuais. No âmbito da saúde, tem-se observado uma riqueza de conhecimento sobre as mais diversas doenças existentes, como também, um advento de ferramentas diagnósticas e drogas terapêuticas que vem solucionando, ou ao menos, se aproximando da resolução e cura de muitas delas.

A hepatite C é considerada hoje uma doença de grande alcance mundial. Aproximadamente 185 milhões de pessoas em todo mundo são acometidas por essa enfermidade, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estando associada a alta taxa de morbimortalidade. É a causa líder de hepatite crônica, cirrose, carcinoma hepático e de indicação primária para transplante de fígado. Além disso, o elevado número de novos casos em adultos jovens têm levado à corrida mundial para estudar e entender melhor essa doença (ALLISON et al., 2016; FOSTER et al., 2012; GUIDO, M.; MANGIA, A.; FAA, 2011; WARD, 2014a).

Apesar da gravidade e de ser considerada um problema de saúde pública, a hepatite C é uma das doenças infecciosas com grande perspectiva de cura. Isto se deve aos novos medicamentos que atuam de forma eficiente, em menos tempo, e com menos eventos adversos para o paciente: são as novas drogas antivirais que agem diretamente sobre o vírus e que são consideradas medidas de intervenção terapêutica que trazem uma esperança realista e otimista para a população acometida (DUSHEIKO, 2017; GREBELY; DORE, 2011). Depois de um período de 20 anos, sem qualquer novidade terapêutica para a hepatite C, hoje vivencia-se um grande momento de conquistas e expectativas para um novo futuro.

Tendo em vista a evolução meteórica atual no campo das ciências da saúde e, principalmente, na hepatite C, comunidades médicas e de pesquisas internacionais têm combinado seus esforços no diagnóstico, tratamento e prevenção da propagação dessa infecção. Para avaliar a capacidade dessas terapias em conter essa infecção, é necessário um conhecimento mais aprofundado da resposta imune do hospedeiro frente ao vírus, para o sucesso da terapia medicamentosa e, consequentemente, para a obtenção da cura total da hepatite C.

Há alguns anos, com a caracterização do distinto grupo de células T auxiliares, denominadas células Th17, tem-se demonstrado importante envolvimento dessas células na patogênese de doenças hepáticas, como a hepatite C, regulando a imunidade inata e adaptativa

(FOSTER et al., 2012). Assim, as células Th17 têm sido cada vez mais estudadas e têm fornecido novas descobertas dentro dos mecanismos que são importantes no desenvolvimento de autoimunidade e na defesa antimicrobiana do hospedeiro.

Achados preliminares do nosso grupo, envolvendo citocinas séricas do perfil Th17, indicaram a necessidade de continuidade das pesquisas sobre a participação das células Th17 na imunopatogênese da hepatite C crônica (SOUSA eta l., 2012).

Atualmente, sabe-se que o vírus da hepatite C pode induzir uma resposta específica de células Th17, onde o grau de inflamação hepática foi diretamente correlacionado com a infiltração dessas células (CHANG et al., 2012; FOSTER et al., 2012; TU et al., 2011; VAN DE VEERDONK et al., 2009). Além disso, a participação de citocinas deste perfil tem sido demonstrada em envolvimento com a resposta ao tratamento antiviral para essa doença (BOWEN, 2012).

Em termos de hepatite viral, o papel das células Th17 tem sido melhor estudado nas infecções crônicas pelo vírus da hepatite B; enquanto que essa resposta imune na infecção pelo vírus C é menos caracterizada. No entanto, dado o aparente papel das células Th17 em múltiplas doenças imunes e em outras condições inflamatórias, torna-se também importante estudar esse perfil celular nas respostas desencadeadas na infecção pelo vírus da hepatite C.

Os estudos que estão sendo realizados atualmente ainda exibem diversas controvérsias que necessitam ser melhor esclarecidas, principalmente em relação ao papel das células Th17 no tratamento dos pacientes e no *clearance* viral. Este trabalho, se propõe a caracterizar o perfil destas células Th17, na infecção crônica pelo VHC, ampliando estes estudos nos diversos grupos populacionais, sabendo-se que as características genéticas do hospedeiro interferem no desenvolvimento de várias doenças, e contribuindo para o conhecimento da imunopatogenia da hepatite C crônica, na nossa população.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HEPATITE C – A DOENÇA

A hepatite C é uma doença infecciosa de grande amplitude mundial, causada pelo vírus da hepatite C (VHC), caracterizando-se, atualmente, como um problema de saúde pública emergente. É uma doença que se apresenta de forma silenciosa, permanecendo completamente assintomática por um longo período de tempo. Isso faz com que muitos casos não sejam diagnosticados, inviabilizando, assim, um tratamento precoce, além de favorecer a ampla disseminação do vírus.

A hepatite C crônica (HCC) é hoje uma das principais causas de doenças do fígado, em estágios avançados, assim como vem sendo associada às causas de morte relacionadas a este órgão. Esta doença vem ganhando bastante notoriedade no cenário mundial, visto à rápida ampliação do número de casos e importante gravidade. Dados já vêm relatando uma estimativa da ocorrência de carcinoma hepático na Europa e EUA, com um pico por volta do ano de 2020, com uma incidência aproximada de 78.000 e 27.000 novos casos, respectivamente (ATTAR et al., 2016). Devido a isso, diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de elucidar questões ainda não bem compreendidas, principalmente no que dizem respeito às respostas imunes do hospedeiro frente à infecção, e a sua forma de alcançar a eliminação viral, junto com os novos tratamentos.

Devido ao contínuo aumento no número de pacientes infectados, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem reconhecido a hepatite C como um dos principais problemas de saúde do mundo, sendo que hoje o VHC é considerado o patógeno de origem sanguínea mais comum (MUKHERJEE et al., 2014; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014). Em função disto, várias estratégias epidemiológicas e de intervenção estão sendo realizadas para prevenção e controle da doença na tentativa de reduzir a sua propagação (JAROSZEWICZ et al., 2015).

Em relação à epidemiologia da doença, estimativas mais recentes mostram uma soroprevalência (presença do anti-VHC) estimada em 1,6% (variando entre 1,3-2,1%), o que equivale a mais de 115 milhões de pessoas infectadas mundialmente (MANNS et al., 2017). Adicionalmente, mais de 350.000 morrem a cada ano por causas relacionadas à infecção pelo VHC, principalmente associadas à ocorrência de hepatocarcinoma, o qual é estimado em aproximadamente 3% ao ano (ABDELRAHMAN et al., 2015; DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; ZIGNEGO; GIANNINI; GRAGNANI, 2012). Nos EUA, aproximadamente 3 milhões de pessoas estão vivendo infectadas por esse vírus, sendo 76%

delas nascidas entre 1945-1965, refletindo a substancial incidência da infecção antes da descoberta do vírus (WARD, 2014).

Algumas diferenças de faixa etária em pacientes infectados têm sido observadas, mostrando que apesar da grande maioria estar acima dos 40 anos (infecção na década de 70-80), hoje indivíduos mais jovens têm sido diagnosticados como portadores do VHC. Isso demonstra duas situações: a questão da notificação, que hoje vem sendo feita com mais frequência e, apesar de toda divulgação sobre vias de transmissão e prevenção, o compartilhamento de drogas injetáveis tem sido uma das principais rotas da infecção na atualidade. Países desenvolvidos como EUA, Austrália e vários do Oeste Europeu, como França e Suíça, apesar da baixa prevalência em geral, têm seus números de indivíduos infectados cada vez mais elevados nas faixas etárias mais jovens (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013).

De acordo com a OMS, o Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10%, o que equivale a mais de 2,5 milhões de pessoas infectadas. Dados nacionais demonstraram um número inferior ao relatado pela OMS, onde 1,4 a 1,7 milhões de brasileiros estariam infectados cronicamente pelo vírus da hepatite C. Além disto, de acordo com o Ministério da Saúde, a transmissão da hepatite C está estável no Brasil, em termos de número de casos novos diagnosticados por ano, no período entre 2004 e 2014, à exceção de 2013 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

As regiões Sudeste e Sul concentram 86% dos casos notificados de hepatite C no Brasil, sendo a Região Sudeste responsável por 60% dos casos, porém, o número exato de pessoas vivendo com o vírus é desconhecido. Na Bahia, a ocorrência de hepatites virais vêm declinando nos últimos anos, em que o número de casos de 346 em 2010 reduziu para 234 em 2011; e o VHC foi o segundo agente etiológico causador das hepatites virais no estado (LAMPE et al., 2013; SECRETARIA DA SAÚDE. GOVERNO DA BAHIA (SESAB), 2011). No Brasil como um todo, estimou-se uma prevalência total, até o ano de 2014, um número de 1.450.000 casos de hepatite C crônica (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015).

A hepatite se desenvolve após o VHC infectar os hepatócitos, induzindo uma reação necroinflamatória hepática e um stress oxidativo relacionados às respostas imunes do hospedeiro, frente aos epitopos virais. As consequências dessa infecção, a longo prazo (aproximadamente 20 anos após a infecção), vão desde alterações mínimas, à hepatite crônica,

cirrose e carcinoma hepatocelular (JO et al., 2015; MANNS et al., 2017). Aproximadamente 80% dos indivíduos infectados desenvolvem a infecção crônica, sendo que destes, 20% desenvolvem uma forma mais grave, apresentando complicações hepáticas como fibrose, carcinoma hepatocelular, cirrose e doença hepática terminal (ISHII; KOZIEL, 2008; MUKHERJEE et al., 2014).

Quanto ao processo agudo, este é limitado e geralmente assintomático, raramente causando insuficiência hepática; enquanto que a infecção crônica é considerada como a terceira causa líder de óbitos em pacientes com doenças hepáticas terminais, propiciando assim, um maior risco de morte em relação à infecção aguda. Dados da OMS corroboram esta informação, mostrando que cerca de 3% da população mundial encontra-se hoje, cronicamente infectada por este vírus, o que é um número bastante expressivo, incluindo desde infecções passadas até as infecções atuais (DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; FOSTER et al., 2012; HAO et al., 2014).

O VHC é conhecido também por ser responsável tanto por manifestações hepáticas quanto extra-hepáticas. Estas últimas são encontradas de forma bastante prevalente, sendo que de acordo com alguns estudos, 40 a 74% dos pacientes apresentam, ao menos, uma manifestação extra-hepática. Dentre estas estão: manifestações de pele tais como a psoríase; presença de complexos imunes circulantes, que podem levar às vasculites e glomerulonefrites; desordens autoimunes como a síndrome sicca, tireoidites, artrite, desordens linfoproliferativas e produção de autoanticorpos não-órgão específicos (NOSA), dentre estes, as crioglobulinas como manifestação mais frequente (ALESSANDRA; RICCARDO; PUOTI, 2007; CAULA et al., 2008; DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; FALLAHI et al., 2012; FERREIRA, 2004; FERRI et al., 2015; TABARKIEWICZ et al., 2015; ZIGNEGO; GIANNINI; GRAGNANI, 2012). Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa evidenciaram cerca de 80% de NOSA, em portadores de hepatite C crônica (ATTA et al., 2006). Além disso, mais recentemente, tem-se mostrado uma forte associação entre a hepatite C e os processos aterogênicos (como outra manifestação extra-hepática), sendo a infecção um fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (PETTA, 2017; VOULGARIS; SEVASTIANOS, 2016).

2.2 O DIAGNÓSTICO

A fase inicial da infecção pelo VHC ou hepatite C aguda, dura aproximadamente seis meses após contágio, podendo ou não ter sinais e/ou sintomas clínicos. No entanto, a forma sintomática, nesses casos, ocorre em cerca de 5-30% dos infectados, geralmente ocorrendo entre 5 a 12 semanas após exposição com duração de 2-12 semanas. Dentre os sintomas que podem surgir estão a letargia, mialgia, fadiga e icterícia; todos sintomas inespecíficos que dificultam o diagnóstico da hepatite C (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013).

A infecção inicial é caracterizada pela detecção do vírus na corrente sanguínea dentro de 22-30 dias após exposição, aumento dos níveis das enzimas aminotransferases hepáticas (alanina aminotransferase ou ALT e a aspartato aminotransferase ou AST), além de um gradual aparecimento de anticorpos específicos contra o vírus C (anti-VHC), dentro de 15-150 dias (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013; ISHII; KOZIEL, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, 2015).

O diagnóstico para a hepatite C é inicialmente realizado através de ensaios sorológicos que detectam anticorpos contra o VHC, seguido de ensaios moleculares confirmatórios de detecção e quantificação do RNA viral naqueles pacientes que foram positivos para o anti-VHC. Em agosto de 2012, o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) recomendou que todas as pessoas nascidas entre 1945 e 1965 deveriam ser testadas sorologicamente, pelo menos uma vez, para hepatite C, mesmo sem apresentar quaisquer fatores de risco (DUDDEMPUDI; BERNSTEIN, 2014; MANNS et al., 2017; MUKHERJEE et al., 2014).

2.3 O VÍRUS

O vírus da hepatite C, descoberto em 1975 e publicado em 1989 pelo grupo de Houghton, pertence ao gênero *Hepacivirus*, da família *Flaviviridae*, sendo um vírus RNA envelopado de fita simples, classificado em 7 genótipos confirmados principais (1 ao 7). Estes ainda são subdivididos em 67 subtipos, sendo os tipos de 1-6 os mais estudados (CHAIWONG; SISTAYANARAIN, 2016; CHOO et al., 1989; HOUGHTON, 2009; WANG, LAN S, D'SOUZA, LIONEL S, JACOBSON, 2016; WARD, 2014b). Além disso, apresenta uma divergência sequencial genotípica de 30% e 20% em relação aos seus subtipos. Esse grau de diversidade genética é o resultado da combinação de processos evolucionários, como o acúmulo de mutações resultantes de altas taxas de erro da ação da RNA polimerase

dependente de RNA, assim como da associação com fatores do hospedeiro humano e da própria seleção natural (ESCOBAR-GUTIERREZ et al., 2013; HEDSKOG et al., 2015; KOUTSOUDAKIS; FORNS; PÉREZ-DEL-PULGAR, 2013; LAMPE et al., 2013; SMITH et al., 2014).

Com uma alta taxa de replicação, o vírus pode produzir aproximadamente de 10^{10} a 10^{12} virions por dia dentro de um indivíduo infectado, resultando em um amplo número de variantes virais (PLAUZOLLES et al., 2013). Esta variabilidade genética do vírus implica na sua habilidade de sobreviver à ação do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo rápida adaptação e facilidade de evasão da resposta imune. Isso acaba explicando as altas taxas de cronicidade observadas nessa infecção, além da possibilidade de reinfecção por subtipos diferentes em um mesmo indivíduo (BARTH, 2015; ESCOBAR-GUTIERREZ et al., 2013; LAUER GM, 2001).

No Brasil, as cepas mais prevalentes são do genótipo 1 (50-78%) e 3 (11-43%), dados estes que corroboram achados de trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (67% e 25%, respectivamente). Além disso, os genótipos podem variar em diferentes proporções, dependendo da região geográfica, da variabilidade temporal, modos de transmissão e da variabilidade étnica (CABRAL, 2011; HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013; LAMPE et al., 2013).

O VHC é um vírus pequeno, esférico, envolto por um envelope lipídico icosaédrico. Possui, aproximadamente, 65 nm e apresenta um genoma de RNA contendo 9,6 Kb, o qual apresenta estruturas não traduzidas contendo regiões para inserção de ribossomos, direcionando a tradução do genoma em proteínas importantes para a replicação e manutenção do vírus no hospedeiro. Estas incluem o que se chamam de proteínas estruturais (Core, E1 e E2), obtidas após clivagem por enzimas do hospedeiro, uma proteína que atua como canal iônico (p7) e as não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), as quais são formadas após clivagem de enzimas do próprio vírus. Com toda esta estrutura, pode-se dizer que é um vírus resistente, podendo viver no meio ambiente, em superfícies, por mais de 16 horas, ou até mesmo por 4 dias (KOUTSOUDAKIS; FORNS; PÉREZ-DEL-PULGAR, 2013; MANNS et al., 2017; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014; WEISER; TELLINGHUISEN, 2012).

O envelope lipídico, que reveste o vírus e seu genoma, é composto pelas proteínas estruturais e pelo capsídeo que contém a proteína core, sendo esta, o seu principal componente. Esta proteína tem papel importante na ligação do RNA viral com o hospedeiro e na formação e montagem de novos “virions”. Já as proteínas estruturais E1 e E2 são do tipo

glicoproteínas importantes para a interação do vírus com as células do hospedeiro, onde a E2 permite a entrada do vírus na célula (através do receptor CD81 e receptor scavenger B1/SRB1) enquanto que a E1 dá suporte, orientação e sustentabilidade para a função da E2. Além disso, a E2 contém duas regiões hipervariáveis consideradas como a porção do genoma do VHC mais variável geneticamente. Isto, por sua vez, acaba facilitando a evasão do vírus das respostas imunes do hospedeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, 2015; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014; TANG; GRISÉ, 2009; WEISER; TELLINGHUISEN, 2012).

Por definição, as proteínas não-estruturais são expressas nas células infectadas, mas não são incorporadas na partícula viral. Elas servem para coordenar os aspectos intracelulares da replicação, incluindo a síntese de RNA, modulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e montagem da partícula viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, 2015). Sabe-se, portanto, que têm um papel crucial no ciclo de vida do vírus, sendo essenciais na replicação e transcrição do genoma viral, atuando como peças chaves, inclusive para o tratamento antiviral (SESMERO; THORPE, 2015).

Quanto à p7, esta é uma proteína hidrofóbica, pequena, do tipo “viroporina”, ou seja, tem a função de se polimerizar para formar canais de cálcio transmembrana. Participa da fase final de montagem de novos virions, assim como na sua maturação e liberação; no entanto, não é requerida para a replicação do RNA do VHC (ISHII; KOZIEL, 2008; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014; TANG; GRISÉ, 2009; WEISER; TELLINGHUISEN, 2012).

A NS2 possui atividade de protease autocatalítica, clivando as junções NS2-3, liberando a protease da NS3, e permitindo assim, a replicação do vírus e, consequentemente, a sua infectividade. Um fato importante da NS2 em realizar esta clivagem de forma rápida é que permite uma replicação também mais rápida; dessa maneira, impede o desenvolvimento de drogas que inibam sua atividade (WEISER; TELLINGHUISEN, 2012). Entretanto, assim como a p7, a NS2 não é requerida para a replicação do RNA, mas, ao menos *in vitro*, mostra-se vital para a produção de novos virions infecciosos (TANG; GRISÉ, 2009).

A NS3 tem função de serina protease e helicase de RNA. Possui atividade na clivagem viral (processamento da poliproteína do VHC), tendo importante papel para o escape do vírus do sistema imune. Ambas funções são moduladas pela NS4, sendo essenciais para a replicação do vírus. Nesse complexo enzimático NS3-NS4 multifuncional, a NS3 promove a atividade enzimática funcional e a NS4A funciona como um cofator para essas funções. Assim, pode-se dizer que a NS3 cliva as junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A,

NS5A/NS5B. Além disso, a NS4A atua como “âncora” de membrana para o ataque da NS3 à membrana celular do hospedeiro. Já a NS4B é uma proteína integral de membrana que atua na formação do sítio de replicação do vírus no hospedeiro, formando uma rede membranosa derivada do retículo endoplasmático rugoso da célula do hospedeiro, onde as proteínas irão se associar para replicar o vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, 2015; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014; TANG; GRISÉ, 2009; WANG, LAN S, D’SOUZA, LIONEL S, JACOBSON, 2016; WEISER; TELLINGHUISEN, 2012).

A NS5A não tem papel definido no ciclo de vida do vírus, mas é essencial para a sua replicação e montagem, além de possuir uma função reguladora desses eventos. Quanto à sua definição, é uma RNA polimerase dependente do RNA viral que é absolutamente requerida para a sua replicação durante o processo de iniciação (CHAIWONG, SURIYA AND SISTAYANARAIN, ANCHALEE, 2016; WEISER; TELLINGHUISEN, 2012).

Todas essas proteínas são possíveis alvos de drogas terapêuticas antivirais; entretanto, as glicoproteínas do envelope podem ser alvos menos efetivos por serem extremamente variáveis. No futuro próximo, espera-se que proteínas menos estudadas como core, E1 e E2, p7 e NS4B, também se tornem novos alvos terapêuticos. Das proteínas mais importantes para este fim, hoje, tem-se a NS5B, que é considerada como um sítio alvo para inibidores de polimerases, e a NS3, considerada como sítio alvo de inibidores de protease. A protease NS3 e a polimerase NS5B têm emergido com sucesso como alvo de drogas terapêuticas, mas também a NS5A tem saído da obscuridade, devido às suas importantes funções na replicação viral e, consequentemente, permanência da doença (SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014; WEISER; TELLINGHUISEN, 2012).

Diante de tamanha complexidade, com várias proteínas exibindo funções distintas, algumas até desconhecidas, atrelado ao fato de que o vírus só infecta o homem ou chimpanzés, faz com que o estudo da hepatite C seja bastante difícil e complicado, o que justificou a demora de duas décadas entre a sua descoberta e completa caracterização do vírus.

2.4 TRATAMENTO NA HEPATITE C CRÔNICA

Após quase três décadas da descoberta do vírus da hepatite C, o alcance da cura dessa doença vem se tornando cada vez mais iminente. Antes mesmo de se descobrir esse vírus, a doença que era então conhecida como hepatite não-A e não-B, começou a ser tratada em 1986

com o IFN-α, uma droga que inibia de forma potente, a replicação viral. Só 12 anos depois, em 1996, o tratamento sofreu uma modificação, acrescentando o medicamento ribavirina, agindo de forma sinérgica, além de um novo IFN-α ser instituído. Este, que agora viria associado ao polietilenoglicol, passou a ser mais eficiente apresentando uma maior absorção, atrelada à uma eliminação mais lenta (BARTH, 2015; GHANY et al., 2009; LIANG; GHANY, 2013).

O objetivo do tratamento contra a hepatite C crônica visa a erradicação do vírus com sua completa eliminação, levando a uma resposta virológica sustentada (RVS), indicada pela indetectabilidade do VHC-RNA em 24 semanas (em esquemas com interferon) ou 12 semanas (em esquemas sem interferon) após o tratamento. Além disso, objetiva-se alcançar a resolução da doença hepática, evitando a progressão para cirrose e/ou hepatocarcinoma, além de evitar a ocorrência de manifestações extra-hepáticas no paciente (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015a).

Até 2011, o tratamento padrão aprovado para a hepatite C crônica era portanto, o uso do alfa-interferon peguilado semanalmente, associado a doses diárias do medicamento ribavirina, por um período de seis meses a um ano de tratamento (BARTH, 2015), cujas taxas de resposta virológica sustentada estavam em torno de 70 a 80%, nos portadores da infecção com genótipos virais do tipo 2 e 3; enquanto que nos demais genótipos, essa taxa de resposta caía para 45 a 70% (GHANY et al., 2009; ILYAS; VIERLING, 2014; LIANG; GHANY, 2013). No entanto, essa terapia dupla apresentava diversos efeitos colaterais importantes que estimularam pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, os quais pudessem exibir um melhor padrão de resposta e apresentassem menos efeitos indesejáveis nesses pacientes.

O surgimento dos inibidores das proteases virais NS3 e NS4A, foram introduzidos na terapêutica em 2011 como os primeiros agentes antivirais de ação direta, sendo introduzidos e aprovados pelo FDA (US Food and Drug administration) (JO et al., 2015). Já no Brasil, esses medicamentos foram incorporados em 2012, de acordo com a Portaria nº 20, de 25 de julho de 2012, SCTIE/MS, no Sistema Único de Saúde (SUS). São os chamados Telaprevir e Boceprevir, medicamentos aplicados apenas a portadores da infecção com vírus do genótipo 1, não sendo administrados sozinhos, mas em associação com o tratamento duplo padrão (interferon-α peguilado e ribavirina), constituindo o que então passou a ser chamado de terapia tripla. Nesse tratamento, ou um ou outro estaria associado ao esquema duplo empregado, não podendo ser administrados em forma de monoterapia, pois poderiam induzir a uma resistência antiviral (LIANG; GHANY, 2013; SUSSER et al., 2009).

Esses inibidores apresentam como mecanismo de ação, o bloqueio do processamento da poliproteína do VHC, inibindo a clivagem das proteínas não-estruturais do vírus, ou da interação de NS3 com NS4, ao se ligar no sítio catalítico da NS3. Com isso, acaba impedindo a replicação e a montagem de novos virions e, consequentemente, a propagação da infecção (ILYAS; VIERLING, 2014).

O desenvolvimento desses novos agentes antivirais diretos foi um marco no tratamento da hepatite C, visto que seriam mais potentes, teriam uma menor duração no período de tratamento, além de propiciar a pesquisa para desenvolvimento de novos fármacos, contra outros alvos do vírus (JO et al., 2015). No entanto, cerca de 10-12% dos pacientes com essa terapia tripla tiveram o tratamento interrompido, devido aos eventos adversos que levam à uma pior tolerabilidade nesses indivíduos (LIANG; GHANY, 2013).

A partir daí, surgiram os inibidores de proteases de segunda geração: simeprevir e sofosbuvir, os quais também visam interromper a replicação do VHC, e o daclatasvir (inibidor do complexo de replicação NS5A). Esses são usados em associação, livre de interferon, para o tratamento de indivíduos com fibrose avançada ou cirrose compensada, monoinfectados pelos genótipos 1 a 4 ou coinfectados por esses genótipos e o HIV-1, bem como pessoas com manifestações extra-hepáticas da doença (FARIA et al., 2016). Em função dos avanços da assistência à hepatite C e de questões relacionadas à segurança, posologia, custo, abrangência de pacientes tratados e efetividade, a incorporação desses novos tratamentos para a hepatite C implica na exclusão dos inibidores de protease boceprevir e telaprevir, incorporados ao SUS em 2012, onde o paciente que iniciar tratamento com as novas drogas, não utilizará os antivirais de 1ª geração (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS, 2015a).

Uma vez que os pacientes iniciam o tratamento antiviral, eles são avaliados durante e pós-tratamento, onde os níveis séricos do RNA ou “carga viral” predizem os possíveis resultados esperados com o tratamento (tanto para a terapia padrão convencional, como a terapia com os inibidores de ação direta), sendo que alguns estudos mostram que quanto maior a carga viral, pior e menos eficiente será a resposta antiviral do paciente (BARREIRO et al., 2015). Os pacientes são, portanto, classificados de acordo com o tipo de resposta preliminar ou final, que venham a obter. Essa classificação consiste em (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2014):

- Resposta virológica rápida: quando o RNA viral desaparece da corrente sanguínea dentro de quatro semanas de tratamento;
- Resposta virológica rápida estendida: definida com o uso dos inibidores telaprevir e/ou boceprevir, onde a carga viral se torna indetectável após 4-12 semanas e/ou 8-24 semanas de tratamento;
- Resposta virológica precoce completa: RNA indetectável após 12 semanas;
- Resposta virológica parcial: queda da carga viral de cerca de mais de 2 log UI/mL, na 12ª semana de tratamento;
- Resposta virológica lenta: queda da carga viral de cerca de mais de 2 log UI/mL, na 12ª semana de tratamento, sendo negativada até a 24ª semana;
- Não respondedor: parcial, com queda da carga viral de cerca de mais de 2 log UI/mL, na 12ª semana de tratamento, porém sendo detectada na 24ª semana ou, não-respondedor nulo, quando há queda do HCV-RNA de menos de 2 log UI/mL na 12ª semana de tratamento.
- Resposta virológica sustentada: carga viral indetectável na 12ª semana de tratamento, após o término do tratamento;
- Recidiva: retorno da carga viral após o término completo do tratamento antiviral.

Com as novas drogas de ação direta antiviral, de segunda geração, pacientes têm apresentado resposta virológica sustentada com taxas que excedem 90%, além de exibirem a reversão da fibrose avançada e da cirrose hepática, diminuindo o risco de descompensação e hepatocarcinoma, marco este que se pensava ser impossível de ser alcançado no passado (DUSHEIKO, 2017; LEE; WALLACE; FRIEDMAN, 2015). É importante ressaltar que apesar dos altos preços dessas drogas antivirais, o encurtamento do tratamento devido à sua alta eficácia, pode reduzir os custos do governo em fornecer ao sistema de saúde, além de minimizar os efeitos adversos relacionados (BARREIRO et al., 2015).

Com isso, o novo tratamento traz consigo a esperança de resolução e cura da hepatite C crônica, levando à manutenção da resposta sustentada, assim como a eliminação de seus efeitos e danos hepáticos, aumentando a expectativa de uma cura real e, consequentemente, a qualidade de vida desses pacientes.

2.5 RESPOSTA IMUNE NA HEPATITE C CRÔNICA

Na infecção pelo vírus da hepatite C, duas resoluções podem ser observadas no paciente: ou pode haver a eliminação do vírus, em cerca de 25% dos casos, ou a doença evolui para a cronicidade (75%), sendo essa consequência influenciada por fatores virais ou próprios do hospedeiro (BARTH, 2015).

Dados têm sugerido que as proteínas do vírus suprimem a resposta imune do hospedeiro através da inibição das funções das células imunes, acabando por levar à infecção de forma persistente (HIROISHI; ITO; IMAWARI, 2008; NEUMANN-HAEFELIN et al., 2005). A ocorrência de mutações heterogêneas no RNA viral também promove uma maior resistência do vírus diante das respostas antivirais. No entanto, fatores do hospedeiro como os polimorfismos do HLA e uma resposta adaptativa de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$, multiespecífica e sustentada, podem também coibir a multiplicação e consequente permanência viral, o que foi demonstrado em estudos comparativos entre humanos e chimpanzés (estes experimentalmente infectados), corroborando a relevância dessas respostas quando fortes e permanentes (CUBERO et al., 2014).

As primeiras respostas imunes que se iniciam contra o vírus C são as respostas inatas antivirais. Elas não respondem de maneira específica contra o vírus, mas fornecem, no entanto, uma reação imediata que retarda a replicação viral. Usualmente, iniciam-se depois de dois dias após a infecção, com crescente envolvimento de fatores regulados por citocinas do tipo interferon, como a proteína quinase R (PKR) e produtos de genes antivirais. Essa resposta antiviral desenvolve-se em todos os indivíduos, tanto naqueles que evoluem para infecção crônica quanto nos que controlam o vírus espontaneamente (após infecção aguda e sintomática) (PLAUZOLLES et al., 2015; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014; WERNER et al., 2013).

A resposta imune imediata é desencadeada quando receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), dentro das células infectadas, reconhecem o RNA do vírus como não-próprio, iniciando a partir daí uma cascata de sinalização que acaba por ativar a imunidade do hospedeiro. Esta caracteriza-se como a primeira linha de defesa do indivíduo contra o vírus, sendo importante pela sua ação antiviral propriamente dita, ou seja, suprimindo a replicação e dispersão do vírus para outras células, assim como direcionando e programando a resposta

imune adaptativa; coordenando, portanto, a resposta imune como um todo (HORNER; GALE, 2013; SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014).

Os receptores de reconhecimento de padrões, que exercem um papel importante no reconhecimento do VHC, são chamados de RIG-I (gene I induzível do ácido retinóico), e atuam como sensores citoplasmáticos do vírus; e o TLR-3 (receptor *toll-like* do tipo 3), que reconhece RNA de dupla fita de vírus liberados de células previamente infectadas e realocando-o para dentro de vesículas endossomais (ROSEN, 2013; XU; ZHONG, 2016). Uma vez ativadas, essas vias recrutam uma sinalização antiviral mitocondrial (MASV) e do receptor 3, associado ao fator de necrose tumoral, ativando a produção de outras citocinas como os interferons do tipo I (alfa e beta) e III (λ) e pró-inflamatórias (FERREIRA et al., 2016; HORNER; GALE, 2013).

As células NK e NKT também são ativadas, exercendo um papel de inibição da replicação viral através da secreção de interferon-gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), sem destruir os hepatócitos infectados (FALLAHI et al., 2012; ISHII; KOZIEL, 2008; ROSEN, 2013). Estudos têm revelado que variações específicas nos receptores dessas subpopulações de linfócitos, estão associadas com a resolução da infecção (PLAUZOLLES et al., 2015). Outros trabalhos corroboram esses achados, demonstrando uma baixa frequência dessas células no sangue periférico e no fígado de pacientes com hepatite C crônica (ISHII; KOZIEL, 2008; OLIVEIRA et al., 2016).

Em contrapartida, uma vez que as proteínas virais acumulam-se no citosol dos hepatócitos, o VHC usa sua protease multifuncional NS3/4A, essencial para sua replicação, para clivar e inibir a ativação da via MAVS, assim como do gene RIG-I e do TLR-3, dificultando assim, a execução de uma resposta imune inata eficiente (BARTH, 2015; FERREIRA et al., 2016; ROSEN, 2013).

Como é de notório saber, que a maior parte dos indivíduos infectados pelo VHC apresentam infecção na sua forma crônica, e que as respostas do hospedeiro são cruciais para o desenvolvimento ou cura da doença; subtende-se que estes sejam incapazes de controlar a infecção. O mistério atrás desse fenômeno natural, no entanto, ainda não é completamente conhecido. Uma justificativa é que aqueles pacientes que controlam a doença logo no começo, apresentam IFN-γ preferencialmente expresso no fígado, várias semanas após o início da infecção. Isso resulta na expressão de várias quimiocinas, as quais atraem linfócitos T e várias proteínas envolvidas com o processamento e apresentação antigênica (SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014).

Além do IFN-γ presente nos hepatócitos, aqueles indivíduos que se curam espontaneamente possuem uma aumentada produção de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ que se direcionam especificamente para epítopos dos antígenos do Core, da região NS3/4A, NS5B e, especialmente, da região NS3, a qual apresenta a maior parte dos epítopos imunogênicos do VHC, levando a uma infecção de curso limitado. Essas células T $CD4^+$ reconhecem esses antígenos através do MHC de classe II, ativando, em seguida, macrófagos e células B antígeno-específicas, assim como as células T $CD8^+$, que reconhecem esses mesmos antígenos através do MHC de classe I. A resposta mediada pelos linfócitos T ocorre através de dois tipos de mecanismos: citotoxicidade, levando à morte das células infectadas, e secreção de IFN-γ e TNF-α, inibindo a replicação viral, mas sem destruir as células infectadas (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2005). No entanto, em um quadro de resposta fraca e inefetiva, tem-se observado que a proteína NS5A do VHC inibe a produção intra-hepática de citocinas antivirais (em camundongos transgênicos), como o IFN-γ, propiciando a perda da função antiviral das células T e, consequentemente, uma ausência de resposta que resulta na cronicidade da doença para o paciente (BARTH, 2015).

O trabalho realizado por CUBERO e colaboradores (2013), demonstraram que pacientes que não curavam espontaneamente não exibiam resposta linfocitária para o domínio NS3, revelando, portanto, que essa proteína pode ser essencial para o escape do vírus ou para a indução de uma tolerância imunológica periférica à sua presença. Associada a este fator, a presença de inúmeras mutações virais de alta complexidade propicia a ausência de resposta imune espontânea ou mediada por tratamento. Assim, pode-se afirmar que os indivíduos que evoluem para a forma crônica da doença não conseguem montar uma resposta de células T específicas contra o vírus, corroborando assim, a importância do papel da resposta adaptativa.

Tratando-se ainda de resposta imune especializada, a participação da resposta humoral é inexpressiva. Os anticorpos produzidos durante essa infecção não conseguem eliminar o vírus, nem por neutralização ou degradação, de forma eficaz; mesmo que trabalhos demonstrem uma possível associação entre as proteínas do vírus e os receptores celulares do hospedeiro. Uma das táticas virais que leva a essa ineficiência desse tipo de resposta é a transferência do vírus célula a célula, impedindo a ação dos anticorpos neutralizantes, assim como a indução de anticorpos interferentes pelo VHC e as alterações nos epítopos das proteínas do envelope (KONDO et al., 2014; NEUMANN-HAEFELIN et al., 2005; SKLAN et al., 2009; WANG, LAN S, D'SOUZA, LIONEL S, JACOBSON, 2016).

Posteriormente, com a caracterização de um terceiro subtipo de células T auxiliares ou T helper (Th), denominadas Th17, pesquisas vêm sendo realizadas sobre a patogênese de

doenças hepáticas, como a hepatite C, pelo envolvimento dessas células na imunidade inata e adaptativa (FOSTER et al., 2012). Essas células T efetoras $CD4^+$ são caracterizadas, assim como as demais, pelo perfil de citocinas que secretam, e têm fornecido novas descobertas dentro dos mecanismos que são importantes no desenvolvimento de autoimunidade e na defesa antimicrobiana do hospedeiro (FATHY et al., 2011).

A descoberta desse subtipo de células Th foi devido ao reconhecimento da IL-17, em 1993 por Yao et al., que produziu uma quebra do paradigma até então aceito da divisão das células $TCD4^+$ em Th1 e Th2, introduzido em 1989. Durante muitos anos, as células auxiliares Th1 e Th2 representaram programas mutualmente exclusivos de diferenciação por células $TCD4^+$ virgens durante as respostas imunes. Com isso, a descrição das células Th17 como parte das respostas T auxiliadoras tem levado a um grande interesse por parte dos pesquisadores devido ao seu papel tanto na defesa do hospedeiro, quanto na patogênese de patologias imunomediadas (BOWEN, 2012; DONG, 2008; KONYA et al., 2015; MIOSSEC, 2009; TABARKIEWICZ et al., 2015).

2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS Th17

As células Th17 compreendem um novo subconjunto de células T pró-inflamatórias que requerem o fator de transcrição ROR (receptor órfão relacionado ao ácido retinóico), sendo ROR-c em humanos e RORγt, em murinos, e o STAT3 (transdutor de sinal e ativador 3 de transcrição), como peças chave na diferenciação celular (ANNUNZIATO et al., 2012; BOWEN, 2012; CHANG et al., 2012). Os fatores ROR-c ou RORγt induzem a transcrição do gene da IL-17 em células Th virgens, sendo requerido para o desenvolvimento de células produtoras dessa citocina, interagindo, no entanto, em cooperação com outros fatores, como o STAT3, para a completa diferenciação da linhagem Th17 (MIOSSEC, 2009).

Em adição aos membros ROR, um outro fator foi identificado como necessário para a diferenciação da linhagem Th17: o IRF4 (Fator 4 Regulador do Interferon). A sua deficiência mostrou resultar na diminuição da expressão do fator RORγt e no aumento da expressão de FOXP3, fator de transcrição intracelular necessário para a diferenciação de células T regulatórias, impactando negativamente na diferenciação para Th17 (DONG, 2008). Vários grupos de pesquisadores reconheceram a dicotomia na geração de células T, mostrando que o fator transformador de crescimento β (TGF-β), quando sozinho, promove a diferenciação para células T regulatórias (Treg), anti-inflamatórias, oriundos de células $TCD4^+$ virgens, enquanto

o TGF-β, na presença da interleucina 6 (IL-6), promove a diferenciação para células Th17 (GUTKOWSKI et al., 2013).

Com a presença, portanto, desses fatores transcricionais, a diferenciação para Th17 ocorre a partir das células dendríticas que, ao expressarem moléculas co-estimulatórias e secretarem várias citocinas e quimiocinas específicas, como a IL-6 e o TGF-β, contribuem para a estimulação de células T virgens a gerarem respostas que permitam a diferenciação para esse subtipo celular (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2009).

Alguns receptores de superfície são expressos nessas células de forma a caracterizá-las: são os receptores de quimiocinas do tipo 6 (CCR6) e 4 (CCR4), e o receptor da IL-23, encontrados nos dois maiores estudos envolvendo Th17 em humanos, que foram os trabalhos realizados por ACOSTA-RODRIGUEZ et al., (2007) e ANNUNZIATO et al., (2007). Em estudos subsequentes, observou-se que o gene da molécula CD161 foi um dos mais suprarregulados nas células Th17, sendo expresso na superfície dessas células e em tecidos inflamados (ROMAGNANI et al., 2009).

Uma vez diferenciadas, as células Th17 produzem um distinto perfil de citocinas, nomeadamente interleucinas 17A (IL-17A ou IL-17), IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-26, sendo a principal citocina, a IL-17, de onde originou o nome desse subtipo celular. Outras citocinas ainda dessa família são produzidas como a IL-17B, IL-17D e IL-17E ou IL-25, sintetizadas por vários tecidos, enquanto que a IL-17C tem origem nos tecidos prostático e rins fetais (GAFFEN, 2008; KORN et al., 2009; SPOLSKI; LEONARD, 2010).

A IL-17A e IL-17F afetam um amplo espectro de células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas para protegerem o hospedeiro de patógenos microbianos invasores, recrutando neutrófilos e induzindo peptídeos antimicrobianos. Ambas funcionam, primariamente, como mediadores pró-inflamatórios locais, induzindo a produção de IL-6, prostaglandina E2 e óxido nítrico, além de, especificamente, recrutar neutrófilos (FATHY et al., 2011). A IL-17F sozinha, no entanto, tem um papel menos proeminente no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, apresentando um possível papel antagônico nas respostas T auxiliares do tipo Th2 (CHANG; DONG, 2009). A IL-22 exibe um papel crucial na defesa da mucosa do hospedeiro, mas tem-se mostrado importante na proteção contra o dano tecidual do fígado em modelos murinos de hepatite aguda, onde foi visto que a IL-22 induziu a proliferação celular e reparo ao suprarregular genes antiapoptóticos (HIROTA; MARTIN; VELDHOEN, 2010; SPOLSKI; LEONARD, 2010). Também está envolvida na regeneração tecidual, regulação do metabolismo e manutenção da homesostasia bacteriana no intestino (FATKHULLINA; PESHKOVA; KOLTSOVA, 2016).

A origem das células Th17, a partir das células T virgens, como citado, é dependente da apresentação de antígeno por uma célula apresentadora profissional, da co-estimulação e de um conjunto de citocinas específicas. As interleucinas do tipo 1 β (IL-1β), IL-6 e TGF-β têm sido relatadas por induzir o desenvolvimento de células Th17, enquanto que a citocina IL-23 tem sido evidenciada como importante para a manutenção e expansão dessas células, documentado primeiramente em 2003, onde foi demonstrado a participação dessa citocina, não em iniciar as respostas Th17, mas a sua rápida regulação após a fase inicial de resposta (ANNUNZIATO et al., 2012; BOWEN, 2012; CHANG; DONG, 2009; HIROTA; MARTIN; VELDHOEN, 2010; MIOSSEC, 2009; ROMAGNANI et al., 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2009).

A IL-21, que é produzida em grandes quantidades por células Th17 maduras, possui uma participação de maneira autócrina, ou seja, à medida que vai sendo secretada, vai ampliando e regulando a diferenciação para esse perfil celular. Sua secreção é dependente da indução exercida pela IL-6, além de se comportar como uma citocina pró-inflamatória (CHANG; DONG, 2009; HIROTA; MARTIN; VELDHOEN, 2010; MIOSSEC, 2009). Outras funções da IL-21 seria a de dirigir a diferenciação terminal de linfócitos B, cooperar com a proliferação de LTCD8^{+}, com ações adicionais em células NK, células dendríticas e restaurar o balanço entre células Th17 e Treg (SPOLSKI; LEONARD, 2010; TABARKIEWICZ et al., 2015).

Logo, a indução das respostas Th17 deve ser pensada e entendida como uma via de diferenciação em três passos: indução ou diferenciação, amplificação e estabilização, onde a TGF-β e a IL-6 induzem, a IL-21 amplifica a frequência e a IL-23 estabiliza o fenótipo já formado e diferenciado. Assim, a perda de qualquer um desses membros na via, limitará gravemente a obtenção de uma resposta Th17 (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007).

Em geral, sabe-se hoje que as respostas Th17 são críticas na defesa da mucosa e do epitélio contra agentes extracelulares. No entanto, recentes estudos têm relatado o seu papel contra agentes intracelulares, contribuindo para a persistência viral e a inflamação crônica, além de várias condições imunopatológicas graves (MIOSSEC, 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2009).

A presença de IL-17 em soro e biópsia de pacientes com doenças inflamatórias crônicas foi relatada antes mesmo do conhecimento e da caracterização desse perfil celular. Esses achados foram confirmados, com a presença dessas células em tecidos humanos inflamados, oriundos de pacientes com diversas desordens inflamatórias e autoimunes. A estimulação da produção de quimiocinas por células desses tecidos, mediadas pelas IL-17 e

IL-22 pode ser um instrumento para o recrutamento de células efetoras, incluindo linfócitos, granulócitos e monócitos ativados (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2009).

2.7 O PAPEL DAS CÉLULAS Th17 NA HEPATITE C CRÔNICA

Após algumas análises genéticas, principalmente, com os genes que induzem a IL-17, foi mostrado que esta citocina induzia várias quimiocinas e metaloproteinases de matriz, as quais estão envolvidas com o processo inflamatório, evidenciando portanto, o papel desse perfil celular no envolvimento de doenças inflamatórias (CHANG; DONG, 2009). Corroborando esses achados, alguns estudos indicaram que as células Th17 têm um papel importante em muitas doenças hepáticas, incluindo doença alcoólica do fígado, hepatite B aguda e crônica, doença autoimune do fígado e carcinoma hepatocelular, contribuindo para o dano hepático e para a progressão da doença (CHANG et al., 2012).

Um estudo realizado por Rowan et al. (2008) relatou a ocorrência de indução de células Th17 específicas, em portadores de hepatite C crônica. No entanto, foi demonstrado também, que citocinas regulatórias como a IL-10 e TGF-β, que eram induzidas pela proteína NS4 do VHC, induziram supressão das respostas do tipo Th1 e Th17, nesses pacientes infectados. Um outro trabalho realizado por Fathy et al. (2011), demonstrou, no entanto, que os níveis séricos de citocinas do perfil Th17 estariam elevadas em pacientes infectados, em comparação a indivíduos sadios.

Um estudo realizado na China por Chang et al. (2012), demonstrou que a frequência das células Th17, tanto no sangue periférico, quanto no fígado de pacientes com hepatite C crônica (HCC), poderia ser um novo marcador para progressão da doença associado com grau de injúria hepática e atividade inflamatória, associando-se com os níveis séricos da enzima alanina aminotransferase (ALT). No entanto, nesse mesmo estudo, a associação da resposta Th17 com a replicação viral e, consequentemente, a eliminação do vírus, não foi evidenciada.

Alguns trabalhos também têm sido realizados considerando a resposta ao tratamento antiviral, em pacientes com HCC. Em um desses estudos, os níveis da citocina IL-17 foram demonstrados estar elevados no soro de indivíduos com a infecção crônica; entretanto, os valores não se correlacionaram com a viremia após 12 semanas de tratamento com IFN-α e ribavirina. Em contradição, em outro trabalho, citocinas séricas do perfil Th17 foram encontradas com níveis reduzidos após 12 semanas de tratamento antiviral, tendo principalmente, uma ampla queda naqueles pacientes que foram respondedores ao tratamento. Em um estudo com pacientes pós-transplantados hepáticos, e que tiveram a recorrência da

hepatite, foi evidenciado um aumento também do número de células Th17 no sangue periférico, assim como em pacientes que tinham uma hepatite com grau mais avançado (BOWEN, 2012).

Um estudo realizado por nosso grupo (SOUSA et al., 2012), também demonstrou a participação de células Th17 na infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Foram determinados os níveis de várias citocinas séricas envolvidas com este perfil celular, assim como marcadores de atividade da doença hepática, como a ALT, marcadores de fase aguda e de autoimunidade, correlacionando com algumas características clínicas desses pacientes. Nesse trabalho, foi encontrada uma forte associação entre os níveis de IL-17F e IL-22, onde uma significante redução na razão entre essas duas citocinas (IL-17F/IL-22) foi observada nos pacientes com HCC. A IL-17F promove uma inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e o fator de crescimento endotelial vascular, inibindo a angiogênese e o crescimento do câncer; enquanto que a IL-22 tem um efeito oposto, estimulando o crescimento do carcinoma hepatocelular através da ativação do fator de transcrição STAT3, promovendo metástase e inibição da apoptose.

Em um modelo experimental de doenças infecciosas, a IL-22 mostrou ter um papel em aumentar a proliferação de células epiteliais no hospedeiro, protegendo-o contra infecções na mucosa; mas também, foi evidenciado que exibia papel importante na proteção contra o dano tecidual hepático, podendo ser inferido que a patologia hepática pode ser largamente prevenida pela super expressão da IL-22. Isso foi demonstrado com o bloqueio dessa citocina com anticorpos neutralizantes, e também, nocauteando camundongos para o gene desta, resultando em substancial lesão hepática, acompanhada de altos níveis das enzimas hepáticas no soro (HIROTA; MARTIN; VELDHOEN, 2010).

Na hepatite B, foi documentado em um ensaio *in vitro*, uma possível participação protetora da IL-17A, onde elevados níveis dessa citocina reduziriam as cópias do vírus, inibindo a sua replicação; enquanto que a sua diminuição promoveria o aumento da replicação viral. O mesmo não foi observado em relação à citocina IL-22 (WANG et al., 2013).

Um trabalho realizado por Gutkowski et al. (2013), em portadores de hepatite C crônica, evidenciou resultados contraditórios, com os relatados acima. Foi demonstrado que os níveis séricos de IL-17 estariam diminuídos nesse grupo de pacientes, em relação à população sadia, comportando-se, portanto, de forma distinta do que tem sido mostrado em outras enfermidades crônicas hepáticas. Outro trabalho apresentado por HAO et al. (2014) também evidenciou o reduzido número de linfócitos Th17, em pacientes com HCC, e aumento do número de linfócitos T regulatórios, contrapondo com a população sadia

estudada, além de não terem encontrado associação entre os níveis das transaminases séricas, e as células Th17.

Com o conhecimento mais apurado sobre o papel das células Th17 na imunopatogenia da hepatite C, pode-se obter novos tratamentos que visem bloquear essa resposta, induzindo a uma menor lesão hepática, ou contraditoriamente, induzindo uma resposta com a finalidade de obter citocinas protetoras que propiciem a resolução da doença sem maiores danos. Alguns estudos iniciais vêm demonstrando o papel de algumas citocinas em bloquear a citocina IL-17 e controlar o desenvolvimento desse perfil celular (TABARKIEWICZ et al., 2015).

Devido ao fato desses estudos ainda serem iniciais e controversos, além do fato da maioria dos trabalhos realizados terem sido em casos de hepatite B, faz-se necessário que novas pesquisas também sejam realizadas com a hepatite C para obtenção de maiores informações que proporcionem uma melhor qualidade de vida para os pacientes, principalmente, em um país com características tão distintas dos perfis populacionais até então estudados.

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESES

H0 = Não há diferença no perfil de células Th17 entre portadores de hepatite C crônica, tratados e não tratados, assim como em indivíduos sadios.

H1 = Existem diferenças no perfil de células Th17 entre os pacientes com hepatite C crônica, tratados e não tratados, e os indivíduos sadios.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 **Geral**

Investigar a frequência de células Th17 em portadores de hepatite C crônica, e a avaliação da produção de citocinas do perfil Th17, antes e após tratamento.

3.2.2 **Específicos**

I. Avaliar quantitativamente os linfócitos T (CD4/CD8), do sangue periférico de portadores do VHC, virgens de tratamento e pacientes não-respondedores, e controles sadios.

II. Determinar as frequências de células Th17 nos indivíduos referidos acima e compará-las entre si.

III. Avaliar a resposta funcional das células Th17 *ex vivo*, através da produção das citocinas IL-17A, IL-17F, IL-17E, IL-21 e IL-22 após estimulação antigênica, *in vitro*, frente aos antígenos do core e aos antígenos não estruturais do vírus C, em grupos de portadores do VHC;

IV. Correlacionar os resultados obtidos com dados clínico-laboratoriais dos pacientes.

4 CAPÍTULO 1: Artigo científico 1: Células Th17 na Hepatite C crônica: Envolvimento com Autoimunidade, Viremia e Lesão hepática.

(Microbial Pathogenesis)

Milena Santana Cabral [a], Mônica Cardozo Rebouças [a], Isabela Silva de Oliveira [b], Maria Isabel Schinoni [c], Ajax Mercês Atta [b], Maria Luiza B Sousa Atta [b].
[a] Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brazil; [b] Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Brazil; [c] Serviço de Gastro-hepatologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brazil.

Resumo

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) é um problema de saúde global. A participação de células imunes na persistência do vírus e sua associação com a patologia do fígado, na hepatite C ainda não são completamente conhecidas. Neste trabalho, investigamos a subpopulação de células Th17, do sangue periférico, em pacientes infectados cronicamente pelo VHC, não tratados, e em pacientes que não responderam (NR) ao tratamento antiviral com interferon-α / ribavirina. A associação dessas células com a histologia hepática e carga viral também foram analisadas. Vinte pacientes não tratados com VHC, 10 indivíduos NR, todos infectados com VHC Gen 1, e 23 indivíduos saudáveis participaram do estudo. As células Th17 foram quantificadas por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais específicos (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD161, e anti-IL-17A) e o citômetro FACS Canto II. Dados histopatológicos de biópsia hepática foram utilizados para estadiamento da hepatite crônica, de acordo com a classificação METAVIR ou pelo método Fibroscan®. Autoanticorpos não-órgão específicos (ANA, AML e FR) foram detectados por imunoensaios. As células Th17 foram encontradas diminuídas, em ambos os grupos (não tratados e não-respondedores) ($p<0,0001$). A diminuição dessas células não foi correlacionada com autoimunidade e nem com os níveis da alanina aminotransferase (ALT), ou associadas com carga viral ou histopatologia hepática. Em conclusão, a infecção crônica pelo vírus da hepatite C, do genótipo 1, causa uma diminuição das células Th17 do sangue periférico. Aparentemente, esta alteração celular não está relacionada com a carga viral ou lesão hepática.

Palavras-chaves: hepatite C; células Th17; carga viral; autoimunidade; patologia hepática

4.1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 185 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo vírus da hepatite C (VHC) e devido a isso, várias estratégias epidemiológicas e de intervenção estão sendo realizadas para prevenção e controle da doença na tentativa de reduzir a sua propagação [1,2]. Embora a resposta imune contra o vírus da hepatite C possa eliminar a infecção aguda, em uma pequena proporção de indivíduos infectados, a infecção persiste na maioria dos

pacientes, tornando-se crônica após seis semanas. Cerca de 55% a 85% dos pacientes com hepatite C aguda, evoluem para a hepatite crônica causando lesões hepáticas significativas, tais como fibrose e cirrose nesses indivíduos, e manifestações extra-hepáticas, especialmente de autoimunidade [3,4]. As proteínas do vírus suprimem a resposta imune do hospedeiro, através da inibição das funções das células imunes, supressão essa que acaba por levar à infecção de forma persistente [5,6]. No entanto, fatores do hospedeiro como os polimorfismos do HLA e uma forte, multiespecífica e sustentada resposta adaptativa de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ podem também coibir a multiplicação e consequente permanência viral, e resolver a infecção aguda [7].

Aproximadamente 1% das células $TCD4^+$ do sangue periférico são do tipo Th17. Entretanto, um aumento no número destas células é visto em algumas doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, assim como em alguns tipos de câncer. Recentemente, as células Th17 foram implicadas na patogênese de doenças hepáticas tais como a hepatite C, e a frequência dessas células, em pacientes com hepatite C crônica, tanto no sangue periférico quanto no fígado, pode ser um novo marcador para a progressão da doença. Elas estão associadas com estágios de lesão hepática e atividade inflamatória nesse órgão [8-10].

Um aumento no número de células Th17 no sangue periférico tem sido relatado em pacientes pós-transplantados, com recorrência de hepatite e, também, em pacientes com estágio avançado dessa doença. Entretanto, observou-se um baixo número de células Th17 e um número aumentado de células T regulatórias em pacientes com hepatite C crônica. Além disso, não tem sido associado os níveis das aminotransferases séricas e as células Th17 [11,12].

Neste estudo, investigou-se a proporção de células Th17 no sangue de pacientes brasileiros com hepatite C crônica, sua relação com células $TCD4^+$ e $TCD8^+$, buscando associação com diferentes aspectos dessa infecção, utilizando como referência indivíduos sadios da mesma população.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 **Pacientes e Controles Sadios**

Este estudo incluiu indivíduos de ambos os sexos provenientes do Serviço de Hepatites do Hospital Professor Edgard Santos. Os pacientes foram diagnosticados clinicamente e sorologicamente para hepatite C (anti-VHC por ELISA de 3ª geração) e demonstração de RNA viral no sangue (dados obtidos de prontuários médicos). Foram

incluídos 20 indivíduos sem tratamento antiviral prévio, sendo 14 mulheres e seis homens com média de idade de 56 ± 14 anos. Dez indivíduos com hepatite C crônica, sendo três homens e sete mulheres, com uma média de idade de 58 ± 8 anos, que não responderam ao tratamento antiviral, após 12 semanas com interferon-α peguilado e ribavirina, ou que sofreram reativação da infecção após a 24ª semana de tratamento, formando o grupo não-respondedor (grupo NR). Todos os portadores do VHC eram infectados pelo genótipo do tipo 1. Pacientes com coinfecções virais por HIV, HTLV e hepatite B ou presença de outras enfermidades crônicas autoimunes e/ou inflamatórias não foram incluídos no estudo. O grupo controle consistiu de 23 indivíduos sadios (15 mulheres e oito homens, com média de idade de 50 ± 9 anos) oriundos da população local, que foram negativos para anti-VHC, assim como para as outras doenças usadas como critérios de exclusão. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Professor Edgar Santos (CEP-HUPES).

4.2.2 **Investigação laboratorial**

O hemograma dos pacientes foi realizado em analisador automático (sistema Cell-Dyn Ruby) e os níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase foram determinadas através da metodologia Cinética-UV, em analisador automático. A histopatologia hepática foi avaliada em material de biópsia e a lesão tecidual (fibrose e atividade necroinflamatória) foi classificada pelos critérios do sistema de classificação METAVIR [13]. O método do Fibroscan® foi utilizado para diagnosticar fibrose nos pacientes que tinham risco de sangramento. Os dados da histopatologia e Fibroscan foram obtidos de prontuários médicos. A presença de crioglobulinas séricas foi detectada por crioprecipitação em tubo, após 7 dias a 4ºC, com inspeção diária. A presença de crioglobulinas foi confirmada pela dissolução do crioprecipitado após 1h de incubação a 37°C [14]. O fator reumatoide sérico foi determinado por nefelometria, usando sistema Immage (Beckman Coulter, USA). Um teste positivo era ≥ 20 UI/mL. Anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP) foram pesquisados por ELISA indireto usando conjunto comercial de imunodiagnóstico (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Alemanha, cut off= 20UI). Os anticorpos antinucleares (ANA) foram investigados por imunofluorescência indireta (IFI), usando células Hep-2000 como substrato antigênico (Immuno Concepts, USA). Anticorpos antimúsculo liso foram também determinados pela mesma metodologia, mas usando como substrato antigênico cortes teciduais de fígado/rim/estômago de rato (Viro-Immun Labor-

Diagnostika GmbH, Alemanha). Ambos autoanticorpos foram triados com uma diluição de 1/40 como ponto de corte.

4.2.3 **Subpopulações de Linfócitos T do sangue periférico**

Para análise das frequências das células, as amostras de sangue total foram coletadas a vácuo em tubos heparinizados (BD Vacutaneir®). Em seguida, o sangue foi diluído a 1/2 com meio de cultura RPMI 1640 com HEPES (Cultilab, Brasil) e antibiótico Gentamicina 10mg/mL (SIGMA-ALDRICH, USA). Às amostras diluídas foi adicionado um meio de ativação da proliferação celular contendo: 10 ng/mL de PMA (12-Miristato 13-Acetato de Forbol), 0,4mg/mL de Ionomicina e 5mg/mL de Brefeldina A (SIGMA-ALDRICH, USA). As amostras foram cultivadas em estufa de CO2 a 37°C, por 4 horas [15]. Após cultivo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 400xG, retirado o sobrenadante e as células suspensas com salina. Os seguintes anticorpos monoclonais foram usados para identificar as subpopulações de linfócitos: anti-CD3 proteína peridinina-clorofila (PerCP-CyTM 5.5), anti-CD4 isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD161 aloficocianina (APC), anti-IL-17A ficoeritrina (PE) (BD Biosciences), e anti-CD8 ficoeritrina cianina-5 (PE-CY5) (eBioscience). A caracterização fenotípica das células Th17 foi feita a partir da marcação de superfície com os anticorpos anti-CD4 FITC e anti-CD161 APC, enquanto que a marcação intracelular foi feita usando o anti-CD3 PerCP CyTM 5.5 e o anti-IL-17A PE (Mouse Anti-Human, BD Biosciences). Foram utilizados anticorpos isotípicos IgG1 de camundongo marcados com PE (BD Biosciences) e células não marcadas como controles negativos. As células foram adquiridas utilizando o citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, USA), sendo que para a determinação das frequências celulares, foram selecionados 10.000 eventos para contagem de linfócitos não marcados (controle negativo), 10.000 eventos para o controle isotípico, 50.000 eventos para linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, e 100.000 eventos para linfócitos Th17. Os resultados obtidos foram analisados com o software FACS Diva^{TM}.

4.2.4 **Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., USA). A distribuição das variáveis foi analisada com o teste de D'Agostino-Pearson. As análises de correlação foram feitas com os testes de Spearman. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney comparou as medianas de dois grupos, e o teste de Kruskal-

Wallis para análise de medianas entre três ou mais grupos. O Teste Exato de Fischer analisou a associação entre dois grupos. Foi considerado significante resultado de $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 **Caracterização clínica e demográfica dos pacientes e controles**

Este estudo avaliou 20 pacientes com hepatite C crônica não tratados e 10 pacientes que eram não-respondedores ao tratamento antiviral com interferon-α mais ribavirina; todos infectados com o genótipo 1 do VHC. A maioria dos pacientes não tratados e dos não-respondedores (60%) apresentou uma carga viral elevada ($\geq 6x10^5$ IU/ml) e um aumento discreto nos níveis de ALT e AST. Nenhuma fibrose ou fibrose leve a moderada (F0, F1, F2) foram diagnosticadas em 13/20 (81%) dos pacientes não tratados, enquanto que 19% tinham fibrose avançada (F3 e F4). Em 10 pacientes não tratados que realizaram a biópsia hepática, três não apresentaram atividade necroinflamatória (A0) e em sete, a atividade foi leve a moderada (A1-A2). No grupo não-respondedor, nove pacientes realizaram biópsia hepática. Seis de nove pacientes (66,7%) tiveram fibrose moderada (F2), enquanto três (33,3%) apresentaram fibrose avançada (F3-F4). Dentre os nove pacientes não-respondedores, a atividade necroinflamatória foi ausente em três, enquanto que seis variaram entre leve e moderada (A1-A2) (Tabela 1).

A presença de crioglobulinas séricas foi detectada em proporção semelhante nos dois grupos de pacientes. Embora a porcentagem de pacientes com NOSA positivos fosse semelhante nos dois grupos, eles diferiram na sua proporção de FR e ANA positivos (Tabela 2).

4.3.2 **Subpopulações de linfócitos**

Os pacientes com hepatite C crônica não tratados e os pacientes não-respondedores apresentaram baixos percentuais e baixos números de células Th17, em comparação com os controles sadios ($p<0,0001$). Entretanto, os três grupos investigados não diferiram nos valores percentuais e em números absolutos de linfócitos $TCD4^+$ ($p=0,85$ e $p=0,07$, respectivamente) e linfócitos $TCD8^+$ ($p=0,76$ e $p=0,36$, respectivamente) (Tabela 3).

4.3.3 **Células Th17 e aspectos clínicos e virológicos**

Os números das células Th17 não foram correlacionados com as concentrações séricas de ALT dos pacientes não tratados ou não-respondedores (p=0,176 e p=0,761, respectivamente). Também, os números dessas células não se correlacionaram com a carga viral do VHC (p=0,516).

4.4 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a proporção de células Th17 no sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica não tratados e em pacientes que não apresentaram resposta virológica sustentada após 12 semanas de tratamento antiviral com α-IFN mais ribavirina, ou que sofreram reativação da infecção após 24 semanas de tratamento. A referência foi a proporção de células em indivíduos sadios não-infectados da mesma população. Nossos resultados mostraram uma redução da contagem absoluta e percentual de células Th17 em pacientes infectados cronicamente pelo VHC (não-tratados e não-respondedores) em comparação com o grupo controle. Entretanto, a infecção pelo VHC não altera a contagem proporcional ou absoluta de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, nos pacientes infectados.

Alguns estudos relatam um alto número de células Th17 em pacientes com hepatite C, em relação a indivíduos sadios [10,12]. Entretanto, eles investigaram pacientes com estágios mais avançados de fibrose, mostrando atividade necroinflamatória. Aqui, a maior parte dos pacientes apresentaram fibrose hepática, porém com atividade necroinflamatória ausente ou em estágio leve a moderado. Além disso, devido ao caráter crônico da infecção, as células Th17 são recrutadas para o fígado, diminuindo seus números no sangue periférico [16].

Um aumento no número de células Th17, em pacientes com hepatite C crônica, tem sido associado às manifestações extra-hepáticas de autoimunidade. Essa associação entre autoimunidade e o aumento do número de células Th17 circulantes tem sido bem demonstrada em estudos envolvendo diferentes doenças crônicas inflamatórias e autoimunes [17-20].

Nosso grupo recentemente documentou uma diminuição da proporção de células T $CD25^+$ $FoxP3^+$, em pacientes com hepatite C crônica com crioglobulinemia, sugerindo a importância dessas células na regulação negativa nas manifestações extra-hepáticas de autoimunidade [21]. No presente estudo, embora a frequência de crioglobulinemia tenha sido baixa nos pacientes avaliados (10% e 30% para pacientes não-tratados e não-respondedores, respectivamente), a presença de NOSA foi similar àqueles já reportados em estudos

populacionais prévios. Portanto, a regulação negativa da autoimunidade pelas células T regulatórias (Treg), nesses indivíduos, pode também inibir a proliferação dos linfócitos Th17. Trabalhos prévios reforça o envolvimento das células Treg, na hepatite C crônica, como evidenciado pelos altos níveis séricos de IL-10 em pacientes e uma possível regulação negativa da resposta inflamatória desses indivíduos [22,23].

O desequilíbrio da relação entre Th17/Treg na hepatite C tem sido tema de estudos e que foi demonstrado um aumento da razão Th17/Treg em pacientes com esta infecção viral crônica. Além disso, tem sido observado um maior número de células Treg em pacientes infectados com HCV Gen1 comparados com aqueles infectados com o genótipo 2 [12,24]. No nosso estudo, todos os participantes estavam infectados com o genótipo 1 do VHC, o que poderia estar associado com regulação negativa mais intensa das células Treg sobre a frequência das células Th17.

Pacientes que apresentaram uma resposta precoce à terapêutica antiviral (4 semanas de tratamento) mostraram números reduzidos de células Treg e elevados números de células Th17. Anteriormente, foi relatado que pacientes com hepatite C aguda, que eliminaram o vírus, tinham números absolutos mais elevados de células Th17, havendo uma diminuição dessas células nos pacientes que evoluíram para a infecção crônica. Além disso, baixos níveis séricos de IL-17A em pacientes com hepatite C crônica foram demonstrados pelo nosso grupo e por outros investigadores, sugerindo que as células Th17 sofrem influências diferentes das observadas em outras doenças hepáticas crônicas [12, 24-26].

Em conclusão, nós documentamos uma diminuição na proporção de células Th17 no sangue periférico, de pacientes cronicamente infectados com o vírus da hepatite C, em relação à população sadia. Tal alteração parece estar associada à infecção com o genótipo 1 do VHC e à inibição da proliferação dessas células por células T regulatórias.

Agradecimentos

Suporte financeiro: CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 477008/2013-5).

4.5 REFERÊNCIAS

[1] World Health Organization. Guidelines for the Screening Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis C Infection. 2016.

[2] Jaroszewicz J, Flisiak-Jackiewicz M, Lebensztejn D, Flisiak R. Current drugs in early development for treating hepatitis C virus-related hepatic fibrosis. Expert Opin Investig Drugs. 2015;24(9):1229-39. doi:10.1517/13543784.2015.1057568.

[3] Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. Gastroenterol Clin North Am. 2015 Dec;44(4):717-34. doi: 10.1016/j.gtc.2015.07.003.

[4] Nouroz, Faisal et al. “An overview on hepatitis C virus genotypes and its control.” Egyptian Journal of Medical Human Genetics 2015: 291-298. Print

[5] Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Oct;23(10):1473-82. doi:10.1111/j.1440-1746.2008.05475.x.

[6] Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C vírus infection. J Clin Virol. 2005 Feb;32(2):75-85.

[7] Cubero M, Gregori J, Esteban JI, García-Cehic D, Bes M, Perales C, Domingo E, Rodríguez- Frías F, Sauleda S, Casillas R, Sanchez A, Ortega I, Esteban R, Guardia J, Quer J. Identification of host and viral factors involved in a dissimilar resolution of a hepatitis C virus infection. Liver Int. 2014 Jul;34(6):896-906. doi: 10.1111/liv.12362.

[8] Foster RG, Golden-Mason L, Rutebemberwa A, Rosen HR. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. Dig Dis Sci. 2012 Feb;57(2):381-9. doi: 10.1007/s10620-011-1997-z.

[9] Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. Trends Immunol. 2011 Dec;32(12):603-11. doi: 10.1016/j.it.2011.08.003. 8

[10] Chang Q, Wang YK, Zhao Q, Wang CZ, Hu YZ, Wu BY. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;27(2):273-8. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06782.x.

[11] Bowen DG. Finding a role for Th17 cells in hepatitis C pathogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;27(2):188-91. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.07033.x.

[12] Hao C, Zhou Y, He Y, Fan C, Sun L, Wei X, Wang L, Peng M, Wang P, Lian J, Jia Z. Imbalance of regulatory T cells and T helper type 17 cells in patients with chronic hepatitis C. Immunology. 2014 Dec;143(4):531-8. doi: 10.1111/imm.12330.

[13] Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. Hepatology. 1996 Aug;24(2):289-93.

[14] Vermeersch P, Gijbels K, Mariën G, Lunn R, Egner W, White P, Bossuyt X. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. Clin Chem. 2008 Jan;54(1):39-43.

[15] Karlsson F, Hassan-Zahraee M. Quantification of Th1 and Th17 Cells with Intracellular Staining Following PMA/Ionomycin Stimulation. Curr Protoc Cytom. 2015 Jan 5;71:6.35.1-7. doi: 10.1002/0471142956.cy0635s71.

[16] Oo YH, Banz V, Kavanagh D, Liaskou E, Withers DR, Humphreys E, Reynolds GM, Lee- Turner L, Kalia N, Hubscher SG, Klenerman P, Eksteen B, Adams DH. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. J Hepatol. 2012 Nov;57(5):1044-51. doi: 10.1016/j.jhep.2012.07.008.

[17] Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. PLoS One. 2014 Jun 6;9(6): e98521. doi: 10.1371/journal.pone.0098521.

[18] Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. J Autoimmun. 2015 Jun;60:1-11. doi:10.1016/j.jaut.2015.04.006.

[19] Konya C, Paz Z, Apostolidis SA, Tsokos GC. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases. Cytokine. 2015 Oct;75(2):207-15. doi:10.1016/j.cyto.2015.01.003.

[20] Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. Microbes Infect. 2009 Apr;11(5):625-30. doi: 10.1016/j.micinf.2009.04.003.

[21] Oliveira IS, Carvalho LP, Schinoni MI, Paraná R, Atta AM, Atta ML. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12 weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin. Microb Pathog. 2016 Feb;91:155-60. doi: 10.1016/j.micpath.2015.12.007.

[22] Burra P, Masier A, Morisco F, Di Leo V, Zorzi M, Senzolo M, Marchini F, Guido M, Canova D, Floreani A, Burroughs AK. HCV infection in haemodialysed patients: a role for serum IL-10 and TGF-beta1 in liver damage? Dig Liver Dis. 2008nOct;40(10):827-33. doi:10.1016/j.dld.2008.01.022.

[23] Chen TY, Hsieh YS, Wu TT, Yang SF, Wu CJ, Tsay GJ, Chiou HL. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection. Transl Res. 2007 Aug; 150(2):116-21

[24] Kared H, Fabre T, Bédard N, Bruneau J, Shoukry NH. Galectin-9 and IL-21 mediate crossregulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. PLoS Pathog. 2013; 9(6):e1003422. doi: 10.1371/journal.ppat.1003422.

[25] Sousa GM, Oliveira IS, Andrade LJ, Sousa-Atta ML, Paraná R, Atta AM. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. Cytokine. 2012 Oct;60(1):138-42. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.003.

[26] Gutkowski K, Hartleb M, Kacperek-Hartleb T, Musialik J, Boryczka G, Kajor M. Serum levels of interleukin 17 and its activators in chronic hepatitis C patients. Central European J Immunol 2013; 1: 76–79

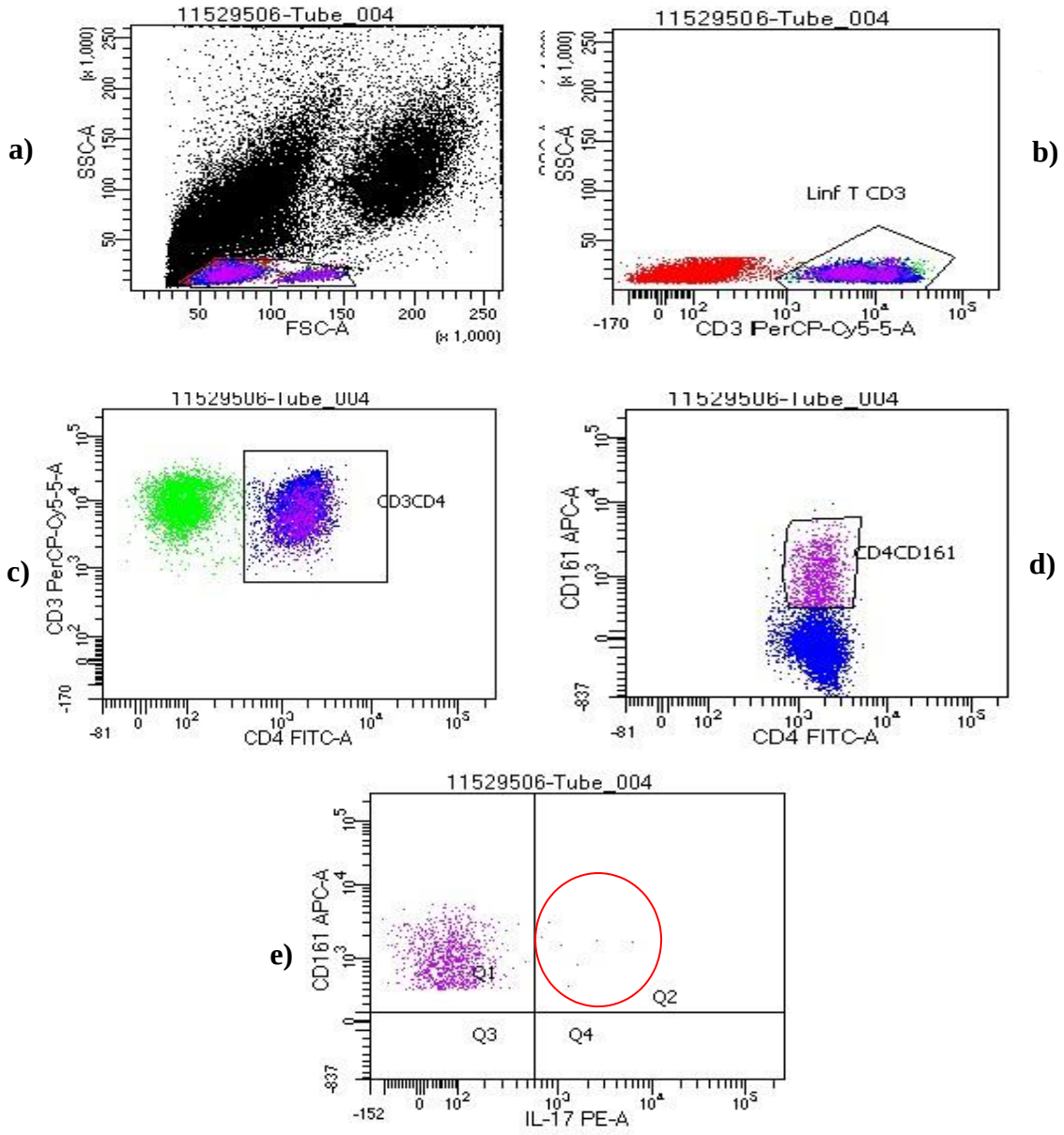

Figura 1. Citometria de fluxo ("gates") para determinação de linfócitos Th17 ($CD3^+CD4^+CD161^+IL\text{-}17A^+$). a) Seleção de linfócitos do sangue periférico, identificados por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). b) Seleção de linfócitos T. c) Seleção de linfócitos T $CD4^+$. d) Seleção de linfócitos T $CD4^+CD161^+$. e) Seleção de linfócitos T $CD4^+CD161^+$ secretores de IL-17A (Q2).

Tabela 1. Características demográficas, virológicas e clínicas de pacientes com hepatite C crônica (HCC) não-tratada e pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (NR).

Características	**(HCC, N = 20)**	**(NR, N = 10)**
Gênero		
Homens	6/20 (30%)	3/10 (30%)
Mulheres	14/20 (70%)	7/10 (70%)
Idade (anos)	59 (46-66)	59 (52-65)
Homens	52 (41-64)	59 (59-65)
Mulheres	61 (55-67)	52 (51-66)
Genótipo		
Gen 1	20/20 (100%)	10/10 (100%)
Histologia hepática		
Fibrose		
F0 - F2 (ausência/leve/moderada)	13/16 (81%)	6/9 (67%)
F3 - F4 (avançada/cirrose)	3/16(19%)	3/9 (33%)
Não avaliada	4/20 (20%)	1/10 (10%)
Atividade necroinflamatória		
A0	3/10 (30%)	3/9 (33%)
A1-A2	7/10 (70%)	6/9 (67%)
Não avaliada	10/20 (50%)	1/10 (10%)
Carga viral		
Baixa ($< 6 \times 10^5$ UI/mL)	8/20 (40%)	4/10 (40%)
Alta ($\geq 6 \times 10^5$ UI/mL)	12/20 (60%)	6/10 (60%)

Tabela 2. Achados laboratoriais em pacientes com hepatite C crônica (HCC) não-tratada e pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (NR).

Achados laboratoriais	**HCC** **N= 20**	**NR** **N = 10**
NOSA (%)	55%	70%
ANA (%)	15%	50%
SMA (%)	20%	40%
FR (%)	60%	20%
Crioglobulinas (%)	10%	30%
ALT (UI/L)	48 (32 - 85)	60 (31 - 86)
AST (UI/L)	52 (36 - 120)	68 (41 - 85)
Leucócitos totais (células/mL)	6.198 ± 2.498	5.119 ± 1.932
Linfócitos (células/mL)	2.005 ± 666	2.035 ± 793

*Todos os valores de $p > 0,05$.

NOSA: autoanticorpos não-órgão-específicos. ANA: anticorpo antinuclear. SMA: anticorpo antimúsculo liso. FR: Fator reumatoide.

Valores de referência: Autoanticorpos: Não-reagente; ALT/AST: (41U/L); Leucócitos totais: 3700-10.000/mL; Linfócitos: 720-4.800/mL.

Tabela 3. Proporção e contagem absoluta das subpopulações de linfócitos T no sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica (HCC) não-tratada, pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (NR) e indivíduos saudáveis (controles).

	HCC	**NR**	**Controles**	**Valor de *p***
$TCD4^+$ (%) IQR	56 (50-60)	54 (45-63)	56 (50-64)	0,85
$TCD4^+$ (células/mm^3) IQR	1.114 (757-1.388)	1.086 (797-1.452)	1.341 (1.013-1.649)	0,07
$TCD8^+$ (%) IQR	33 (26-40)	37 (30-41)	33 (29-44)	0,76
$TCD8^+$ (células /mm^3) IQR	723 (439-888)	588 (461-923)	789 (536-1.129)	0,36
Th17(%)	0,70 (0,5-1,4)	0,67 (0,4-0,9)	2,50 (2,0-3,0)	<0,0001
Th17(células /mm^3) IQR	14,0 (11-26)	12,5 (10-17)	52,0 (41-84)	<0,0001

As subpopulações de linfócitos T estão representadas em percentual e números absolutos (mediana e intervalo interquartílico Q1-Q3).

4.6 Conclusões:

- A infecção crônica pelo vírus da hepatite C causa uma desregulação das células imunes do hospedeiro, seja em suas frequências ou em suas funções, no sangue periférico.
- Existe uma diminuição da proporção de células Th17 do sangue periférico, em pacientes não-tratados e não-respondedores ao tratamento antiviral. Em relação às células $TCD4^+$ e $CD8^+$, não houveram diferenças entre os grupos.
- A diminuição do número dessas células não está associada com viremia, autoimunidade ou lesão hepática.

5 CAPÍTULO 2: Artigo 2: Resposta imune de citocinas associadas à Th17 por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite C.

(Cytokine)

Milena S. Cabral [a], Taciana P.S. Santos [a], Priscila L. Santos [b], Maria Isabel Schinoni [c], Isabela S. Oliveira [d], Ariana B. Pereira [d], Ajax M. Atta [d], Maria Luiza B. Sousa-Atta [d,*]
[a] Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil
[b] Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Federal de Sergipe, Brasil
[c] Serviço de Gastroenterologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil
[d] Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil
*Autor correspondente: Dra. Maria Luiza BS Atta. e-mail: mluiza@ufba.br

Resumo

Introdução: A hepatite C crônica provoca uma disfunção imune celular grave. Objetivo: Nós investigamos a produção de citocinas associadas à Th17 por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes portadores da infecção pelo vírus da hepatite C, não tratados. Foram também investigadas as CMSP de pacientes com hepatite C crônica que apresentaram uma resposta virológica precoce após12 semanas de tratamento com interferon-α e ribavirina, combinados ou não com inibidores de protease do VHC, e de indivíduos que não responderam à terapia antiviral. Métodos: CMSP foram estimuladas separadamente com antígenos do core do VHC e proteínas não estruturais e examinadas pela produção de mediadores imunes com um imunoensaio Milliplex® MAP. Resultados: As CMSP de pacientes não tratados e não respondedores produziram IL-17A para o antígeno do core, mas uma produção vigorosa de IL-17A contra o antígeno NS3 foi apenas verificada no grupo não tratado. CMSP de pacientes não-respondedores, também produziram IL-17F para o peptídeo do core. A produção de IL-21 foi inalterada nos três grupos de pacientes, enquanto que IL-17E e IL-22 não foram detectadas. Em pacientes que apresentaram uma resposta virológica precoce, a produção de citocinas do perfil Th17, por CMSP estimuladas foi insignificante. Os níveis de IL-17A ou IL-17F não foram correlacionados com os níveis de ALT e não foi encontrada associação entre a produção de IL-17A e fibrose hepática ou viremia. Conclusões: Os pacientes com hepatite C não tratados e os indivíduos não-respondedores ao tratamento antiviral diferem na resposta imune de citocinas associadas à Th17, por CMSP. Os pacientes não tratados têm uma produção de IL-17A para o antígeno do core do VHC e o antígeno NS3, enquanto que os indivíduos não-respondedores produzem IL-17A e IL-17F para o core do VHC.

Palavras-chave: Hepatite C, citocinas Th17, tratamento antiviral, lesão hepática, autoimunidade.

5.1 INTRODUÇÃO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C é epidêmica e também está associada a uma alta morbidade e mortalidade. Embora a prevalência global de indivíduos soropositivos ao VHC tenha sido estimada em 1,6% (1,3-2,1%), correspondendo a 115 milhões, a prevalência global de indivíduos portadores da infecção foi estimada em 1%, atingindo 71 milhões [1].

A infecção crônica pelo VHC está associada ao carcinoma hepático, mas sua persistência é apenas parcialmente explicada. No entanto, é afirmado que indivíduos que controlam precocemente a infecção pelo VHC expressam interferon-γ (IFN-γ) no fígado várias semanas após o início da doença e produzem várias quimiocinas e citocinas envolvidas no processamento e apresentação do antígeno [2,3].

Os indivíduos que resolveram espontaneamente a hepatite C aguda têm uma produção aumentada de linfócitos T CD4+ e CD8+ que visam especificamente epítopos antigênicos do core e de proteínas não-estruturais (regiões NS3/4A e NS5B). A proteína NS3 tem os epítopos mais imunogênicos do VHC e a resposta imunitária celular contra estes epítopos mata as células infectadas com VHC por um mecanismo citotóxico ou inibe a replicação do vírus através das ações de IFN-y e TNF- α [4].

Uma resposta imune fraca e inefetiva ao vírus permite que a proteína NS5A do VHC iniba a produção intra-hepática de citocinas antivirais como IFN-y, contribuindo para a perda da função antiviral das células T e persistência do VHC [5,6].

As células Th17 e outras fontes celulares produzem um conjunto de citocinas que têm sido implicadas na resposta imune adaptativa observada na hepatite C crônica e outras doenças do fígado. Por outro lado, alguns destes mediadores imunes como a IL-17A podem estar associados com lesões hepáticas e progressão da doença. Além disso, o grau de inflamação hepática estaria diretamente correlacionado com a infiltração de células Th17 [7-11].

Alguns estudos têm investigado o envolvimento de citocinas associadas ao perfil Th17 no tratamento antiviral da hepatite C crônica [12]. No entanto, esses dados ainda precisam ser melhor esclarecidos. Este estudo investigou a resposta imune de citocinas associadas à Th17, na hepatite C crônica. Assim, avaliamos a produção desses mediadores imunes em CMSP de pacientes não tratados, em indivíduos que apresentaram resposta virológica às 12 semanas de tratamento antiviral com IFN-α e ribavirina, isoladamente, ou em combinação com boceprevir ou telaprevir, além de pacientes não-respondedores a esta terapia. O perfil das citocinas Th17 desses indivíduos também foi analisado considerando seus achados clínicos e laboratoriais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 **Pacientes**

Este estudo incluiu 18 pacientes cronicamente infectados com VHC (8 mulheres e 10 homens, com média de idade de 53 ± 9 anos) que foram reavaliados na 12ª semana de tratamento antiviral. Onze dos 18 pacientes foram tratados apenas com interferon-α/ ribavirina. Sete dos 18 foram tratados com IFN-α/ribavirina associados ao boceprevir ou telaprevir. O grupo de pacientes não respondedores foi representado por 10 indivíduos com idade média de 55 ± 8 anos (faixa de 42-66 anos), 4 homens e 6 mulheres. Eles foram previamente tratados com IFN-α e ribavirina, mas exibiram significativa viremia 24 semanas após ou não tiveram uma diminuição de HCV-RNA inferior a 2 logs UI/mL em 12 semanas de tratamento. Todos foram diagnosticados com hepatite C crônica no Serviço de Gastro-Hepatologia do Hospital Professor Edgard Santos, em Salvador, Bahia, após exames clínicos, sorológicos (ELISA de 3ª geração) e moleculares (VHC-RNA). Todos os pacientes desse estudo estavam infectados com o genótipo 1 do VHC e seus dados de carga viral e histologia do fígado ou Fibroscan® foram obtidos de seus prontuários. Pacientes com coinfecções virais por HIV, HTLV e vírus da hepatite B ou com neoplasia ou doenças crônicas autoimunes ou inflamatórias não foram incluídos no estudo aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Professor Edgar Santos.

5.2.2 **Exames bioquímicos e imunológicos**

As amostras de soro dos pacientes foram analisadas quanto aos níveis de alanina aminotransferase (ALT) pela metodologia cinética-UV e para autoanticorpos não-órgãos específicos (NOSA) e crioglobulinas. Anticorpos antinucleares (ANA) foram pesquisados por imunofluorescência indireta (IFAT), usando células Hep-2000 (Immuno Concepts, EUA; *cutoff* <40). Anticorpos antimúsculo liso (SMA, *cutoff* <40) também foram pesquisados por IFAT, mas usando seções de tecido de rim/fígado/estômago (Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, Alemanha). O fator reumatoide sérico (RF) foi pesquisado por nefelometria automatizada (Immage, Beckman Coulter, EUA, *cutoff* <20 UI/mL). Os anticorpos anti-CCP foram investigados por ELISA indireto utilizando antígenos peptídicos citrulinados (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Alemanha, *cutoff* < 20 U/mL). A presença de

crioglobulinas séricas foi investigada a 4ºC por 7 dias e a sua presença confirmada por dissolução após 1h de incubação a 37ºC.

5.2.3 **Estimulação antigênica de células mononucleares de sangue periférico (CMSP)**

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por centrifugação utilizando um gradiente de densidade de Ficoll-Paque Premium™ (GE Healthcare, Suécia) [13]. Elas foram ajustadas para $1{,}0x10^6$ células/mL em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal, glutamina 2mM, HEPES 25mM (pH 7,2) e antibiótico (Cultilab, Brasil). A esse meio adicionou-se 10 mg/mL de gentamicina (SIGMA-ALDRICH, EUA). Adicionou-se 100 μL da suspensão celular aos poços de uma microplaca de cultura (KASVI, China). Os controles positivos foram 10^5 células/poço estimuladas com 10 uL de uma solução de fitohemaglutinina (PHA, 5 ug/mL), enquanto que os controles negativos foram 10^5 células/poço cultivadas na ausência de estímulos. Os testes com os antígenos foram realizados adicionando em poços separados (10^5 células/poço), 10 μL de cada solução de antígeno contendo 10 μg/mL de peptídeos recombinantes do core do VHC (AA 2 a 192) e fragmentos de proteínas não-estruturais do VHC NS3 (AA 1450 a 1643), NS4 (AA 1658 a 1863), and NS5 (AA 2061 a 2302); (ABCAM, UK). Os controles e ensaios foram realizados no mínimo em triplicata. As microplacas contendo os controles e testes foram incubadas durante cinco dias a 37°C na presença de 5% de CO2. Após incubação, os sobrenadantes da cultura foram obtidos por centrifugação a 4°C (1900 rpm, 10 minutos) e armazenados a -80°C para determinar os níveis de citocinas.

5.2.4 **Determinação das concentrações de citocinas**

Utilizou-se um imunoensaio multiplex da Millipore (Milliplex® MAP, Millipore Corporation, EUA) para determinar os níveis de citocinas associadas a Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23 e IL-17E) nos sobrenadantes das culturas de CMSP (controles e células estimuladas com os antígenos). O imunoensaio foi realizado num analisador MAGPIX (Merck, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. Os limites de detecção mais baixos desse imunoensaio foram: IL-17A (2,1 pg/mL), IL-17F (9 pg/mL), IL-21 (2 pg/mL), IL-22 (2,1 pg/mL), IL-23 (9,8 pg/mL) e IL-17E (9,9 pg/mL).

5.2.5 **Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prism versão 6.0 (GraphPad Software Inc., EUA). O teste de D'Agostino-Pearson analisou a distribuição das variáveis. O Teste Exato de Fischer foi utilizado para investigar a associação entre dois grupos categóricos. As medianas de dois grupos foram comparadas com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, enquanto que o teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar uma variável pareada de um grupo. O teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, comparou as medianas de três e mais grupos. As proporções foram comparadas com o teste do qui-quadrado. Nessas análises, um valor de p menor de 0,05 foi considerado significativo.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 **Achados laboratoriais**

Este estudo envolveu 18 pacientes infectados com o genótipo 1 do VHC, antes e nas 12 semanas de tratamento antiviral. Quatorze pacientes desse grupo fizeram histopatologia do fígado após biópsia hepática e dois foram diagnosticados pelo Fibroscan®. Dois indivíduos desse grupo não foram avaliados quanto à lesão hepática. A maioria dos pacientes não tratados (11/16, 69%) apresentou fibrose leve (F1 e F2), enquanto fibrose mais avançada (F3 e F4) foi observada em 5 de 16 (31%) pacientes. A presença de atividade necroinflamatória do fígado foi examinada em 14 pacientes. Em dois deles, essa atividade foi ausente (A0, 14%), três de 14 (21%) tiveram baixa atividade, enquanto sete de 14 apresentaram atividade necroinflamatória leve (A2). A maioria dos pacientes (13/18, 72%) apresentou carga viral elevada (> 800.000 UI/mL), enquanto que em quatro foi baixa (<800.000 UI/mL). Um paciente não fez esse exame. Oito em 18 (44%) pacientes não tratados apresentaram atividade ALT aumentada (> 41 U/L). Os anticorpos antinucleares e de músculo liso foram observados em apenas um (6%) e 8/18 (44%) desses indivíduos, respectivamente, enquanto que a presença de fator reumatoide foi detectada em 7/18 (39%) deles. Anticorpos anti-CCP não foram encontrados. Cinco dos 18 indivíduos (28%) apresentaram crioglobulinemia.

Na 12ª semana do tratamento, 15 dos 18 pacientes apresentaram uma resposta virológica precoce (RVP). Dez dos 15 (67%) pacientes apresentaram viremia indetectável e cinco (33%)

apresentaram uma redução de mais de 2 log de sua carga viral do VHC. Três dos 18 pacientes (17%) foram não-respondedores nulos. A prevalência de NOSA (ANA, SMA e fator reumatoide) nos pacientes antes e após tratamento antiviral foi semelhante.

O grupo não-respondedor (NR), de 10 pacientes, apresentou carga viral alta. A fibrose leve (F2) foi observada em 5/10 (50%) pacientes, enquanto os demais apresentavam fibrose avançada (F3-F4). Cinco pacientes deste grupo não tiveram atividade necroinflamatória (50%), enquanto os demais apresentaram o estágio leve (A1). Em comparação com os pacientes não tratados, a proporção de indivíduos NR sem atividade necroinflamatória ou apresentando baixa atividade foi diferente ($p = 0,0015$). Quatro pacientes deste grupo apresentaram ALT elevado (> 41 U/L). O fator reumatoide foi detectado em 3/10 (30%) indivíduos, 7/10 (70%) eram soropositivos para SMA, enquanto que 3/10 (30%) tinham crioglobulinemia.

5.3.2 **Concentrações das citocinas**

Após a estimulação de CMSP com peptídeos antigênicos do core do VHC e das proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5, foi observada uma produção significativa de IL-17A contra o core, em pacientes não tratados, e mais vigorosamente em indivíduos NR (Fig. 1). Interessantemente, o antígeno NS3 estimulou uma resposta imune específica e potente de IL-17A apenas em CMSP de pacientes não tratados (Fig. 1). A resposta virológica precoce de 15 destes indivíduos na semana 12 de tratamento com IFN-a/ ribavirina inibiram a sua produção de IL-17A contra os antígenos do VHC (Fig. 1). Uma produção significativa de IL-17F só foi observada em CMSP de não-respondedores, e apenas para o antígeno do core do VHC (Fig. 2). As CMSP dos três grupos não produziram IL-21 de forma significativa, após a estimulação com antígenos do vírus C (Fig. 3). Não houve produção detectável de IL-17E ou IL-22 nas CMSP nos três grupos de pacientes investigados, após estimulação com os mesmos antígenos.

Os níveis de IL-17A ou IL-17F produzidos por CMSP contra os diferentes estímulos antigênicos do VHC, não foram correlacionados com os níveis de ALT em pacientes não tratados e não-respondedores, nem estavam associados com fibrose hepática ou viremia do VHC.

5.4 DISCUSSÃO

O presente estudo examinou a produção de citocinas associadas a Th17 em pacientes cronicamente infectados com o VHC, antes e após o tratamento antiviral com interferon-α e ribavirina, isoladamente ou em combinação com boceprevir ou telaprevir. Os pacientes tratados foram representados por indivíduos que tiveram uma resposta virológica precoce às 12 semanas de tratamento, completa ou parcial, e por indivíduos que apresentaram anteriormente uma falha do tratamento antiviral. Todas as pessoas incluídas no estudo tinham uma história de infecção com o genótipo 1 de VHC, predominando em pacientes não tratados e não-respondedores, uma viremia elevada deste vírus.

Uma produção significativa de IL-17A por CMSP, estimuladas com core do VHC e antígenos NS3, foi demonstrada em pacientes não tratados. Além disso, as CMSP de pacientes NR exibiram uma resposta imune significativa de IL-17A e IL-17F contra o antígeno do core do VHC. Diferentemente, as CMSP de indivíduos com uma resposta virológica não produziram estas citocinas, após a estimulação com antígenos do vírus.

A proteína core do VHC exerce funções inibitórias em células imunes, suprimindo a ativação e proliferação de células T $CD8^+$. Nas células T $CD4^+$, também inibe a sua proliferação e induz uma diminuição na produção de IL-2. Além disso, o core do vírus aumenta a secreção de IL-10, e podendo ter um efeito apoptótico nestas células. Nas células B, o core do VHC promove a proliferação celular, aumenta a produção de IgM e IgG, e a expressão de quimiocinas e receptores co-estimulatórios [13].

A proteína NS3 não-estrutural é uma proteína do tipo DEXH/D-Box de 70 kDa que exibe uma atividade de serina protease na sua região N-amino terminal e uma atividade ATPase helicase na sua porção C-terminal. A protease NS3 requer a subunidade NS4A como cofator para clivar a poliproteína do VHC. O domínio desta protease NS3 também interage com o RNA do vírus, participando do processo de replicação viral. O complexo NS3-4A contribui para a evasão do VHC da resposta imune inata mediada pelo interferon α/β, por direcionamento e clivagem da proteína adaptadora do promotor de interferon-1 (IPS-1). Embora esta atividade possa ser inibida por inibidores de protease, combinada com interferon-α/ribavirina, foram relatadas mutações associadas à resistência para o complexo NS3-4A [14,15].

Recentemente, verificamos uma queda significativa no subconjunto de células Th17 das CMSP de pacientes não tratados e não-respondedores, portadores do vírus C (submetido). Por outro lado, os efeitos supressores do IFN-α na expressão de IL-17A foram demonstrados em

pacientes com colite ulcerativa tratados com este medicamento. Nestes indivíduos, o tratamento com IFN-α suprimiu a expressão de ambos os RNAm de IL-17A em biópsias de tecido do cólon, assim como a expressão de RNAm de IL-17A e a produção desta citocina, em CMSP humanas. Além disso, INF-α parece interferir na regulação da diferenciação para o perfil Th17, através da baixa expressão do RNAm do fator de transcrição RORC [16, 17]. Em nossos achados, a terapia antiviral e a baixa contagem de células Th17 no sangue de pacientes NR não inibiram a produção de IL-17A para o antígeno do core do VHC, mas suprimiram a resposta imune frente ao antígeno NS3, o qual apresentou-se de forma vigorosa, nos pacientes T0 (não tratados). Deste modo, a resposta imune ativa de IL-17A a estes antígenos do VHC, aqui demonstrada em pacientes não tratados e NR, poderia estar associada a um esforço de células produtoras de IL-17A em controlar a infecção por VHC. No entanto, estes resultados também sugerem a presença de células secretoras de IL-17, em pacientes não-respondedores, que são resistentes ao IFN-α e produzem IL-17A e IL-17F após estimulação específica com antígeno do core do VHC.

Em discordância com um estudo anterior [18], não encontramos associação entre a resposta imune de IL-17A por CMSP, com fibrose hepática, nem uma correlação entre a produção desta citocina e os níveis séricos de ALT observados em pacientes T0 e NR. Entretanto, a maioria dos pacientes incluídos neste trabalho não apresentou fibrose hepática avançada ou atividade necroinflamatória significativa.

A IL-17A é uma citocina que tem sido associada à patogênese de várias doenças autoimunes e condições inflamatórias como a artrite reumatóide e doenças hepáticas crônicas, como a hepatite. Em contraste, a IL-17A pode exibir um efeito protetor contra infecções causadas por muitos fungos e bactérias e uma resposta imunológica adaptativa mais vigorosa tem sido associada às células Th17, quando reencontram um mesmo patógeno [19,20]. No entanto, em algumas infecções virais, como a influenza, a IL-17A promove uma lesão pulmonar aguda [21].

Uma produção significativa de IL-17F por CMSP, após estímulo antigênico, foi apenas observada em pacientes NR e, exclusivamente, com o antígeno do core do VHC. IL-17F pertence à família IL-17; ela mostra cerca de 50% da identidade de aminoácidos para IL-17A e compartilha muitas das atividades biológicas desta citocina. Os homodímeros e heterodímeros de IL-17A e IL-17F são produzidos e secretados principalmente por células Th17. No entanto, outras células também podem produzir estas citocinas, tais como células T $CD8^+$, células *natural killer* (NK), células Tγδ, células T (iNKT) *natural killer* invariantes, células indutoras do tecido linfóide (LTi), monócitos ativados e neutrófilos [22]. Ambas as

citocinas podem desencadear a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como CXCL8, IL-6 e TNF-α e proteínas de fase aguda. Em um estudo prévio, nosso grupo mostrou um aumento no nível sérico de IL-17F em pacientes cronicamente infectados com VHC, apresentando níveis elevados de ALT [22]. Além disso, há uma alteração no nível de IL-6 de indivíduos com atividade necroinflamatória hepática moderada e de algumas proteínas de fase aguda como α1-antitripsina e ferritina [23,24].

No presente estudo, as CMSP dos pacientes não tratados, RVP e NR não apresentaram uma produção significativa de IL-21 após estimulação com antígenos do core e não-estruturais do VHC. A IL-21 é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por células Th17 e células T auxiliares foliculares, que exercem uma forte regulação imune em diferentes células imunitárias. Pode atuar sobre as células B, induzindo a sua proliferação, troca de isotipos e a sua diferenciação em plasmócitos, além da secreção de anticorpos IgG1, IgG3 e IgA. Esta citocina pode ativar as células T $CD8^+$, NKT e NK melhorando as suas funções antivirais. O aumento da produção de IL-21 tem sido observado em várias doenças autoimunes como lúpus, artrite reumatóide e diabetes tipo 1 [25]. Embora esta pequena produção de IL-21 contraste com a presença de achados autoimunes (SMA, RF e crioglobulinas, principalmente em pacientes NR), este achado está de acordo com o de um estudo anterior que demonstrou uma baixa produção de IL-21 em pacientes com hepatite C [26].

As CMSP dos três grupos de pacientes estudados não produziram níveis detectáveis de IL-17E ou IL-22, após estimulação com antígenos do VHC. No entanto, a produção de IL-22, em conjunto com IL-17 por células Th17 humanas, é limitada, justificando os nossos resultados de aumento da produção de IL-17A por CMSP, dissociada de qualquer produção de IL-22.

Embora a IL-22 possa ser detectada no soro de alguns indivíduos saudáveis e de pacientes portadores do VHC, a infecção crônica por este vírus não aumenta os níveis séricos dessa citocina [23, 28]. Em contraste com a IL-17E, uma citocina pouco estudada na inflamação e doenças hepáticas crônicas, a IL-22 tem sido objeto de vários estudos associados, principalmente, à inflamação e gênese de vários tumores humanos, tais como o carcinoma hepatocelular. A IL-22 pertence à família IL-10 e pode ser produzida por células Th1, Th22 e Th17, como linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ e células Tγδ. Além destas, células envolvidas na resposta imune inata como células NKT e células residentes do fígado do tipo 3 (3 ILC's) podem produzir IL-22. Os efeitos biológicos da IL-22 no fígado incluem a prevenção da apoptose celular, a promoção da sobrevivência e proliferação celular, além da regulação negativa para o desenvolvimento de fibrose. Além disso, a IL-22 pode induzir a produção de

proteínas de fase aguda neste órgão. Na hepatite C, a IL-22 não controla a infecção viral ou a replicação do VHC. No entanto, pode diminuir a lesão hepática, evitando a apoptose e promovendo a capacidade regenerativa de células progenitoras de hepatócitos. Embora haja uma superregulação da expressão de IL-22, no fígado de pacientes com infecção crônica por VHC, ela não está associada a um efeito antiviral direto [29,30].

Concluindo, na hepatite C crônica, nossos achados sugerem uma resposta imune de citocinas associadas ao perfil Th17, em CMSP, para antígenos do VHC, que diferem em pacientes não tratados e não-respondedores, podendo envolver diferentes mecanismos imunológicos e fontes celulares para esses mediadores imunológicos. Além disso, CMSP produtoras de IL-17A e IL-17F, que são resistentes à supressão mediada por IFN-α, parecem estar presentes em pacientes que não respondem ao tratamento antiviral e são capazes de produzir níveis elevados destas citocinas quando desafiados com o antígeno do core do VHC.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant 477008 / 2013-5.

5.5 REFERÊNCIAS

1. Manns MP, Buti M, Gane E, Pawlotsky JM, Razavi H, Terrault N, Younossi Z. Hepatitis C virus infection. Nat Rev Dis Primers. 2017 Mar 2;3:17006. doi:10.1038/nrdp.2017.6.
2. Han ZQ, Huang T, Deng YZ, Zhu GZ. Expression profile and kinetics of cytokines and chemokines in patients with chronic hepatitis C. Int J Clin Exp Med. 2015 Oct15;8(10):17995-8003.
3. Antonelli A, Ferrari SM, Ruffilli I, Fallahi P. Cytokines and HCV-related autoimmune disorders. Immunol Res. 2014 Dec;60(2-3):311-9. doi: 10.1007/s12026-014-8569-1.
4. Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. J Clin Virol. 2005 Feb;32(2):75-85.
5. Barth H. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. World J Hepatol. 2015 Apr 18;7(5):725-37. doi:

10.4254/wjhv7.i5.725.

6. Petrovic D, Dempsey E, Doherty DG, Kelleher D, Long A. Hepatitis C virus--T-cell responses and viral escape mutations. Eur J Immunol. 2012 Jan;42(1):17-26. doi: 10.1002/eji.201141593.
7. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. Clin Dev Immunol. 2011;2011:345803. doi: 10.1155/2011/345803.
8. Claassen MA, Janssen HL, Boonstra A. Role of T cell immunity in hepatitis C virus infections. Curr Opin Virol. 2013 Aug;3(4):461-7. doi: 10.1016/j.coviro.2013.05.006.
9. Chang Q, Wang YK, Zhao Q, Wang CZ, Hu YZ, Wu BY. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;27(2):273-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06782.x.
10. Foster RG, Golden-Mason L, Rutebemberwa A, Rosen HR. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. Dig Dis Sci. 2012 Feb;57(2):381-9. doi: 10.1007/s10620-011-1997-z.
11. Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. Cell Mol Immunol. 2010 Jul;7(4):250-4. doi: 10.1038/cmi.2010.5.
12. Bowen DG. Finding a role for Th17 cells in hepatitis C pathogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;27(2):188-91. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.07033.x
13. Fernández-Ponce C, Dominguez-Villar M, Muñoz-Miranda JP, Arbulo-Echevarria MM, Litrán R, Aguado E, García-Cozar F. Immune modulation by the hepatitis C vírus core protein. J Viral Hepat. 2017 Jan 16. doi: 10.1111/jvh.12675.
14. Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defense by hepatitis C virus. Nature. 2005 Aug 18;436(7053):939-45.
15. Johnson CL, Owen DM, Gale M Jr. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3.4A protease control of antiviral immune defense. J Biol Chem. 2007 Apr 6;282(14):10792-803.
16. Moschen AR, Geiger S, Krehan I, Kaser A, Tilg H. Interferon-alpha controls IL-17 expression in vitro and in vivo. Immunobiology. 2008;213(9-10):779-87. doi:10.1016/j.imbio.2008.07.022.
17. Hirohata S, Shibuya H, Tejima S. Suppressive influences of IFN-alpha on IL-17 expression in human CD4+ T cells. Clin Immunol. 2010 Mar;134(3):340-4. doi:10.1016/j.clim.2009.11.012.).

18. Cachem FC, Dias AS, Monteiro C, Castro JR, Fernandes G, Delphim L, Almeida AJ, Tavares F, Maciel AM, Amendola-Pires MM, Brandão-Mello CE, Bento CA. The proportion of different interleukin-17-producing T-cell subsets is associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C. Immunology. 2017 Jan 31. doi:10.1111/imm.12720.
19. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol Rev. 2008 Dec;226:57-79. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x.
20. Chen K, Kolls JK. Interluekin-17A (IL17A). Gene. 2017 May 30;614:8-14. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.016.
21. Li C, Yang P, Sun Y, Li T, Wang C, Wang Z, Zou Z, Yan Y, Wang W, Wang C, Chen Z, Xing L, Tang C, Ju X, Guo F, Deng J, Zhao Y, Yang P, Tang J, Wang H, Zhao Z, Yin Z, Cao B, Wang X, Jiang C. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. Cell Res. 2012 Mar;22(3):528-38. doi: 10.1038/cr.2011.165.
22. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. J Clin Immunol. 2010 Mar;30(2):185-95. doi: 10.1007/s10875-010-9369-6.
23. Sousa GM, Oliveira IS, Andrade LJ, Sousa-Atta ML, Paraná R, Atta AM. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. Cytokine. 2012 Oct;60(1):138-42. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.003.
24. Atta M, Cabral M, Santos G, Paraná R, Atta A. Inflammation biomarkers in chronic hepatitis C: association with liver histopathology, HCV genotype and cryoglobulinemia. Inflamm Res. 2012 Oct;61 (10):1101-6. doi: 10.1007/s00011-012-0502-2.
25. Tangye SG. Advances in IL-21 biology - enhancing our understanding of human disease. Curr Opin Immunol. 2015 Jun;34:107-15 doi:10.1016/j.coi.2015.02.010.
26. Spaan M, Kreefft K, de Graav GN, Brouwer WP, de Knegt RJ, ten Kate FJ, Baan CC, Vanwolleghem T, Janssen HL, Boonstra A. CD4+ CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses. J Hepatol. 2015 Feb;62(2):303-10. doi: 10.1016/j.jhep.2014.09.024.
27. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. Immunol Rev. 2013 Mar;252(1):116-32. doi: 10.1111/imr.12027.

28. Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, Heeg MH, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S. The role of interleukin-22 in hepatitis C virus infection. Cytokine. 2008 Mar;41(3):209-16. doi: 10.1016/j.cyto.2007.11.016.
29. Cobleigh MA, Robek MD. Protective and pathological properties of IL-22 in liver disease: implications for viral hepatitis. Am J Pathol. 2013 Jan;182(1):21-8. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.043.
30. Carmo RF, Cavalcanti MS, Moura P. Role of Interleukin-22 in chronic liver injury. Cytokine. 016 Nov 2. doi: S1043-4666(16)30477-X. doi 10.1016/j.cyto.2016.08.023.

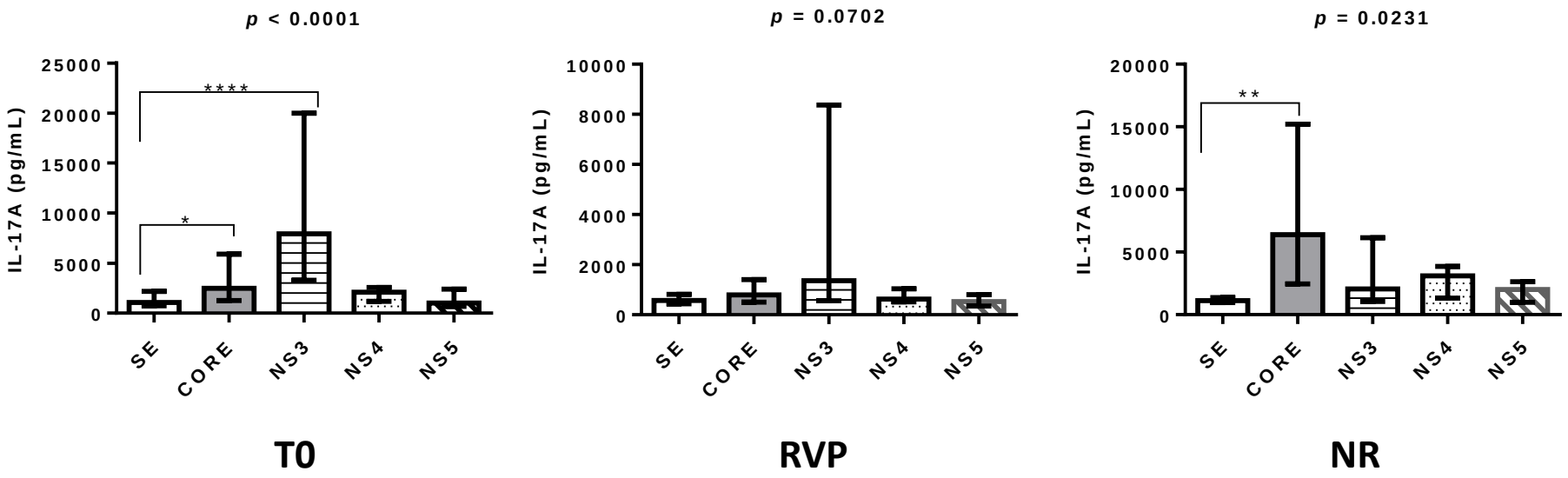

Figura 1. Produção de IL-17A em CMSP de pacientes com HCC não tratados (T0, n=18), indivíduos que apresentaram resposta virológica precoce (RVP) na 12ª semana de tratamento antiviral (n=15) e de pacientes que não responderam a esta terapia (NR, n=10). Os níveis de IL-17A foram determinados nos sobrenadantes da cultura de CMSP não estimuladas e estimuladas com antígenos do core do VHC e as proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5, que são mostradas como medianas com intervalo interquartil. As medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando células não estimuladas como o controle da ausência de estimulação antigênica (SE), *p <0,05, ** p <0,01, **** p <0,0001.

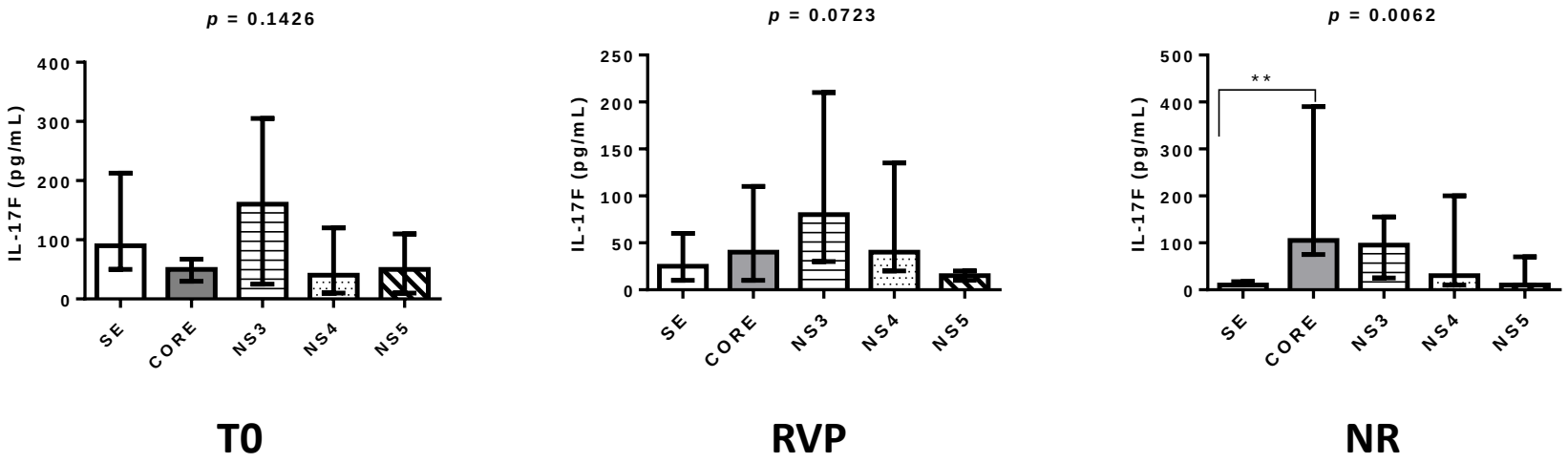

Figura 2. Produção de IL-17F em CMSP de pacientes com HCC não tratados (T0, n=18), indivíduos que apresentaram resposta virológica precoce (RVP) na 12ª semana de tratamento antiviral (n=15) e de pacientes que não responderam a esta terapia (NR, n=10). Os níveis de IL-17F foram determinados nos sobrenadantes de culturas de CMSP não estimuladas e estimuladas com antígenos do core do VHC e proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5. As medianas dos níveis de IL-17F, aqui representadas por barras e intervalo interquartil, foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, usando a produção de IL-17F pelas células não estimuladas como controle de estimulação antigênica. ** p <0,01

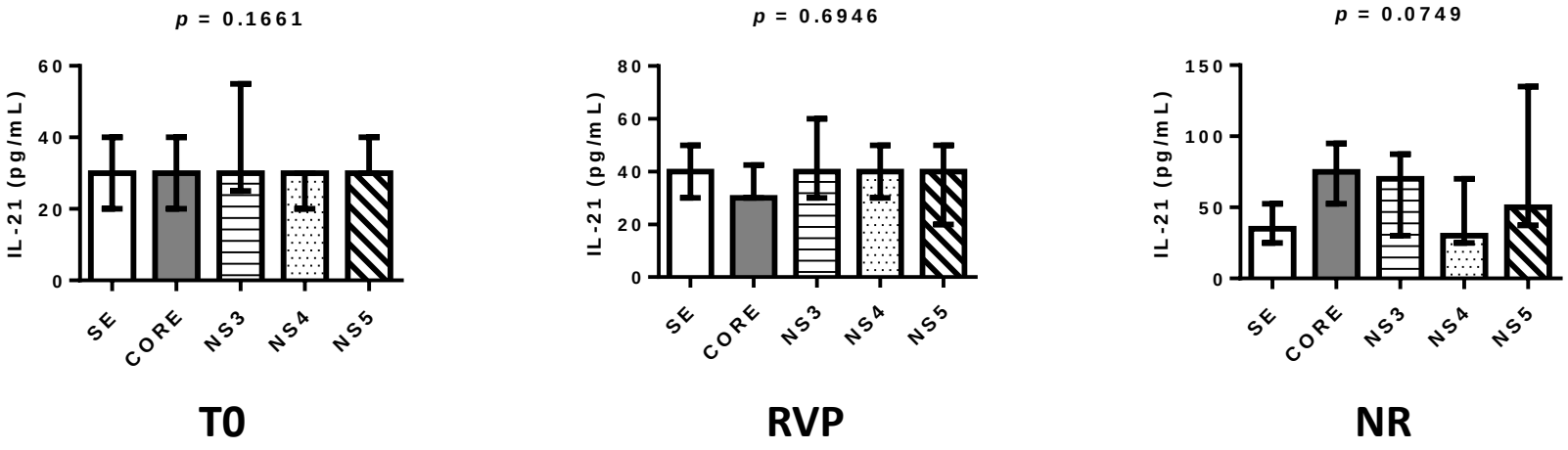

Figura 3. A produção de IL-21 em CMSP de pacientes com HCC não tratados (T0, n=18), indivíduos que apresentaram resposta virológica (RVP) na 12ª semana de tratamento antiviral (n=15) e de pacientes que não reagiram à esta terapia (NR, n=10). Os níveis de IL-21 foram determinados nos sobrenadantes das culturas de CMSP não estimuladas e estimuladas com antígenos do core do VHC e as proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 que são mostradas como medianas com intervalo interquartil. As medianas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando células não estimuladas como o controle da ausência de estimulação antigênica.

6 CONCLUSÃO GERAL

A conclusão obtida, diante dos nossos achados, evidencia que a infecção crônica pelo vírus da Hepatite C, causa uma desregulação das células imunes do hospedeiro, sejam em seu número, ou no papel que exercem no organismo do paciente infectado. Em relação à proporção de células Th17, no sangue periférico destes pacientes, mostra-se que existe uma redução destas células tanto em pacientes não-tratados contra o virus da Hepatite C, assim como naqueles que já foram experimentados com o tratamento antiviral, mas não apresentaram resposta virológica sustentada, quando comparados à população sadia.

Além disso, em relação à resposta mediada por citocinas associadas ao perfil Th17, por células mononucleares do sangue periférico, documentamos que essa resposta difere entre pacientes sem tratamento daqueles não-respondedores, no que se refere à produção de IL-17A e IL-17F; além de evidenciar o antígeno do core do VHC como o único capaz de suscitar tais respostas, quando se tratarem de pacientes que não respondem ao tratamento antiviral.

Por fim, todos esses achados referentes à diminuição das células Th17 do sangue periférico, e ao papel diferenciado das citocinas associadas a este perfil celular, não exibiram associação com viremia, autoimunidade ou lesão hepatica, no hospedeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHMAN, T. et al. Next-generation sequencing sheds light on the natural history of hepatitis C infection in patients who fail treatment. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, p. 1–10, 2015.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nature immunology**, v. 8, n. 6, p. 639–646, 2007.

ALESSANDRA, C. G.; RICCARDO, G.; PUOTI. Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV Infection. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 16, n. 1, p. 65–73, 2007.

ALLISON, R. D. et al. The American College of Preventive Medicine Position Statement on Hepatitis C Virus Infection. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 50, n. 3, p. 419–426, 2016.

ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 8, p. 1849–61, 2007.

ANNUNZIATO, F. et al. Defining the human T helper 17 cell phenotype. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 10, p. 505–512, 2012.

ANTONELLI, A. et al. Cytokines and HCV-related autoimmune disorders. **Immunologic Research**, v. 60, n. 2–3, p. 311–319, 2014.

ATTA, M L. B. SOUSA; MARGARIDA, P E.; LEITE, B C.; PEREIRA, C M.; PARANÁ, R; ATTA, A. M. Autoimmune Aspects of Hepatitis C in Bahia (Brazil). **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 12, n. 2, p. 1–17, 2006.

ATTA, M. et al. Inflammation biomarkers in chronic hepatitis C: Association with liver histopathology, HCV genotype and cryoglobulinemia. **Inflammation Research**, v. 61, n. 10, p. 1101–1106, 2012.

ATTAR, B. M. et al. Hepatitis C virus: A time for decisions. Who should be treated and when? **World J Gastrointest Pharmacol Ther February**, v. 6, n. 71, p. 33–40, 2016.

BARREIRO, P. et al. Rate and predictors of serum HCV-RNA >6 million IU/mL in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Clinical Virology**, v. 71, p. 63–66, 2015.

BARTH, H. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 725–737, 2015.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, p. 289–293, 1996.

BETTELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell

trilogy. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 652–657, 2007.

BOWEN, D. G. Finding a role for Th17 cells in hepatitis C pathogenesis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 27, p. 188–191, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Simeprevir , sofosbuvir e daclatasvir no tratamento da hepatite crônica tipo C e coinfecções**, 2015a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST AIDS E HEPATITES VIRAIS. **Bolletim Epidemiológico de Hepatites Virais**. 2015b.

BURRA, P. et al. HCV infection in haemodialysed patients: a role for serum IL-10 and TGF-beta1 in liver damage? **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 40, p. 827–33, 2008.

CABRAL, M. ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTIMÚSCULO LISO EM PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS C. **Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia**, p. 61, 2011.

CACHEM, F. C. O. F. The proportion of different IL-17-producing T cell subsets is associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Immunology**, v. 2, 2017.

CARMO, R. F.; CAVALCANTI, M. S. M.; MOURA, P. Role of Interleukin-22 in chronic liver injury. **Cytokine**, 2016.

CAULA, C. et al. Autoanticuerpos tisulares y factor reumatoideo en la infección crónica por virus de la hepatitis C * in the chronic hepatitis C virus infection R esumen. v. 1, n. 1, p. 11–16, 2008.

CHAIWONG, S.; SISTAYANARAIN, A. Characterization of Partial NS5B Region Among Hepatitis C Virus Genotype 6 Subtypes Isolated From Thai Blood Donors. **Journal of medical virology**, v. 88, n. 12, p. 1785–1790, 2016.

CHANG, Q. et al. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 27, p. 273–8, 2012.

CHANG, S. H.; DONG, C. IL-17F: Regulation, signaling and function in inflammation. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 7–11, 2009.

CHEN, K.; KOLLS, J. K. Interluekin-17A (IL17A). **Gene**, v. 614, p. 8–14, 2017.

CHEN, T.-Y. et al. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection. **Translational research : the journal of laboratory and clinical**

medicine, v. 150, p. 116–121, 2007.

CHOO, A. Q. et al. Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood- Borne Non-A , Non-B Viral Hepatitis Genome. v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.

CLAASSEN, M. A.; JANSSEN, H. LA; BOONSTRA, A. Role of T cell immunity in hepatitis C virus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 4, p. 461–467, 2013.

COBLEIGH, M. A.; ROBEK, M. D. Protective and pathological properties of IL-22 in liver disease: Implications for viral hepatitis. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 1, p. 21–28, 2013.

CUBERO, M. et al. Identification of host and viral factors involved in a dissimilar resolution of a hepatitis C virus infection. **Liver International**, v. 34, p. 896–906, 2014.

DAMBACHER, J. et al. The role of interleukin-22 in hepatitis C virus infection. **Cytokine**, v. 41, n. 3, p. 209–216, 2008.

DONG, C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. v. 226, n. 11, p. 80–86, 2008.

DUDDEMPUDI, A. T.; BERNSTEIN, D. E. Hepatitis B and C. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 30, p. 149–167, 2014.

DUSHEIKO, G. The impact of antiviral therapy for hepatitis C on the quality of life: a perspective. **Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver**, v. 37 Suppl 1, n. October 2016, p. 7–12, 2017.

ESCOBAR-GUTIERREZ, A. et al. Vertical transmission of hepatitis C virus: A tale of multiple outcomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 20, p. 465–470, 2013.

FALLAHI, P. et al. Cytokines and HCV-related disorders. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

FARIA, R. et al. Prevention of progression to cirrhosis in hepatitis C with fibrosis: effectiveness and cost effectiveness of sequential therapy with new direct-acting anti-virals. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 2016.

FATHY, A. et al. T Helper Type 1/T Helper Type 17-Related Cytokines in Chronic Hepatitis C Patients before and after Interferon and Ribavirin Therapy. **Medical Principles and Practice**, v. 20, p. 345–349, 2011.

FATKHULLINA, A. R.; PESHKOVA, I. O.; KOLTSOVA, E. K. The role of cytokines in the development of atherosclerosis. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 11, p. 1358–1370, 2016.

FERNÁNDEZ-PONCE, C. et al. Immune modulation by the hepatitis C virus core protein. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 1, n. December 2016, p. 350–356, 2017.

FERREIRA, A. R. et al. Hepatitis C virus NS3-4A inhibits the peroxisomal MAVS-dependent

antiviral signalling response. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 750–757, 2016.

FERREIRA, C. T. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da preven. **Rev Bras Epidemiol**, v. 7, p. 473–87, 2004.

FERRI, C. et al. Hepatitis C virus syndrome: A constellation of organ- and non-organ specific autoimmune disorders, B-cell non- Hodgkin's lymphoma, and cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 3, p. 327–343, 2015.

FOSTER, R. G. et al. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, p. 381–389, 2012.

GAFFEN, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. **Cytokine**, v. 43, p. 402–407, 2008.

GALE JR., M.; FOY, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 939–945, 2005.

GHANY, M. G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. **Hepatology**, v. 49, p. 1335–1374, 2009.

GREBELY, J.; DORE, G. What Is Killing People with Hepatitis C Virus Infection? **Seminars in Liver Disease**, v. 31, p. 331–339, 2011.

GUIDO, M.; MANGIA, A.; FAA, G. Chronic viral hepatitis: The histology report. **Digestive and Liver Diseases**, v. 43s, p. s331–s343, 2011.

GUTKOWSKI, K. et al. Clinical immunology Serum levels of interleukin 17 and its activators in chronic hepatitis C patients. **Central European Journal of Immunology**, v. 1, n. 1, p. 76–79, 2013.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 9, p. 553–62, 2013.

HAMMERICH, L.; HEYMANN, F.; TACKE, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, p. 345803, 2011.

HAN, Z. et al. Expression profile and kinetics of cytokines and chemokines in patients with chronic hepatitis C. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine,** v. 8, n. 10, p. 17995–18003, 2015.

HAO, C. et al. Imbalance of regulatory T cells and T helper type 17 cells in patients with chronic hepatitis C. **Immunology**, v. 143, p. 531–538, 2014.

HEDSKOG, C. et al. Characterization of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strains and associated virological response to sofosbuvir/ribavirin. **Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 471–

480, 2015.

HIROHATA, S.; SHIBUYA, H.; TEJIMA, S. Suppressive influences of IFN-γ on IL-17 expression in human CD4+ T cells. **Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 340–344, 2010.

HIROISHI, K.; ITO, T.; IMAWARI, M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 23, p. 1473–1482, 2008.

HIROTA, K.; MARTIN, B.; VELDHOEN, M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. **Seminars in Immunopathology**, v. 32, p. 3–16, 2010.

HORNER, S. M.; GALE, M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 879–88, 2013.

HOUGHTON, M. Discovery of the hepatitis C virus. **Liver International**, v. 29, n. 10, p. 82–88, 2009.

ILYAS, J. A.; VIERLING, J. M. An overview of emerging therapies for the treatment of chronic hepatitis C. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 1, p. 17–38, 2014.

ISAILOVIC, N. et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **Journal of Autoimmunity**, v. 60, p. 1–11, 2015.

ISHII, S.; KOZIEL, M. J. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. **Clinical Immunology**, v. 128, p. 133–147, 2008.

IWAKURA, Y. et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 57–79, 2008.

JAROSZEWICZ, J. et al. Current drugs in early development for treating hepatitis C virus-related hepatic fibrosis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 24, p. 1229–1239, 2015.

JO, Y. M. et al. Retreatment with peginterferon and ribavirin in chronic hepatitis C. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 6, p. 1994–1999, 2015.

JOHNSON, C. L.; OWEN, D. M.; GALE, M. Functional and therapeutic analysis of hepatitis C virus NS3??4A protease control of antiviral immune defense. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10792–10803, 2007.

KARED, H. et al. Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

KARLSSON, F.; HASSAN-ZAHRAEE, M. Quantification of Th1 and Th17 cells with intracellular staining following PMA/Ionomycin stimulation. In: **Current Protocols in Cytometry**. [s.l: s.n.]. v. 2015p. 6.35.1-6.35.7.

KONDO, Y. et al. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

KONYA, C. et al. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 1–9, 2015.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KOUTSOUDAKIS, G.; FORNS, X.; PÉREZ-DEL-PULGAR, S. Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 36, n. 4, p. 280–293, 2013.

LAFDIL, F. et al. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. **Cellular & molecular immunology**, v. 7, n. 4, p. 250–4, 2010.

LAMPE, E. et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. **Antiviral Therapy**, v. 18, p. 435–444, 2013.

LEE, Y. A; WALLACE, M. C.; FRIEDMAN, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. **Gut**, v. 64, p. 830–41, 2015.

LI, C. et al. IL-17 response mediates acute lung injury induced by the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. **Cell Research**, v. 22, n. 3, p. 528–538, 2012.

LIANG, T. J.; GHANY, M. G. Current and Future Therapies for Hepatitis C Virus Infection. **N Engl J Med**, p. 1907–1917, 2013.

LINGALA, S.; GHANY, M. G. Natural History of Hepatitis C. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 44, p. 717–734, 2015.

MANNS, M. P. et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17006, p. 1–19, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. p. 68 p, 2015.

MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 625–630, 2009.

MOSCHEN, A. R. et al. Interferon-alpha controls IL-17 expression in vitro and in vivo. **Immunobiology**, v. 213, n. 9–10, p. 779–787, 2008.

MUKHERJEE, R. et al. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, p. 519–538, 2014.

NEUMANN-HAEFELIN, C. et al. T cell response in hepatitis C virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 75–85, 2005.

NOUROZ, F. et al. An overview on hepatitis C virus genotypes and its control. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 16, n. 4, p. 291–298, 2015.

OLIVEIRA, I. S. et al. Peripheral lymphocyte subsets in chronic hepatitis C: Effects of 12

weeks of antiviral treatment with interferon-alpha plus ribavirin. **Microbial Pathogenesis**, v. 91, p. 155–160, 2016.

OO, Y. H. et al. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 1044–1051, 2012.

PAPPU, R. et al. The IL-17 family cytokines in immunity and disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 2, p. 185–195, 2010.

PETROVIC, D. et al. Hepatitis C virus - T-cell responses and viral escape mutations. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 1, p. 17–26, 2012.

PETTA, S. Hepatitis C virus and cardiovascular: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 8, p. 161–168, 2017.

PLAUZOLLES, A. et al. Hepatitis C Virus Adaptation to T-Cell Immune Pressure 1 . Hepatitis C : A Major Global Health Issue. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 7, 2013.

ROMAGNANI, S. et al. Properties and origin of human Th17 cells. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 3–7, 2009.

ROSEN, H. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 10, 2013.

ROWAN, A. G. et al. Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, p. 4485–4494, 2008.

RUTZ, S.; EIDENSCHENK, C.; OUYANG, W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. **Immunological Reviews**, v. 252, n. 1, p. 116–132, 2013.

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

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Human Th17 cells in infection and autoimmunity. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 620–624, 2009.

SECRETARIA DA SAÚDE. GOVERNO DA BAHIA (SESAB). **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE HEPATITES VIRAIS**. 2011.

SESMERO, E.; THORPE, I. Using the Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase as a Model to Understand Viral Polymerase Structure, Function and Dynamics. **Viruses**, v. 7, p. 3974–3994, 2015.

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

SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67

subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 59, p. 318–27, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. **Consenso sobre Hepatite C Crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia**, 2014.

SOUSA, G. M. et al. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. **Cytokine**, v. 60, p. 138–142, 2012.

SPAAN, M. et al. CD4+CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 2, p. 303–310, 2015.

SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. IL-21 is an immune activator that also mediates suppression via IL-10. **Crit Rev Immunol**, v. 30, n. 6, p. 559–570, 2010.

SUSSER, S. et al. Characterization of resistance to the protease inhibitor boceprevir in hepatitis C virus-infected patients. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1709–1718, 2009.

TABARKIEWICZ, J. et al. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, p. 435–449, 2015.

TANG, H.; GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 117, p. 49–65, 2009.

TANGYE, S. G. Advances in IL-21 biology-enhancing our understanding of human disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 34, p. 107–115, 2015.

THOMSON B. J., F. R. G. Hepatitis C virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 11, p. 86–94, 2005.

TU, Z. et al. HCV core and NS3 proteins manipulate human blood-derived dendritic cell development and promote T h 17 differentiation. **International Immunology**, v. 24, n. 2, p. 97–106, 2011.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Th17 responses and host defense against microorganisms: An overview. **BMB Reports**, v. 42, p. 776–787, 2009.

VERMEERSCH, P. et al. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 39–43, 2008.

VOULGARIS, T.; SEVASTIANOS, V. A. Atherosclerosis as Extrahepatic Manifestation of Chronic Infection with Hepatitis C Virus. **Hepatitis Research and Treatment**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

WANG, LAN S, D’SOUZA, LIONEL S, JACOBSON, I. M. Hepatitis C—A Clinical Review. **Journal of medical virology**, v. 88, n. 11, p. 1844–1855, 2016.

WANG, B. et al. IL-17A but not IL-22 suppresses the replication of hepatitis B virus

mediated by over-expression of MxA and OAS mRNA in the HepG2.2.15 cell line. **Antiviral Research**, v. 97, n. 3, p. 285–292, 2013.

WARD, J. W. Hepatitis C virus: the 25-year journey from discovery to cure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 60, p. 1479–1482, 2014a.

WEISER, B. M.; TELLINGHUISEN, T. L. Structural biology of the hepatitis C virus proteins. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 3, p. e195–e204, 2012.

WERNER, J. M. et al. Innate immune responses in hepatitis C virus-exposed healthcare workers who do not develop acute infection. **Hepatology**, v. 58, p. 1621–1631, 2013.

WILKE, C. M. et al. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 12, p. 603–611, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis c infection**. n. April, 2016.

XU, Y.; ZHONG, J. Innate immunity against hepatitis C virus. **Current Opinion in Immunology**, v. 42, p. 98–104, 2016.

ZIGNEGO, A. L.; GIANNINI, C.; GRAGNANI, L. HCV and lymphoproliferation. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

8 ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Federal da Bahia
Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
Conselho Nacional de Saúde- CNS
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HUPES)

UFBA UNIVERSIDADE NOVA

Complexo HUPES

PARECER ADENDO CEP/HUPES Nº 103/2010

A Pesquisadora Responsável, **Isabela Silva de Oliveira**, encaminhou ao Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo HUPES o adendo do projeto de pesquisa intitulado "**Células T regulatórias na hepatite viral C crônica**", que foi protocolado sob nº 103/2010, avaliado e aprovado em parecer datado de 26 de maio de 2011.

O referido adendo solicita a aprovação da:

- Inclusão pesquisadora acadêmica Milena Santana Cabral;
- Inserção do estudo: Célula Th17 na Hepatite C Crônica;
- Objetivo: Investigar a frequência e função da célula Th17 em portadores de hepatite C Crônica, antes e após tratamento antiviral.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d);

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata;

Comitê de Ética em Pesquisa- CEP/HUPES
Rua Augusto Viana, s/n - Canela – Salvador – Bahia CEP: 40.110-060
Tel.: (71) 3283-8043 FAX: (71) 3283-8141
E-mail: cep.hupes@gmail.com

UFBA
UNIVERSIDADE NOVA

Universidade Federal da Bahia
Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
Conselho Nacional de Saúde- CNS
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HUPES)

Complexo
HUPES

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

O CEP/HUPES Avaliou E Aprovou As Solicitações Do Adendo Em:
24 / 05 / 2013

Prof. Dr. Roberto Badaró, MD, PhD
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/HUPES

Comitê de Ética em Pesquisa- CEP/HUPES
Rua Augusto Viana, s/n - Canela – Salvador – Bahia CEP: 40.110-060
Tel.: (71) 3283-8043 FAX: (71) 3283-8141
E-mail: cep.hupes@gmail.com

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Células T regulatórias na hepatite viral C crônica
Investigador: Profa. Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta, Laboratório de Pesquisa em Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, telefone 71 3283-6972.

Objetivos e antecedentes: Trata-se de estudo que visa avaliar a expressão e frequência de células T regulatórias em sangue periférico de indivíduos portadores da hepatite viral C, como possível interferente da resposta imunológica ao vírus e à resposta ao tratamento, que será desenvolvido com indivíduos incluídos nos protocolos de tratamento no Ambulatório de Assistência Farmacêutica do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, da Universidade Federal da Bahia. Neste estudo também será utilizado um grupo controle, formado por indivíduos sadios. Estes últimos só participarão do procedimento 1, descrito abaixo.

Procedimentos: Se eu concordar em participar deste estudo, acontecerá o seguinte:
1. Retirada de uma pequena quantidade do meu sangue, cerca de 20 mililitros, através de coleta realizada em uma das veias do meu antebraço, para que sejam realizados exames laboratoriais de autoimunidade (reação imunológica produzida no meu organismo contra diversos componentes do meu próprio corpo), exames hematológicos (hemograma e determinação das subpopulações de linfócitos) e bioquímicos (enzimas hepáticas, creatinina).
2. Depois de iniciado o meu tratamento, recomendado pela equipe médica responsável pelo meu acompanhamento clínico, devo comparecer na 4ª e na 12ª semana (1 mês e 3 meses, respectivamente) no endereço da Rua Barão de Jeremoabo, s/n°, Faculdade de Farmácia, bairro de Ondina (tel.: 71 – 3283-6972), onde terei novamente meu sangue coletado, cerca de 15 mililitros, para que sejam repetidos os exames laboratoriais de autoimunidade, exames hematológicos (hemograma e determinação das subpopulações de linfócitos) e bioquímicos (enzimas hepáticas e creatinina), para avaliação da resposta que estou apresentando aos medicamentos que estou usando.

Benefícios: Posso não ter benefícios diretos da participação nesta pesquisa, como também não receberei nenhum auxílio financeiro por esta minha atitude de participar dela. O único benefício que terei será a avaliação laboratorial, sem nenhum custo, a qual poderá ou não causar novas condutas clínicas e/ou tratamentos pela equipe médica responsável que me acompanha.

Riscos: Nesta pesquisa não usarei nenhum outro medicamento ou produto. Sei, e também fui informado (a) que as coletas do meu sangue não oferecem nenhum risco para minha saúde, assim como não poderá causar nenhuma reação adversa futura ao meu organismo. Haverá apenas um desconforto causado pela agulha durante os procedimentos de coleta de sangue, que não dura mais que um minuto. Eventualmente podem ocorrer hematomas. Caso a formação do hematoma seja identificada durante a punção, deve-se retirar imediatamente o torniquete e a agulha. É necessária uma compressão local durante pelo menos dois minutos. O uso de compressas frias pode auxiliar na atenuação da dor local. O hematoma desaparece

naturalmente. O procedimento de dobrar o braço após a retirada da agulha e/ou carregar objetos relativamente pesados logo após a coleta contribui para a formação do hematoma mesmo após uma coleta de sangue bem-sucedida.

Confidencialidade: Os resultados dos exames de sangue realizados durante o estudo serão enviados à equipe médica que me acompanhará durante o meu tratamento, aos quais terei acesso se for minha vontade. Com exceção dessa liberação de resultados, todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas estritamente para fins de pesquisa, cujos resultados obtidos neste estudo (de todos os pacientes juntos, sem que nenhum seja identificado individualmente) serão publicados em congressos e revistas médicas, o que permitirá avanços no conhecimento da hepatite C crônica no Brasil, ajudando outros pacientes como eu. Minha identidade e privacidade serão mantidas em segredo de acordo com a lei de Pesquisa em Seres Humanos.

Questões: _____, colaborador da pesquisa, discutiu essas informações comigo, oferecendo-se para responder minhas dúvidas. Caso eu tenha perguntas adicionais, poderei ligar para o telefone _____, ou a Dra. Maria Luiza Atta, coordenadora do estudo, pelo telefone 3283-6972.

Direito de recusa ou desistência: Minha participação no estudo é totalmente voluntária, sendo eu livre para recusar a tomar parte ou abandonar a pesquisa a qualquer momento sem afetar ou pôr em risco meu futuro atendimento médico.

Consentimento: Concordo em participar deste estudo. Recebi uma cópia do presente termo de consentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer dúvidas.

Salvador, _____/_____/_____

Nome: _____ RG: _____

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do pesquisador:_____