



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

ANA MARIA ALMEIDA SOUZA

**AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES E SUA CORRELAÇÃO
COM O GENÓTIPO VIRAL EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE C (HCV)**

**Belém
2011**

ANA MARIA ALMEIDA SOUZA

**AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES E SUA CORRELAÇÃO
COM O GENÓTIPO VIRAL EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE C (HCV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antonio
Simões Quaresma

**Belém
2011**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Souza, Ana Maria Almeida

Autoanticorpos contra antígenos celulares e sua correlação com o Genótipo viral em pacientes com infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) / Ana Maria Almeida Souza; orientador, Juarez Antônio Simões Quaresma. – Belém, 2011.

72 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Belém, 2011.

1. Autoanticorpos 2. Hepatite C 3. Genótipo. Título

CDU: 616.36-002

ANA MARIA ALMEIDA SOUZA

**AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES E SUA CORRELAÇÃO
COM O GENÓTIPO VIRAL EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
HEPATITE C (HCV)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Doenças Tropicais. Área: Clínica das Doenças Tropicais.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

_____ - Orientador
Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma
Núcleo de Medicina Tropical – UFPA

_____ - Membro
Prof. Dra. Clea Nazaré Carneiro Bichara
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UEPA

_____ - Membro
Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior
Instituto Centro de Ciências Biológicas – UFPA

_____ - Membro
Prof. Dr. Ismaelino Mauro Nunes Magno
Centro Universitário do Pará - CESUPA

A DEUS QUE NA SUA SUPREMACIA E GRANDEZA
PERMITIU A MINHA EXISTÊNCIA.

A MEU PAI EMMANOEL (*IN MEMORIAM*) QUE DENTRO DE SUA HUMILDADE E
SIMPLICIDADE SEMPRE ME PROPORCIONOU ENSINAMENTOS DE VIDA E QUE
LEMBRO SEMPRE SUAS FRASES: “NUNCA DÊ SUA RAZÃO A NINGUÉM, PROCURE
SEMPRE FAZER AS COISAS CERTAS PARA QUE POSSAS ANDAR SEMPRE DE PEITO
ABERTO E CABEÇA ERGUIDA”.
“O ESTUDO É A ÚNICA HERANÇA QUE POSSO DEIXAR E QUE NINGUÉM VAI BRIGAR
CONTIGO POR CAUSA DELA”.

A MINHA MÃE SANCHÁ QUE SEMPRE FOI EXEMPLO DE BATALHA E VIGOR, COM DOM
DE SER MÃE, ESPOSA E PROFISSIONAL, SEM PERDER NUNCA SUA CALMA,
TRANQUILIDADE E BONDADE, PROCURANDO AJUDAR SEMPRE TODOS QUE A
RECORRIAM.

AO RIBAMAR, GRANDE AMOR DE MINHA VIDA, MEU COMPANHEIRO DE 32 ANOS, QUE
DO SEU JEITO SEMPRE ME APÓIA NA REALIZAÇÃO DOS MEUS SONHOS.

AOS MEUS AMADOS FILHOS RODRIGO, RAFAEL E ANA CAROLINA, QUE SEMPRE ME
MOTIVARAM A LUTAR PELOS MEUS OBJETIVOS, PARA ASSIM SERVIR DE INCENTIVO
E EXEMPLO PARA ELAS.

AS MINHAS SOGRAS LOURDES E RAIMUNDA, (*IN MEMORIAM*), QUE SEMPRE ESTIVERAM
AO MEU LADO, AJUDANDO NA CRIAÇÃO DOS MEUS FILHOS, PARA QUE EU PUDESSE
REALIZAR MINHAS TAREFAS E ALCANÇAR MEU CRESCIMENTO PROFISSIONAL.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma, meu orientador e incentivador, pelos ensinamentos e orientação para a conclusão desta árdua tarefa.

Ao meu cunhado Prof. Dr. Carlos Leônidas Silva Souza Sobrinho, que sempre me incentivou nessa caminhada.

Aos amigos, Dra. Isabella e Dr. Alberto Amaral que muito me ajudaram, me apoiaram, e permitiram minhas ausências no laboratório, para a conclusão desta jornada.

Ao colega MS / MD David Bichara, que disponibilizou seu tempo para a realização dos testes de FAN, de maior importância para a execução deste trabalho.

A colega Profa. Dra. Cléa Bichara que com seu apoio me deu animo para a execução deste trabalho.

A colega Maria do Socorro de Oliveira Cardoso, companheira de trabalho pelo incentivo e torcida para a concretização desta tarefa.

A todos os amigos do laboratório Amaral Costa pela incondicional torcida e apoio para que eu pudesse chegar ao final desta jornada.

A Profa. Dra. Luisa Caricio Martins pela sua ajuda incondicional na cedência dos dados dos pacientes e liberação das amostras do material biológica de sua soroteca, sem a qual esse trabalho seria impossível de se realizar.

Ao futuro colega de profissão doutorando Geraldo Duarte, pelas contribuições na conclusão estatística dos resultados encontrados.

Ao Prof. Dr. Ismaelino Mauro Nunes Magno, que tem se empenhado me incentivando na conclusão desta meta, meu anjo auxiliar.

A todos os componentes da banca examinadora pelo comprometimento e a forma muito simples que no momento da qualificação me fizeram vê e buscar as melhorias ao trabalho ora apresentado.

A Luciene Dias Cavalcante, bibliotecária do HOL pela ajuda imprescindível na elaboração desta dissertação.

A todos que, de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste sonho.

CONFIE...

**AS COISAS ACONTECEM NA HORA CERTA.
EXATAMENTE QUANDO DEVEM ACONTECER!**

MOMENTOS FELIZES, LOUVE A DEUS.

MOMENTOS DIFÍCEIS, BUSQUE A DEUS.

MOMENTOS SILENCIOSOS, ADORE A DEUS.

MOMENTOS DOLOROSOS, CONFIE EM DEUS.

CADA MOMENTO, AGRADEÇA A DEUS

**"ENTENDER A VONTADE DE DEUS NEM SEMPRE É
FÁCIL, MAS CRER QUE ELE ESTÁ NO COMANDO E TEM
UM PLANO PARA NOSSA VIDA FAZ A CAMINHADA VALER
À PENA"**

(DESCONHECIDO)

RESUMO

As inflamações do fígado provocadas pelos vírus hepatotrópicos atingem milhões de pessoas e representa significativo problema de saúde pública em todo o mundo. Existem interações entre viroses hepatotrópicas e o sistema imunológico do hospedeiro que podem influenciar na patogenicidade da agressão hepática. O objetivo deste trabalho foi investigar a frequência de auto-anticorpos em pacientes portadores do vírus da hepatite C, e sua correlação com os genótipos encontrados. Foram estudados 51 pacientes com diagnóstico confirmado pelo PCR de infecção pelo vírus da hepatite C e um grupo de 100 doadores de sangue com todos os exames sorológico para doenças infecto-contagiosas negativos. Os 51 pacientes portadores do vírus C apresentavam idade média de 43 anos, +/- 11,3, em fase pré-tratamento, 34 (66,7%) eram do gênero masculino e 17 (33,3%) do gênero feminino. Desses 13 (25,5%) apresentaram FAN positivo, 45 (88,2%) eram genótipo tipo 1 e 11,8% genótipo tipo 3. Os pacientes que se apresentaram com anticorpos detectáveis não apresentavam níveis de AST, ALT, AST/ALT, γ -GT e fosfatase alcalina significativamente diferente daqueles com auto-anticorpos negativos. Desta forma, conclui-se que os anticorpos presentes na amostra do estudo são independentes da evolução da doença e do prognóstico do paciente, entretanto parece estar ligada ao genótipo tipo 1.

Palavras-chave: Hepatite C, Auto-anticorpos, Genótipo.

ABSTRACT

Inflammation of the liver caused by hepatotropic viruses affect millions of people and represents a significant public health problem worldwide. There are interactions between hepatotropic viruses and the host immune system that can influence the pathogenesis of liver injury. The objective of this study was to investigate the frequency of autoantibodies in patients with hepatitis C virus, and its correlation with the genotypes found. We studied 51 patients diagnosed by PCR of infection with hepatitis C and a group of 100 blood donors with all serological tests for infectious diseases negative. The 51 patients with virus C had an average age of 43 years, + / - 11.3, in the pre-treatment, 34 (66.7%) were male and 17 (33.3%) were female. Of these 13 (25.5%) were ANA positive, 45 (88.2%) were with genotype 1 and 11.8% with genotype 3. Patients who presented with antibodies had no detectable levels of AST, ALT, AST / ALT, γ -GT and alkaline phosphatase significantly different from those with negative antibody titers. Thus, we conclude that the antibodies present in the study sample are independent of disease progression and patient prognosis, though seems to be linked with genotype 1.

Keywords: Hepatitis C, Auto-antibodies, genotype.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Padrões de fluorescência encontrados em maior freqüência e patologias relacionadas	34
Quadro 2 - Anti-ena - auto-anticorpos contra antígenos extraídos do núcleo e relevâncias clínicas mais freqüentes	34
Quadro 3 – Padrões de FAN nuclear e relevâncias clínicas mais freqüentes	35
Quadro 4 - Padrões de FAN citoplasmáticos e relevâncias clínicas mais freqüentes ..	36
Quadro 5 - Padrões de FAN mistos e relevâncias clínicas mais freqüentes	37
Quadro 6 - Padrões de FAN nucleolares e relevâncias clínicas mais freqüentes	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos pacientes segundo as características demográficas, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	48
Tabela 2 - Distribuição dos pacientes conforme os resultados laboratoriais de FAN citoplasmático e genotipagem, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	49
Tabela 3 – Distribuição do FAN citoplasmático de acordo com o gênero dos pacientes, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	49
Tabela 4 - Relação da genotipagem de acordo com o gênero dos pacientes, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	50
Tabela 5 - Distribuição dos pacientes de acordo com o genótipo viral e faixa etária - janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	50
Tabela 6 - Estudo descritivo da idade dos pacientes de acordo com o genótipo viral e presença do FAN citoplasmático, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	51
Tabela 7- Distribuição dos genótipos dos pacientes de acordo com os parâmetros bioquímicos, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	51
Tabela 8 - Distribuição do FAN citoplasmático dos pacientes de acordo com os parâmetros bioquímicos, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	52
Tabela 9 - Distribuição do FAN citoplasmático segundo a presença ou ausência de infecção por HCV, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	52
Tabela 10 - Distribuição do FAN de acordo com o genótipo viral, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAN	Anticorpos antinucleares
aCL	Anticorpos anticardiolipina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
ANCA	Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
Anti-CCP	Antipeptídeo citrulinado cíclico
Anti- β 2GPI	Anticorpos anti- β 2 glicoproteína I
Cdna	DNA complementar
CEP	Comitê em Ética e Pesquisa
CHC	Carcinoma hepatocelular
CIC	Complexos imunes circulantes
DDTC	Doenças difusas do tecido conjuntivo
DMTC	Doença mista do tecido conjuntivo
E1	Proteína do envoltório
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ESP	Esclerose sistêmica progressiva
FAN	Fator Anti-núcleo
FR	Fator reumatóide
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOPA	Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana ¹
IAH	Índice de atividade histológica
LE	Lupus Eritematoso
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MS	Ministério da Saúde
mtDNA	DNA mitocondrial
NANBH	Hepatite não-A não-B
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de polimerase em cadeia
Rh	Tipo sanguíneo
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação de polimerase em cadeia-em tempo real

SAF	Síndrome antifosfolípide
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SS	Síndrome de Sjögren
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	ultravioleta
VHA	Vírus da Hepatite A
VHC	Vírus da Hepatite C
VHC/HCV	Hepatite C
VV	Hanseníase generalizada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HEPATITE C (VHC/HCV)	15
1.1.1 Considerações Gerais	15
1.1.2 Agente Etiológico	16
1.1.3 Epidemiologia	17
1.1.4 Modo de Transmissão	18
1.1.5 Evolução Clínica	19
1.1.6 Diagnóstico	23
1.2 DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DO VHC	25
1.3 MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS DA INFECÇÃO PELO VHC	26
1.4 A ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS INFECCIOSAS E AUTOIMUNIDADE	27
1.5 FREQUÊNCIA E IMPLICAÇÕES DOS AUTO-ANTICORPOS EM HEPATITES AGUDAS VIRAIS	31
1.6 ANTICORPOS ANTINUCLEARES - FATOR ANTINUCLEAR – FAN	32
2 JUSTIFICATIVA	39
2.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 GRUPOS POPULACIONAIS ESTUDADOS (POPULAÇÃO DO ESTUDO)	41
4.1.1 Pacientes com diagnóstico laboratorial de Hepatite C	41
4.1.2 Grupo de não infectados	41
4.2 MÉTODO	42
4.2.1 Obtenção do material biológico	42
4.2.2 Diagnóstico sorológico da hepatite C	42
4.2.3 Detecção dos ácidos nucleicos do vírus da hepatite C por biologia molecular	43

4.2.4 Determinação do genótipo do vírus (genotipagem)	45
4.2.5 Técnica da pesquisa de auto-anticorpos antinucleares (FAN) em células HEp-2	46
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	67
ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEPATITE C (VHC/HCV)

1.1.1 Considerações Gerais

As hepatites virais são doenças causadas por diferentes agentes etiológicos, de distribuições universais, que têm em comum o hepatotropismo. Possuem semelhanças do ponto de vista clínico-laboratorial, mas apresentam importantes diferenças epidemiológicas quanto à sua evolução (FERREIRA; SILVEIRA, 2004). Desde a descrição e definição em 1989 (CHOO et al., 1989 apud RIBEIRO et al. 2007), tornou-se evidente sua associação com uma grande variedade de manifestações extra-hepáticas, desordens reumáticas e auto-imunes (ALMEIDA, 2010).

A infecção pelo VHC/HCV acarreta inflamação hepática e esteatose, podendo evoluir para fibrose hepática e cirrose em indivíduos cronicamente infectados, estes com grande risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (RIBEIRO et al. 2007). Essas complicações tardias ocorrem em um período, em geral, superior a 20 anos após o início da infecção. A avaliação filogenética das seqüências do VHC/HCV investigadas em várias regiões geográficas sugere que existam pelo menos seis genótipos principais, designados pelos números de 1 a 6, e pelo menos 30 subtipos, designados por letras minúsculas. Nos Estados Unidos, prevalecem os genótipos 1a (60%) e 1b (20%). Os tipos 5 e 6 são mais encontrados no sudeste e sul da África. O tipo 4 é predominante na África Central e no Oriente Médio. No Brasil, predominam os genótipos 1a e 1b (63%), e 3a (31,3%) (BASSIT et al., 1999 apud RIBEIRO et al. 2007). As informações sobre as causas que determinam o curso evolutivo da doença são pouco conhecidas, apesar dos progressos que há no campo do diagnóstico da infecção pelo VHC/HCV. Uma questão intrigante diz respeito à relação genótipo versus replicação viral e graus de lesão histológica. Assim, por exemplo, o genótipo 1 (1b) cursa com lesões histológicas mais graves.

As últimas décadas foram de notáveis conquistas no que se refere à prevenção e ao controle das hepatites virais. Entre as doenças endêmico-epidêmicas, que representam problemas importantes de saúde pública no Brasil,

salientam-se as Hepatites Virais, cujo comportamento epidemiológico, no nosso país e no mundo, tem sofrido grandes mudanças nos últimos anos.

Antes da seleção rigorosa dos doadores de sangue, em 1991, o VHC/HCV era a maior causa de hepatite pós-transfusional. Atualmente permanece como tal em casos esporádicos (CONTE, 2000). Os grupos considerados de risco são pessoas que receberam transfusão de sangue antes de 1992, usuários de drogas injetáveis, profissionais de saúde que lidam com sangue, pacientes de hemodiálise e, com menor risco, pessoas tatuadas ou com *piercings* (CLEMENTE; ONO-NITA, 2007).

A melhoria das condições de higiene e de saneamento das populações, a vacinação contra a Hepatite B (HBV) e as novas técnicas moleculares de diagnóstico do vírus da Hepatite estão entre esses avanços importantes (BRASIL, 2008).

1.1.2 Agente Etiológico

O VHC/HCV, um vírus ácido ribonucléico (RNA) da família Flaviviridae, representa a principal causa da previamente denominada hepatite não-A, não-B (SANTOS, 2009). Foi identificado e isolado a partir de um clone derivado de um genoma NANBH, semelhante aos togaviridae ou flaviviridae, (SAADE, 2008) e visualizado a imunoeletromicroscopia como partícula de 55 a 65 nm de diâmetro, com projeções espiculares e de morfologia muito semelhante aos flaviviridae. Além disso, estas partículas reagiram especificamente com anticorpos mono e policlonais do conteúdo protéico do envelope do VHC. (HIRANUMA et al., 1994 apud CONTE, 2000).

O agente etiológico do HCV não é uma partícula homogênea e apresenta uma taxa alta de mutação, levando-o a uma heterogeneidade genômica, cujo resultado é um grande número de genótipos (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5, 6) (AUGUSTO; LOBATO, 2003). Não há evidências de variantes não patogênicas. O genótipo 1b é o que apresenta maior virulência e pior resposta ao tratamento (LAUER; WALKER, 2001 apud SOUZA, 2007). No Brasil, dados obtidos a partir de casos isolados e estudos de pequenas amostragens indicam que o genótipo 1b ocorre em cerca de 30% a 40% dos casos; o 1a em cerca de 20%; 1a e 1b em 20%; o 3a em cerca de 28% (FOCACCIA, 2004).

1.1.3 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a HCV é uma questão de saúde pública e também a principal causa de transplante de fígado no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2005). É estimada uma prevalência em torno de 1,0% para a infecção pelo VHC na população mundial (KILLEMBERG, 2000). Nos Estados Unidos, cerca de 2,7 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus (BRASIL, 2006).

De acordo com Ferreira e Silveira (2004), no Brasil o número de pacientes infectados é incerto, relacionado geralmente a alguns estados e municípios, e o esclarecimento dos agentes causadores das hepatites, cuja identificação requer técnicas laboratoriais complexas de biologia molecular, é realizado de maneira insuficiente. Por outro lado, "a progressiva integração entre as instâncias gestoras dos programas de vigilância e controle das doenças com grupos de pesquisa e desses com os serviços" (FERREIRA; SILVEIRA, 2004, p. 473), e a disponibilidade dos bancos de dados nacionais mais confiáveis apontam para novos e melhores caminhos. (BRASIL, 2005b).

A OMS alerta que o País deve se preparar para uma "explosão" da epidemia a partir de 2011 (BRASIL, 2005b). Outra preocupação é que as pessoas que receberam sangue antes de 1992 têm mais chances de estarem infectadas; na época, o sangue destinado às transfusões não era analisado para detecção da HCV porque o vírus não era conhecido e não havia exames específicos (BRASIL, 2005b). A prevalência da infecção nos doadores de sangue sadios varia de 0,01%-0,02% no Reino Unido e no norte da Europa, 1%-1,5% no sul da Europa, 6,5% na África equatorial e de até 20% no Egito (CONTE, 2000).

De acordo com a OMS, a cada grupo de 50 pessoas no Brasil, uma tem hepatite e de dez portadores, apenas um sabe (STRAUSS, 2001). São dois milhões de infectados no País. Denominada epidemia silenciosa, calcula-se que 170 milhões de indivíduos no mundo estejam contaminados pelo vírus C, a forma mais grave da doença. Ainda de acordo com a OMS, o número de brasileiros vítimas da enfermidade é bem maior do que o estimado pelo Ministério da Saúde (TRINDADE, 2005).

Por ocasião da Conferência Internacional de Consenso sobre HCV, em Paris (L'EUROPEAN ASSOCIATION, 1999), concluiu-se que a hepatite crônica por vírus C é um problema grave de saúde pública, sendo sua prevalência mundial estimada em 3% (de 0,1% a 5%, segundo os vários países) por tanto, havendo no mundo todo, cerca de 150 milhões de portadores crônicos do VHC/HCV: 4 milhões nos EUA e 5 milhões na Europa Ocidental. Na Europa Oriental a prevalência é maior ainda.

1.1.4 Modo de Transmissão

A HCV é transmitida pelo sangue. Não há comprovação de contágio por meio de fluidos corporais como saliva, suor, lágrimas, sêmen ou leite materno. Também deixa de ocorrer por meio de abraços, beijos, uso dos mesmos copos ou roupas. Especialistas afirmam que a contaminação através de relações sexuais é possível, mas rara. Quando detectada de maneira precoce, a enfermidade tem tratamento, inclusive gratuito, além de cura (BRASIL, 2006).

Dentre os fatores de risco para transmissão outros além da transfusão de sangue, o uso de drogas ilícitas, o comportamento sexual de alto risco e variáveis socioeconômicas representadas pelo grau de escolaridade e renda familiar. Não foi observada associação entre o risco de infecção e as variáveis demográficas designadas por gênero, idade e raça (ALTER, 2007). O risco de transmissão sexual do VHC/HCV é mínimo, A contaminação intrafamiliar não-sexual é considerável, particularmente quando um dos enfermos tem hepatopatia grave e ou carga viral elevada (risco 1:10). (CONTE, 2000)

A prática de tatuagem fornece dados conflitantes, sabendo-se que os "líquidos" usados para "esterilizar" os instrumentos usados são ineficazes.

Karmochkine et al. (1998 apud CONTE, 2000) observaram que aproximadamente 80% dos pacientes contraem o vírus através da toxicomania intravenosa ou transfusões de sangue ou de derivados. Os restantes meios de transmissão e de contágio são a hemodiálise, os transplantes de órgãos, picadas acidentais profissionais e transmissão vertical mãe-criança. Em 20% a 40% dos casos não se consegue determinar o modo de contaminação, A transmissão da hepatite crônica por vírus C pode ser prevenida (KARMOCHKINE et al., 1998 apud CONTE, 2000).

As duas fontes de contaminação são a toxicomania endovenosa e a administração de produtos de origem sangüínea. Esta última praticamente eliminada, desde 1991, com a introdução dos testes ELISA 2, na seleção aprimorada de doadores de sangue. (BRASIL, 2005a; KARMOCHKINE et al., 1998 apud CONTE, 2000).

A transmissão sexual é rara, com menos de 3% em parceiros estáveis e, ocorre principalmente em pessoas com múltiplos parceiros e com prática sexual de risco (sem uso de preservativo) – para os indivíduos com parceiros múltiplos, o uso de preservativos é indicado (BRASIL, 2005a; KARMOCHKINE et al., 1998 apud CONTE, 2000).

A gravidez não está contra-indicada nas mulheres infectadas pelo VHC/HCV. A transmissão vertical mãe-criança é rara (menor de 6%). O tipo de parto (natural ou cesárea) não tem influência. O aleitamento é permitido. A transmissão nosocomial é prevenida eficazmente, de modo convencional. (KARMOCHKINE et al., 1998 apud CONTE, 2000).

1.1.5 Evolução Clínica

A infecção aguda pode passar clinicamente despercebida ou evoluir para hepatite fulminante. Aproximadamente 85,0 % das pessoas infectadas agudamente vão desenvolver uma viremia persistente, tornando-se, dessa forma, indivíduos infectados crônicos. Depressão, irritabilidade, dores no corpo, mal-estar, febre, náuseas, e falta de apetite são alguns dos sintomas mais freqüentes, embora a maioria dos casos não apresente nenhum sintoma (ALTER, 2007).

A cirrose é pouco observada em pessoas que apresentam níveis persistentemente baixos das transaminases, mas a elevação destas não é representativa do grau de fibrose hepática. Dessa forma, a biópsia hepática representa o melhor indicador do estágio de evolução da doença, uma vez que gradua os componentes inflamatórios e o estágio de fibrose (AGMON-LEVIN et al., 2009; BLOCK; SCHIANO, 1999).

Alter et al. (1992) dizem que em 82% de 130 pacientes seguidos durante muitos anos, após surto agudo de hepatite não-A não-B, apresentam anti-VHC/HCV ou VHC/HCV RNA, sendo que 62% deles desenvolveram hepatite crônica e concluem que os pacientes que adquiriram HCV tiveram alto grau de hepatite

crônica, sendo que o VHC/HCV pode ser a maior causa de doença crônica de fígado nos EUA e que na maioria dos pacientes a infecção pelo VHC/HCV parece persistir por muitos anos, mesmo na ausência de doença hepática ativa.

Almeida et al. (1999) determinaram a prevalência da infecção em doadores de sangue, assim como avaliaram o grau de comprometimento hepático numa população, de 37.335 doadores, durante o biênio 93-94, em Porto Alegre - RS, utilizando o teste anti-VHC ELISA 2. Selecionaram 60 deles para a biopsia hepática, com agulha de Menghini, encontrando prevalência de 1,74% com comprometimento hepático e 39 deles apresentavam cirrose hepática. Sendo a hepatopatia crônica de graus variáveis observadas em 80% deles, na sua grande maioria com lesões leves e mínimas. Foi observada forte associação entre elevação de alanina aminotransferase (ALT) e a presença de hepatopatia crônica, embora a intensidade desta elevação não se correlacione com a gravidade da lesão histológica.

Já na experiência de Mutimer et al. (1995) cerca de 80% dos doadores soro-positivos, analisados exaustivamente, inclusive com biopsia de fígado, mostraram evidências de alterações histológicas e ou virológicas de infecção persistente sem, no entanto, atingir graus mais avançados de hepatopatia crônica, quase todos permanecendo na categoria moderada.

Nos países industrializados, a HCV é responsável por 20% dos casos de hepatite aguda, 70% dos casos de hepatite crônica, 40% dos casos de cirrose descompensada, 60% dos carcinomas hepatocelulares e 30% dos transplantes hepáticos (L'EUROPEAN ASSOCIATION, 1999).

Cerca de 40% do total de pacientes curam-se ou têm doença crônica de natureza benigna. Os restantes 60% cursam com atividade aumentada de aminotransferase, denotando evolução crônica da doença. Dentre estes, a maioria tem lesões necro inflamatórias discretas e fibrose mínima ou ausente. O prognóstico em longo prazo é mal conhecido, no entanto, provavelmente a maioria deles não virá a falecer da doença hepática em curso. Cerca de 20% deles, depois de 10-20 anos de evolução, desenvolverão cirrose hepática, passível de transplante. Assim, a hepatite crônica por vírus C é doença que ocasiona a morte de um pequeno número de pacientes sem, no entanto, afetar a duração da vida média da maioria deles. (CONTE, 2000; FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

Após infecção aguda, somente 10% dos pacientes desenvolve doença clínica com icterícia. A infecção sub-clínica é a regra e, assim, passa despercebida.

Cerca de 25% deles têm infecção crônica sintomática, com aminotransferases normais e lesões inflamatórias histológicas mínimas. (RESENDE et al., 2010).

A remissão espontânea acontece em cerca de 15% dos casos. Na grande minoria dos casos, a progressão da doença aguda pode levar à insuficiência hepática aguda.

Observações feitas pelo irlandês Kenny-Walsh (1999), comprovam a natureza e a evolução clínica da afecção em causa. O autor acompanhou durante 17 anos, 376 mulheres que receberam injeções de imunoglobulinas anti-D, contaminadas com VHC, provenientes de doador único num programa de isoimunização Rh. Destas, 81% apresentaram sintomatologia, mais frequentemente fadiga (66%), ALT ligeiramente elevada (de 40 a 99 U/L) em 47% e igual ou maior de 100 U/L em 8%. A biopsia hepática mostrou inflamação em 98% delas, na maioria das vezes, leves (41%) e moderadas (52%); fibrose presente em 51%, no entanto, somente em sete pacientes (2%) houve sinais de cirrose provável ou definitiva. Em uma delas havia acentuado alcoolismo.

A hepatite crônica por vírus C é doença de evolução variável. De maneira geral, sua evolução é lenta, insidiosa e progressiva.

Os pacientes que não apresentam evidências bioquímicas de lesão hepática podem constituir em subgrupo de casos "mais benignos", no curso natural da doença. Muitos co-fatores têm papel importante no desenvolvimento da cirrose nesses pacientes, como por exemplo, a idade no momento da infecção (os contaminados de idade mais avançada têm evolução mais rápida da doença, enquanto que os mais jovens a têm mais lenta); o alcoolismo (é de consenso geral que o abuso de álcool favorece o aparecimento da cirrose) e a co-infecção com o Vírus da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e da HVB.

A incidência anual de carcinoma hepatocelular (CHC) é de 1% a 4% nos pacientes cirróticos, o que justifica plenamente o controle ecográfico do fígado e a dosagem sérica de alfa-fetoproteína nesses pacientes, a cada 1-2 anos. Por outro lado, nos pacientes com hepatite crônica por vírus C sem cirrose, o CHC é muito raro (LOPES, 2010).

Nos casos de cura, a atividade das transaminases cessa e os vírus não são detectados (VHC RNA) no soro. Nos casos de cronificação, acontece o contrário, ou seja, as alterações bioquímicas existem, com flutuações, e os vírus são detectáveis, na grande maioria dos casos. Fazem exceção àqueles pacientes com

viremia baixa que, por isso mesmo, fogem aos limites dos métodos de detecção viral ou devido às flutuações próprias desses níveis virêmicos (HAYDON et al., 1998).

Nos pacientes anti-VHC positivos, com enzimas circulantes normais, a falta de VHC RNA no soro tem sido interpretada como sinal de cura completa. No entanto, Haydon et al. (1998) alteraram essa interpretação. Estes autores demonstraram a presença de VHC RNA no fígado desses pacientes que eram negativos no soro, independente das alterações bioquímicas positivas ou negativas do soro, ou seja, mesmo naqueles casos anteriormente considerados como curados. Assim, os níveis de vírus intra-hepáticos não são determinados pelos fatores hospedeiro (idade, modo e duração da infecção) ou virais (VHC genótipos), pois, mesmo as repetidamente Reação de polimerase em cadeia-em tempo real (RT-PCR) negativos para VHC RNA no soro podem ter vírus da HCV albergados no fígado. Entretanto, existem limitações metodológicas que devem ser consideradas nessa interpretação, como por exemplo, as limitações do RIBA 3 e do RT-PCR.

Mais importante é o seguimento dos pacientes ao longo do tempo. Assim, Seef et al. (1992), em 568 pacientes de hepatite pós-transfusional e dois grupos controles pareados que receberam transfusões sem desenvolver hepatite, após 18 anos de seguimento, encontraram 3,3% de mortalidade no grupo 1 e 1,5% no grupo controle, sendo que a maioria das mortes ocorreu nos pacientes com alcoolismo associado. Evidenciando que a maioria dos que desenvolve doença crônica o faz muito lentamente.

Existem ainda, no curso natural da doença, flutuações intensas e muito freqüentes que dependem dos vírus e dos hospedeiros, a saber: níveis da viremia, genótipos 1b, graus de diversidade genética dos vírus, vias de transmissão (os inoculados via transfusão apresentam lesões hepatocelulares mais ativas) (GORDON et al., 1993; GORDON; BAYATI; SILVERMAN, 1998), deficiências imunes, alcoolismo e co-infecção com HBV e delta ou o Vírus da imunodeficiência humana (HIV). (LOPES, 2010). Nestes últimos casos, a co-infecção com múltiplos vírus das hepatites está associada com mais graves lesões histológicas do fígado do que nos casos de VHC isoladas.

Importa saber se os resultados obtidos com os controles feitos se mantêm por longos períodos. Ou seja, como exemplos, a atividade da ALT persistentemente normal, a variabilidade do RT-PCR, a detecção de VHC RNA pela técnica Reação de polimerase em cadeia (PCR) que pode ser negativa, devido à inadequada

armazenagem das amostras, à contaminação do soro com substâncias que interferem na leitura, entre outras causas de erro.

As informações sobre as causas que determinam o curso evolutivo da doença são pouco conhecidas, apesar dos progressos havidos no campo do diagnóstico da infecção pelo VHC. Uma questão intrigante diz respeito à relação genotipo versus replicação viral e graus de lesão histológica. Assim, por exemplo, o genotipo 1 (1b) cursa com lesões histológicas mais graves, independentemente da carga viral. Ainda mais, os VHC RNA negativos no soro, mesmo após anos de "cura", podem recair, pois neles persistem os vírus no fígado, em regime de replicação muito baixa, indetectável pelos métodos atuais. Ao contrário, os negativos no soro e no fígado, têm demonstrado respostas boas e sustentadas, inclusive no sentido de se fazer prognóstico de cura real e verdadeira, infelizmente na grande minoria dos casos.

1.1.6 Diagnóstico

Quanto mais cedo o diagnóstico, maiores as chances de detectar a doença. Por isso é importante que as pessoas façam o exame específico porque só esse exame é que detecta a HCV. E as mulheres têm que ter uma atenção em especial. Tempos atrás o Correio Braziliense (2003) publicou uma grande matéria sobre a quantidade de mulheres que vêm sendo infectadas com a HCV. Cujas causas estavam na esterelização mal feita dos equipamentos das manicures. Uma solução prática é as mulheres terem seu próprio material pra fazer as unhas e não deixar mais ninguém utilizar (nem mãe, nem irmã, etc). Bem, e quem tiver passado por transfusão, dentistas, manicures, operações, etc deve fazer o exame (KARMOCHKINE et al., 1998 apud CONTE, 2000; KEER et al., 1997).

A HCV não é como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), que possui drogas com grande tecnologia e o doente pode viver por muitos e muitos anos. Com a HCV, o paciente só tem chance de ficar bem se a doença for diagnosticada e tratada antes dela se manifestar. Atualmente, o tratamento usa uma associação de duas drogas – o Interferon e a Ribavirina. “As chances de cura, em média, são de 50%”.

Barbaro et al. (1999) verificaram que os pacientes VHC genótipos 1b, freqüentemente apresentavam alterações ultraestruturais das mitocôndrias com

depleção do mtDNA, podendo comprometer o processo de fosforilação oxidativa. Sendo assim, a produção aumentada de radicais livres nos pacientes VHC genótipos 1b, poderia atuar de modo negativo na evolução da doença hepática, aumentando o efeito citopáticos do VHC. Nesses pacientes, haveria, portanto, aumento de hiperoxidação, com conseqüente resistência à ação dos interferons e pior evolução da doença hepática. A ser confirmado este fato, novas estratégias terapêuticas poderão vir a ser desenvolvidas no combate a essa doença.

Agnello et al. (1998) acreditam que a infecção persistente nessa doença poderia ser devida à baixa percentagem de replicação viral nos hepatócitos. Esses autores usaram nova técnica de hibridização in situ para detectar VHC RNA, seis vezes mais específica do que a do RT-PCR. Concluem que a extensão da infecção hepatocítica varia inversamente ao índice de atividade histológica (IAH), ou seja, quando esta for mínima, aquela será máxima. No entanto, nesses casos, a concentração de VHC nos hepatócitos será muito baixa. Esses achados levam à hipótese de que a infecção persistente no fígado pode ser causada, ao menos em parte, por essa mesma baixa replicação viral (AGMON-LEVIN et al., 2009.).

Dos fatos acima expostos, decorrem implicações, tais como as respostas CD8-CTL aos antígenos VHC, restritas aos complexos de histocompatibilidade principais (MHC I), com inibição ou mesmo insuficiente produção de complexo peptídeo VHC-MHC, inibição direta das células CTLK e a falta de resposta as citocininas, entre outras, dos vários mecanismos de escape existentes. Dentro desse contexto, o nível de morte celular não seria alcançado e a lesão hepatocelular conseqüente seria, portanto, mínima.

Outra implicação resultante consiste na indução de resposta imune celular, T Helper mediadas, a partir de peptide vacinas contra o VHC. Estas novas vacinas têm a capacidade de gerar linfócitos T citotóxico os CTLs contra o VHC, em camundongo imunizados com peptídeos CTL e células HT epítomes do core VHC. Esses estudos recente, em animais de laboratório, vêm progredindo rapidamente, esperando-se em breve, novos recursos no tratamento dessa doença (AGNELLO et al., 1998).

1.2 DETERMINAÇÃO DO GENÓTIPO DO VHC

O VHC constitui-se em uma família heterogênea de vírus, com no mínimo seis genótipos e inúmeros subtipos (BARBOSA; SILVA; MARTINS, 2005; BASSIT; SANTOS; SILVA, 1999). Embora o método de maior acurácia para a determinação do genótipo do VHC seja a identificação completa da seqüência dos 9.500 nucleotídeos e a construção de uma árvore filogenética, esse método só pode ser utilizado em laboratórios de pesquisa (BARBOSA; SILVA; MARTINS, 2005), e não em laboratórios clínicos. Assim, foram desenvolvidos métodos para genotipagem utilizando apenas as regiões mais conservadas do genoma, como a proteína do envoltório (E1), a proteína core e a proteína não estrutural NS5B. A seqüência dos nucleotídeos dentro dessas regiões relativamente conservadas é genótipo-específico, e os isolados podem ser genotipados, independentemente da região que for utilizada para análise (BARBOSA; SILVA; MARTINS, 2005; BASSIT; SANTOS; SILVA, 1999). Para uso em laboratórios clínicos foram desenvolvidas basicamente duas metodologias que se valem de técnicas de biologia molecular (genotipagem) ou citológicas (serotipagem).

Os métodos que adotam técnica de biologia molecular para genotipagem, utilizando porções do genoma, incluem a PCR aninhada (nested PCR) (BASSIT; SANTOS; SILVA, 1999), a técnica de restriction fragment length polymorphism (RFLP) (BARBOSA; SILVA; MARTINS, 2005; BASSIT; SANTOS; SILVA, 1999), a hibridização reversa (BASSIT; SANTOS; SILVA, 1999), (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica; Gen. Eti DEIA HCV, Sorin Biomedica, Itália) e o seqüenciamento direto da região não-codificante 5' (TruGene, Visible Genetics, Canadá). Suas principais vantagens são a informação direta sobre seqüência dos nucleotídeos do genoma viral, a alta sensibilidade, por se basearem na PCR, e a possibilidade de identificar o subtipo viral (BARBOSA; SILVA; MARTINS, 2005).

Os métodos para determinação do genótipo que utilizam serotipagem baseiam-se na detecção de anticorpos genótipos-específicos contra epítomos do VHC (por exemplo, proteínas da região do core) (BLOCK; SCHIANO, 1999). Os testes comercializados utilizam diferentes técnicas, ELISA competitivos ou immunoblot (Murex-HC1-6, Murex Diagnostics Ltd, Reino Unido; RIBA HCV Serotyping Assay, Chiron Diagnostics, Estados Unidos). As principais vantagens da técnica de serotipagem são o baixo custo e maior facilidade de realização, em

comparação com os testes de biologia molecular (BLOCK; SCHIANO, 1999; De LARANAGA et al., 2000).

A determinação do genótipo, anteriormente utilizada em pesquisas, mas sem maior utilidade na prática médica, atualmente é recomendada para uso clínico. Como já mencionado, os pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC devem ser tratados por 12 meses enquanto os demais, por 6 meses (BASSIT; SANTOS; SILVA, 1999).

A determinação do genótipo do VHC pode ser feita por PCR ou serotipagem. A primeira técnica é mais sensível e possibilita a identificação de subtipos do VHC. Contudo, a segunda é de mais fácil realização e mais barata, razão pela que é importante que a técnica seja aprimorada.

Oliveira et al. (1999) investigaram os padrões de distribuição dos genótipos do VHC, estudando 250 pacientes anti-VHC positivos, através da detecção VHC RNA pelo RT-PCR e encontraram prevalência de 72% para o VHC 1, 25,3% para o tipo 3, 2% para o 2 e 0,7% para o 4, semelhantes aos das várias regiões mundiais.

1.3 MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS DA INFECÇÃO PELO VHC

As manifestações extra-hepáticas da infecção pelo VHC são as mais variadas possíveis. A diversidade de resposta do hospedeiro ao agente infeccioso, variando desde quadros assintomáticos até aqueles com evolução grave, fatal ou incapacitante, tem estimulado a busca por justificativas de tais discrepâncias clínicas, sobretudo na imunomodulação. Dentre as infecções mais bem estudadas destacam-se aquelas pelos Vírus da hepatite C, Vírus da imunodeficiência humana¹ (HIV-1), pelo Herpes vírus humano 4 (vírus do Epstein Baar) e pelo *Mycobacterium leprae* (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A agressão hepática por auto-imunidade é um fenômeno reconhecido em várias doenças do fígado, inclusive nas de etiologia viral. Além do agente agressor e de sua interação com o sistema imunológico do hospedeiro, fatores ambientais ou hormonais estão aparentemente envolvidos no surgimento de auto-imunidade hepática, como se supõe acontecer na hepatite auto-imune em indivíduos geneticamente suscetíveis. (CODES et al., 2002).

A lesão hepatocelular relacionada à infecção pelos vírus hepatotrópicos e pelos herpes vírus (citomegalovírus e Epstein-Barr) é secundária a uma resposta auto-imune do hospedeiro. Estes vírus não parecem ser diretamente citopáticos, mas desencadeiam lesão hepática através da resposta imune do hospedeiro contra células hepáticas infectadas (MALOY; POWRIE, 2001).

Existem estudos que focalizam alterações imunológicas em hepatites virais, entretanto a maioria deles mostra resultados pontuais, sem seguimento na fase aguda da doença (BLOCK; SCHIANO, 1999; McFARLONE et al. 1990). Além disso, ainda não se estabeleceu uma associação entre as reações auto-imunes transitórias induzidas por viroses hepatotrópicas e agravamento do dano tecidual na hepatite viral.

A infecção crônica está fortemente associada à crioglobulinemia mista essencial, glomerulonefrite membrano-proliferativa e porfiria cutânea tardia. De forma menos impressionante, encontra-se também associada à úlcera corneana de Mooren, líquen plano e fibrose pulmonar (KILLENBERG, 2000; WENER et al., 1996). A ocorrência de anticorpos antitireoidianos e hipotireoidismo tem sido relatada em associação com a infecção crônica pelo VHC em mulheres (KILLENBERG, 2000; CACOUB et al., 1999).

A associação entre a infecção crônica pelo VHC, a presença do fator reumatóide e do anticorpo antinuclear (FAN), o fenômeno de Raynaud e doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC), como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren e vasculites sistêmicas, é relatada em alguns trabalhos (CACOUB et al., 1999; LOVY; STARKEBAUM; UBEROI, 1996; STAUB, 1998; WENER et al., 1996).

1.4 A ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS INFECCIOSAS E AUTOIMUNIDADE

A associação entre doenças infecciosas e autoimunidade, apresentando-se com manifestações clínicas ou detectadas apenas pelo desenvolvimento de auto-anticorpos, tem sido amplamente documentado. Infecções virais, bacterianas e parasitárias podem estar envolvidas no desenvolvimento, recidivas e até mesmo na prevenção de doenças auto-imunes (KIVITY et al., 2009; PORDEUS et al., 2008).

Ribeiro e Proietti (2004) avaliaram a frequência de FR, anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP), AAN, anticorpos anti-citoplasma de

neutrófilos (ANCA), anticorpos anticardiolipina (aCL) e anticorpos anti- β 2 glicoproteína I (anti- β 2GPI) em pacientes com hanseníase. Existe estudo demonstrando pacientes que apresentavam manifestações articulares, comparados aos que não apresentavam envolvimento articular e um grupo controle de indivíduos saudáveis com idade e gênero semelhantes aos dos pacientes estudados e que residiam na mesma área geográfica. A maioria dos pacientes nos dois grupos (com e sem envolvimento articular) apresentava hanseníase generalizada. Entretanto observaram uma baixa frequência, que não foi significativamente diferente, de FR, anti-CCP, AAN e ANCA em pacientes com hanseníase (nos dois grupos) e normal dos controles. Mas a prevalência de anticorpos aCL e anti- β 2GPI estava significativamente elevada nos pacientes com hanseníase quando comparados com o grupo controle, apesar de não haver associação significativa com o envolvimento articular. O isótopo predominante dos dois autoanticorpos foi a IgM, (48.7%) dos pacientes com hanseníase apresentava pelo menos um anticorpo antifosfolípide. Além disso, os autores observaram uma associação entre a positividade para aCL e as manifestações clínicas, já que os pacientes com anticorpos aCL apresentavam doença Hanseníase generalizada (VV) com mais frequência ($p= 0.002$). Não houve associação entre a presença de anticorpos aCL ou anti- β 2GPI e episódios reacionais; porém, entre os pacientes com esses episódios, aqueles com anticorpos aCL apresentavam eritema nodoso hansênico (ENH) em 100% dos casos, enquanto entre os pacientes negativos para aCL, 57% apresentavam ENH. Apesar de uma alta taxa de concordância para a presença de anticorpos aCL e anti- β 2GPI ter sido observada, manifestações tromboembólicas não foram observadas (RIBEIRO; PROIETTI, 2004, 2005).

Horimoto e Costa (2009) avaliaram pacientes com *Leishmania* (leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea) para a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, assim como FR, AAN, anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La, aCL e complemento (C3 e C4). Como esperado, os pacientes com leishmaniose visceral apresentava anticorpos anti-*Leishmania*. Títulos significativamente elevados de AANs, na maioria dos pacientes, o anti-DNA, foi detectado em poucos pacientes com doença visceral, assim como títulos elevados de anticorpos aCL (isotipo IgG), quando comparados com os pacientes com leishmaniose cutânea. Níveis reduzidos de complemento também são evidentes na doença visceral assim como níveis significativamente reduzidos de C3. Outros estudos comparam e discutem os

resultados em relação à crescente evidência na literatura da presença de autoanticorpos em ambas as doenças. Em geral, a prevalência variável de autoanticorpos relatada, assim como relatos prévios na literatura, podem estar relacionados a diferenças metodológicas, como o tipo de ensaio utilizado, a definição dos pontos de corte, inativação dos soros pelo calor, seleção de pacientes e variações étnicas e geográficas nos grupos de pacientes. Mas um dos resultados consistentes foi a frequência significativamente mais elevada de anticorpos antifosfolípide, aCL e anti- β 2/GPI, em pacientes com hanseníase enquanto anticorpos AAN e aCL foram detectados com mais frequência nos pacientes com leishmaniose visceral. A incidência aumentada de anticorpos AAN e aCL nos pacientes com leishmaniose visceral é compatível com outros estudos (OSSADRON et al., 2006; SAKKAS et al., 2008; VOULGARI et al., 2004) e demonstra semelhanças das manifestações clínicas e laboratoriais entre a leishmaniose visceral e o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Além disso, a reatividade cruzada entre AAN e anticorpos anti-*Leishmania* já foi também relatada (GRANEL et al., 2000).

Diversos grupos documentaram níveis elevados de anticorpos antifosfolípide (aCL, anti- β 2GPI e anti-protrombina) em diversas doenças infecciosas, como a sífilis, doenças virais (incluindo a hepatite C, Parvovírus B19 e HIV), malária e hanseníase, sem as manifestações clínicas da síndrome antifosfolípide (SAF) (ZANDMAN-GODDARD; BLANK; SHOENFELD, 2002). Os títulos elevados geralmente são transitórios, diminuindo e desaparecendo após a resolução da infecção (LOIZOU et al., 2003; ZANDMAN-GODDARD; BLANK; SHOENFELD, 2002). Mas, em uma minoria dos pacientes, a associação entre doenças infecciosas e anticorpos antifosfolípide pode levar a complicações severas, freqüentemente fatais, ou seja, "SAF catastrófica" (ZANDMAN-GODDARD; BLANK; SHOENFELD, 2002).

Os resultados de Ribeiro e Proietti (2005) mostrando um aumento da incidência de anticorpos anti- β 2-GPI em pacientes com hanseníase, associados aos dados de outros grupos (De LARANAGA et al., 2000; FIALLO et al., 1998; HOJNIK et al., 1994; LOIZOU et al., 2003), que também documentaram níveis elevados de anticorpos anti- β 2GPI, lançam dúvidas sobre a noção de que os anticorpos aCL associados a infecções são independentes dos anticorpos anti- β 2GPI, e não dependentes desses anticorpos, como nas doenças auto-imunes. Em conjunto,

esses resultados apóiam a noção de que, na presença de infecções, anticorpos aCL são heterogêneos em relação à sua dependência da 2GPI (De LARANAGA et al., 2000; FIALLO et al., 1998; HOJNIK et al., 1994; LOIZOU et al., 2003), e as infecções podem desencadear a indução de anticorpos antifosfolípide "patogênicos" em indivíduos predispostos (LOIZOU et al., 2003).

A produção de autoanticorpos na hanseníase e leishmaniose pode ser explicada por diversos mecanismos. Na forma mais generalizada dessas doenças (hanseníase VV e leishmaniose visceral), os pacientes apresentam hipergamaglobulinemia difusa semelhante à vista em outras infecções, como *Schistosoma mansoni*, *T. cruzi* e *Plasmodium*. A indução de autoanticorpos pode ser atribuída à ativação policlonal e proliferação das células B, algumas com auto-reatividade, pertencentes à biblioteca de anticorpos naturais em indivíduos normais (ARGOV et al., 1989). Na leishmaniose, antígenos solúveis derivados da *L. major* e *L. donovani* são mitogênicos e desencadeiam a produção de imunoglobulinas com auto-reatividade (ARGOV et al., 1989). Crioglobulinemia mista induzida pelo HCV é outro exemplo de ativação policlonal persistente levando a uma mistura de autoanticorpos policlonais e monoclonais, os quais causam doenças auto-imunes (AGMON-LEVIN et al., 2009).

Mimetismo molecular ou homologias estruturais entre infecções e componentes do hospedeiro podem ser à base da produção de autoanticorpos, como no caso da febre reumática, onde o componente M da membrana do estreptococo apresenta homologia com peptídeos cardíacos, cerebrais e sinoviais. A associação da síndrome de Guillain-Barré com a infecção pelo *Campylobacter jejuni* representa outro exemplo de mimetismo molecular como base de uma manifestação auto-imune. A reatividade cruzada entre agentes infecciosos e auto-antígenos já foi demonstrada para o *M. leprae* (McADAM; MUDD; SHOENFELD, 1984) e *M. tuberculosis* (SHOENFELD et al., 1986), e a inibição de anticorpos anti-Sm, anti-RNP e anti-SSB por promastigotas intactas de *Leishmania* apóia a homologia entre antígenos nucleares e a *Leishmania* (ARGOV et al., 1989).

A disseminação de epítomos, a emergência de novos anticorpos ou a resposta de células T a um novo epítomo (subdominante ou críptico) no mesmo antígeno ou em outro antígeno foi demonstrada em modelos experimentais e na doença humana, alguns autores demonstraram a disseminação molecular do antígeno Sm para reatividade anti-RNP (STAUB, 1998), no LES, enquanto na febre

reumática, o estado de autoimunidade crônica que afeta as válvulas cardíacas pode resultar em uma resposta imunológica contra o colágeno e laminina. (KIVITY et al., 2009; PORDEUS et al., 2008). As infecções também podem desempenhar um papel importante na indução da autoimunidade através da liberação de antígenos seqüestrados, após lesão tecidual, ou aumentando a exibição de epítomos crípticos, no meio inflamatório, apresentando, assim, novos antígenos ao sistema imunológico. (KIVITY et al., 2009; PORDEUS et al., 2008).

1.5 FREQUÊNCIA E IMPLICAÇÕES DOS AUTO-ANTICORPOS EM HEPATITES AGUDAS VIRAIS

O conceito de auto-imunidade induzida por vírus não é exclusivo para doenças hepáticas. O vírus Coxsackie do grupo B é responsável por mais de um terço dos casos clínicos de miocardite infecciosa e está implicado nas miocardites auto-imunes, reagindo contra a miosina cardíaca (GIST; BELL, 1974). Niwa et al. (1984) encontraram elevação transitória de auto-anticorpos, incluindo fator reumatóide, fator antinúcleo, anticorpo anti-DNA (títulos acima de 1:40) em doenças virais comuns como: varicela, sarampo, influenza, caxumba, herpes zoster e exantema súbito.

A patogênia da infecção viral inclui pelo menos três tipos de interações com o hospedeiro vertebrado; 1) o efeito do agente sobre as células; 2) a maneira de disseminação do agente no organismo infectado; 3) a resposta imunológica e a sua influencia no processo infeccioso. Destacam-se dois tipos principais da interação: a destruição celular e a resposta imunológica (FIGUEIREDO, 1999; CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2006). O vírus Coxsackie do grupo B é responsável por mais de um terço dos casos clínicos de miocardite infecciosa e está implicado nas miocardites auto-imunes, reagindo contra a miosina cardíaca (GERSHON; KONDO, 1971). Niwa et al. (1984) encontraram elevação transitória de auto-anticorpos, incluindo fator reumatóide, fator antinúcleo, anticorpo anti-DNA (títulos acima de 1:40) em doenças virais comuns como: varicela, sarampo, influenza, caxumba, herpes zoster e exantema súbito.

1.6 ANTICORPOS ANTINUCLEARES - FATOR ANTINUCLEAR – FAN

De acordo com o II Consenso Brasileiro de FAN em HEp 2 (DELLAVANCE et al., 2003), os AAN são encontrados comumente em uma variedade de doenças reumáticas auto-imunes. São úteis na investigação dessas doenças, auxiliando no diagnóstico de patologias como LES, esclerose sistêmica progressiva (ESP), doença mista do tecido conjuntivo (DMTC), síndrome de Sjögren (SS), polimiosite e dermatomiosite.

Eles podem estar presentes em um pequeno percentual da população aparentemente sadia; essa frequência é maior em mulheres e aumenta com a idade. Segundo a literatura, a positividade entre 20 a 60 anos varia entre percentuais mais altos (13,3%) para títulos baixos e mais baixos (3,3%) para títulos mais elevados (DELLAVANCE et al., 2003).

A pesquisa dos anticorpos antinucleares pode ser realizada por diferentes técnicas; a imunofluorescência indireta é a mais utilizada, por sua sensibilidade, reprodutibilidade e facilidade de execução. A sensibilidade aumenta significativamente quando se utiliza como substrato lâminas com células Hep 2 (células de carcinoma de laringe humana), por causa da maior expressão de antígenos na superfície dessas células comparados aos expressos nas células de fígado ou de rins de camundongos, que se utilizavam anteriormente.

Em geral, é possível detectar melhor a presença de AAN por associação de três anti-soros isotipos específicos (anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM). A pesquisa realizada por essa técnica serve de triagem inicial para a presença de AAN. É normalmente denominada pesquisa de FAN ou AAN.

A realização de outras metodologias, tais como as imunoenzimáticas, permite uma avaliação isolada dos diferentes auto-anticorpos, sugeridos pelos padrões de fluorescência encontrados no FAN. A identificação desses AAN permite um diagnóstico mais preciso, e eles podem ser utilizados, em muitos casos, como marcador para uma das diferentes doenças reumáticas auto-imunes. Muitas dessas patologias apresentam um perfil distinto de auto-anticorpos que auxilia o diagnóstico.

A presença de FAN positivo em pessoas aparentemente saudias pode ser devida a algumas situações:

- Doença auto-imune precoce ainda não expressa clinicamente;

- distúrbio imunológico transitório causado por doença não-imune, tais como infecções, principalmente virais;
- uso de medicamentos e neoplasias;
- manifestação incompleta de uma síndrome, ou seja, o paciente sintetiza o anticorpo, porém esse quadro não evolui para doença;
- fenômeno auto-imune fisiológico.

O resultado do FAN é expresso em título e padrão, uma vez que ambos os parâmetros têm importância para a avaliação do significado clínico do exame. O título do FAN corresponde à maior diluição capaz de demonstrar fluorescência inequívoca e didaticamente, pode ser dividido em:

- Baixo: menor 1/80;
- Moderado: 1/160;
- Moderadamente elevado: 1/320;
- Alto: maior 1/640.

Nas pesquisas realizadas por imunofluorescência indireta, os resultados são expressos em títulos, segundo as diluições empregadas. É possível trabalhar utilizando-se como limite títulos de 1/40, que permitem maior sensibilidade, ou de 1/80, que permitem maior especificidade, ou seja, um menor número de falso-positivos.

Na prática clínica, são considerados significativos títulos superiores a 1/160. Os resultados com títulos positivos são acompanhados pela descrição do padrão de fluorescência encontrado, que serve como orientação da presença de um antígeno específico e, em alguns casos, como padrão diagnóstico. Em determinadas situações, em especial no LES em atividade, pode ocorrer à observação de mais de um padrão de fluorescência.

O padrão do FAN, a seu turno, aponta uma probabilidade maior ou menor de doença auto-imune e até mesmo sugere o antígeno nuclear envolvido e, por conseqüência, a afecção com ele mais relacionada. Os padrões homogêneo, centromérico e pontilhado grosso são os mais indicativos de processos de autoimunidade, uma vez que se associam a diversas condições reumáticas, especialmente ao LES e à esclerose sistêmica, e também a enfermidades hepáticas, tais como a cirrose biliar primária e a hepatite auto-imune (KILLENBERG, 2000).

Já o pontilhado fino, o pontilhado grosso reticulado e a membrana nuclear têm maior significado quando encontrados em títulos altos, uma vez que podem estar presentes em títulos baixos em indivíduos hígidos. Por sua vez, o pontilhado fino denso, mesmo quando elevado em pessoas assintomáticas, só guarda relação com alguma doença em cerca de 20% dos casos (DELLAVANCE et al., 2003).

O padrão pontilhado pode também ser referido como padrão salpicado. Outros padrões de fluorescência podem ser encontrados em menor frequência. Os pontilhados citoplasmático grossos ou reticulares, associados à presença de anticorpos antimitocôndrias em pacientes com cirrose biliar primária; o citoplasmático homogêneo, relacionado a proteínas ribossômicas em pacientes com LES; e o padrão pontilhado fino citoplasmático, que pode estar associado à presença de anticorpos anti-JO-1, anti-PCNA e proteínas da membrana celular, em pacientes com LES, outras patologias do tecido conjuntivo e hepatopatias auto-imunes (DELLAVANCE et al., 2003).

Quadro 1 - Padrões de fluorescência encontrados em maior frequência e patologias relacionadas

Padrões de Fluorescência	Antígenos	Patologias Relacionadas
Periférico	DNA de dupla hélice ou de hélice única, histona e RNA	LES
Homogêneo	DNA de dupla hélice ou de hélice única, histona e RNA	LES, AR, lúpus induzido por drogas
Periférico/homogêneo	DNA de dupla hélice ou de hélice única, histona e RNA	LES
Pontilhado grosso	SM, RNP	LES, DMTC
Pontilhado fino nuclear	SS-A (RO) SS-B (La)	SS, LES
Nucleolar	Proteínas Nucleolares	ESP
Centromérico	Proteínas de centrômeros	Síndrome de CREST

Fonte: Dellavance et al., 2003.

Quadro 2 - Anti-ena - auto-anticorpos contra antígenos extraídos do núcleo e relevâncias clínicas mais frequentes

Padrões Nucleares	Patologias Relacionadas
SM	LES
RNP	DMTC, LES, ESP, AR e Polimiosite
SS-A (Ro)	SS, LES, lúpus neonatal e forma cutânea subaguda
SS-B (La)	SS, LES, lúpus neonatal e forma cutânea subaguda
Scl 70	ESP
Jo -1	Polimiosite e dermatomiosite

Fonte: Dellavance et al., 2003.

Quadro 3 – Padrões de FAN nuclear e relevâncias clínicas mais freqüentes

Padrões Nucleares	Relevância Clínica por Auto-Anticorpos
Nuclear Pontilhado Centromérico	Anticorpo anti-centrômero: Esclerose Sistêmica forma CREST; Cirrose Biliar Primária.
Nuclear homogêneo	Anticorpo anti-DNA nativo: Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). Anticorpo anti-Histoma: LES induzido por drogas; LES idiopático. Anticorpo anti-cromatina (DNA/Histona, Nucleossomo): Artrite Reumatóide (AR); Artrite Idiopática Juvenil, importante associação com uveíte na forma oligoarticular; Síndrome de Felty; Cirrose Biliar Primária.
Nuclear tipo membrana nuclear contínua	Anticorpo anti-lamin e contra envelope nuclear - lamins: Hepatites auto-ímmunes; Raramente associado a doenças reumáticas (algumas formas de LES e esclerodermia linear).
Nuclear pontilhado pleomórfico/PCNA	Anticorpo contra núcleo de células em proliferação: LES
Nuclear pontilhado fino denso	Anticorpo anti-proteína p 75 kDa: pode ser encontrado em indivíduos saudáveis, processos inflamatórios inespecíficos, doenças reumáticas auto-ímmunes, Cistite Intersticial, Dermatite Atópica, Psoríase e Asma.
Nuclear pontilhado tipo pontos isolados com menos de dez pontos	Anticorpo anti-p80 coilina: não apresenta associação clínica definida.
Nuclear pontilhado tipo pontos isolados com menos de dez pontos	Anticorpo anti-Sp100 (anti-p95): Cirrose Biliar Primária; pode ocorrer em diversas outras condições clínicas.
Nuclear pontilhado grosso	Anticorpo anti-Sm: LES. Anticorpo anti-RNP: critério obrigatório no diagnóstico da doença mista do Tecido conjuntivo (DMTC); também ocorre no LES, Esclerose Sistêmica (ES) e AR.
Nuclear pontilhado fino	Anticorpo anti SSA/Ro: Síndrome de Sjogren Primária (SS); LES; Lupus neonatal e Lupus Cutâneo Subagudo. Anticorpo anti-SSB/La: Lupus neonatal; LES; SS. Anticorpo anti-Mi-2: Dermatomiosite, embora raramente ocorra na polimiosite do adulto.

Fonte: Dellavance et al., 2003.

Quadro 4 - Padrões de FAN citoplasmáticos e relevâncias clínicas mais frequentes

Padrões Citoplasmáticos e Relacionados ao Aparelho Mitótico	Relevância Clínica por Auto-Anticorpos
Citoplasmático Fibrilar Linear	Anticorpo anti-actina: Hepatite auto-imune, Cirrose. Anticorpo anti-miosine: Hepatite C, Hepatocarcionoma, Miastenia Gravis. Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida.
Citoplasmático Fibrilar Segmentar	Anti actinina, anti--vinculina e anti-tropomiose: Miastenia Gravis, Doença de Crohn e Colite ulcerativa. Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida.
Citoplasmático Pontilhado Polar	Anticorpo Anti-golginas (cisternas do aparelho de Golgi): raro no LES, SS e outras doenças auto-imunes sistêmicas. Relato na Ataxia Cerebelar Idiopática, Degeneração Cerebelar, Paraneoplásica, infecções virais pelo Epstein Barr (EBV) e pelo vírus da imunodeficiência Humana (HIV). Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida.
Citoplasmático Pontilhado Fino	Anticorpo anti-Histidil t RNA sintetase (Jo-1): anticorpo marcador de Polimiosite no adulto. Descrito raramente na Dermatomiosite.
Citoplasmático Pontilhado com Pontos Isolados	Anticorpo anti-EEA1 e anti-fosfatidilserina: não há associações clínicas bem definida. Anticorpo anti-GWB:SS; também encontrado em diversas outras condições clínicas.
Citoplasmático Pontilhado Reticulado	Anticorpo anti-mitocôndria: Cirrose Biliar Primária; Esclerose Sistêmica. É relativamente comum o encontro deste padrão na ausência de anticorpos anti-mitocôndria.
Citoplasmático Pontilhado Fino Denso	Anti PL7/PL12: Raramente associado a Polimiosite. Anticorpo P-ribossomal: Este padrão ocorre no LES se a associação é com anti-proteína P ribossomal.
Citoplasmático Fibrilar Filamentar	Anticorpo anti-vimentina e anti-queratina: Anti-queratina é o anticorpo mais importante em doença hepática alcoólica. Descritos em várias doenças inflamatórias e infecciosas. Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida.
Aparelho mitótico Tipo Centríolo	Anticorpo anti-enolase: em baixos títulos não tem associação clínica definida. Em altos títulos é sugestivo de Esclerose Sistêmica.
Aparelho mitótico Tipo ponte Intercelular	Anticorpo anti Tubulina: Pode ser encontrado no LES e na DMTC. outros anticorpos ainda não bem definidos podem gerar o mesmo padrão.
Aparelho mitótico Tipo NuMa2	Anticorpo anti-HsEg5: diversas condições auto-imunes com baixa especificidade

Fonte: Dellavance et al., 2003.

Quadro 5 - Padrões de FAN mistos e relevâncias clínicas mais freqüentes

Padrões Mistos	Relevância Clínica por Auto-anticorpos
Misto do tipo nucleolar homogêneo e nuclear pontilhado grosso com placa metafásica decorada em anel (cromossomos negativos)	Anticorpo anti-Ku: Superposição, Polimiose e Esclerose Sistêmica. Podem ocorrer no LES e Esclerodermia.
Misto do tipo nuclear e nucleolar pontilhado com placa metafásica positiva.	Anticorpo anti-topoisomerase (Scl-70): ES forma difusa. Mais raramente pode ocorrer na Síndrome CREST e superposição Polimiosite/Esclerodermia.
Misto do tipo Citoplasmático pontilhado fino denso e homogêneo e nucleolar homogêneo	Anticorpo anti-rRNP: LES; freqüentemente relacionado à Psicose Lúpica.
Misto do tipo nuclear pontilhado fino com fluorescência do aparelho mitótico	Anticorpo anti-NuMA1:SS; pode ocorrer também em outras condições auto-imunes ou inflamatórias crônicas.

Fonte: Dellavance. et al., 2003.

Quadro 6 - Padrões de FAN nucleolares e relevâncias clínicas mais freqüentes

Padrões Nucleolares	Relevância Clínica por Auto-anticorpos
Nucleolar Aglomerado	Anticorpo anti-Fibrilarina (U3-nRNP): Esclerose Sistêmica (ES), especialmente com comprometimento visceral grave, entre eles a hipertensão pulmonar.
Nucleolar Pontilhado	Anticorpo anti-NOR-90: ES; também descrito em outras doenças do tecido conjuntivo, porém sem relevância clínica definida. Anticorpos anti-RNA polimerase I: ES de forma difusa com tendência para comprometimento visceral mais freqüente e grave.
Nucleolar Homogêneo	Anticorpo anti-PM/Scl: Síndrome de Superposição de Polimiosite com Esclerose Sistêmica. Raramente encontrado em casos de Polimiosite ou Esclerose Sistêmica sem superposição clínica. Outros auto-anticorpos mais raros podem apresentar esse padrão.

Fonte: Dellavance et al., 2003.

De acordo com o 3º Consenso (DELLAVANCE et al., 2009), foram comunicados dois novos padrões de fluorescência por participantes. Vários outros membros testemunharam já haver observado esses padrões. O primeiro trata-se de um padrão nuclear pontilhado fino, aproximando-se da textura homogênea, e com placa metafásica corada da mesma forma. Sua associação clínica e identidade imunológica não estão definidas. Sua importância deriva do fato de que pode ser facilmente confundido com o padrão pontilhado fino denso e com o padrão homogêneo. O segundo trata-se de um padrão citoplasmático em forma de pequenos bastões (*rods*) e círculos (*rings*) que, aparentemente, está associado à

infecção pelo HCV. Há estudos em curso por alguns grupos de pesquisa com a finalidade de estabelecer sua identidade imunológica.

Como ainda não estão definitivamente caracterizados, esses dois novos padrões foram considerados preliminares e o 3º Consenso recomendou que os mesmos fossem completamente caracterizados e apresentados na próxima versão do Consenso. (DELLAVANCE et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

As inflamações do fígado provocadas pelos vírus hepatotrópicos atingem milhões de pessoas e representam significativos problemas de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, a Região Norte responde por um significativo percentual dos portadores de hepatite C. Dentre as manifestações extra-hepáticas da infecção pelo vírus C, as doenças autoimunes têm significativo impacto na evolução clínica desses pacientes. A presença de anticorpo antinúcleo é um marcador importante de autoimunidade e, apesar de existirem trabalhos relatando a pesquisa desse fator em portadores de vírus C, tais estudos ainda não foram realizados na nossa região, sobretudo correlacionando-se com o genótipo do vírus responsável pela infecção, considerando que o genótipo é um marcador de resposta ao tratamento ou considerando que pacientes portadores do genótipo 1 não respondem satisfatoriamente ao tratamento instituído pelo protocolo atual.

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa a ser realizada apresenta relevância social e não perde o sentido de sua destinação sócio-humanitária (justiça e equidade).

Este trabalho adequa-se aos princípios científicos que o justificam e apresenta possibilidade concreta de responder a incertezas tais como: FAN e o genótipo viral em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C “estão relacionados”.

Segue rigorosamente os procedimentos descritos na Resolução 196/96-CNS/MS (BRASIL, 1996), assegurando a confiabilidade e proteção da identidade do sujeito da pesquisa, no momento da aferição dos dados e sua posterior utilização.

Por tratar-se de um estudo que fará somente revisão de soroteca, os participantes não serão submetidos a riscos de origem orgânica e/ou química.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer associação entre a presença de teste de FAN e o genótipo viral em pacientes portadores de infecção pelo HCV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar o padrão de fluorescência do FAN em pacientes com diagnóstico laboratorial de infecção pelo HCV;
- II. Distribuir a prevalência de FAN e o Genótipo viral em pacientes infectados pelo HCV de acordo com o gênero e a idade;
- III. Identificar a prevalência de FAN em pacientes infectados pelo HCV e não infectados;
- IV. Distribuir a prevalência de FAN e o Genótipo viral em pacientes infectados pelo HCV de acordo com as alterações bioquímicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 GRUPOS POPULACIONAIS ESTUDADOS (POPULAÇÃO DO ESTUDO)

Foi realizado um estudo transversal analítico no Serviço do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (NMT/UFPA), utilizando-se pacientes oriundos da Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA) e Plano de Assistência ao Servidor (PAS/IASEP) com coleta de material biológico para reconfirmação do diagnóstico de hepatite C no período de janeiro de 2009 a maio de 2010.

4.1.1 Pacientes com diagnóstico laboratorial de Hepatite C

A população de estudo consistiu de 51 pacientes admitidos no NMT/UFPA para reconfirmação diagnóstica, tratamento clínico e acompanhamento ambulatorial de ambos os gêneros e independente da idade, sem exclusão dos pacientes com a presença de patologias associadas à condição maior (motivadora da pesquisa), oriundos da Fundação HEMOPA e PAS.

A amostra do grupo foi selecionada a partir da relação dos prontuários catalogados no laboratório de patologia do NMT/UFPA.

Os dados foram coletados através dos resultados dos exames realizados no soro de cada paciente. O protocolo de coleta teve enfoque na identificação individual do paciente, bem como a avaliação clínica dos resultados.

4.1.2 Grupo de não infectados

Foi utilizado um grupo controle de 100 amostras de soro de indivíduos doadores de sangue, com sorologias negativas para: HIV 1 e 2, HTLV 1 e 2, Sífilis, Doenças de Chagas, Hepatite B e para Hepatite C, procedentes da fundação HEMOPA.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Obtenção do material biológico

Foram colhidos em frasco sem anticoagulante 10ml de sangue periférico dos 51 pacientes participantes da pesquisa. A amostra sanguínea de cada paciente foi centrifugada, o soro foi separado e colocado em frasco estéril devidamente identificado, armazenado e resfriado de 2 a 8°C.

Foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais a pesquisa sorológica de anticorpos IgG anti-HCV por teste imunoenzimático (ELISA) e os pacientes que apresentaram positividade tiveram seus resultados confirmados através de técnicas moleculares (RT-PCR), e com identificação do genótipo viral (genotipagem).

Foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Amaral Costa a pesquisa de FAN dos 51 pacientes selecionados, utilizando as amostras existentes na soroteca.

4.2.2 Diagnóstico sorológico da hepatite C

Foram empregados testes sorológicos de ELISA (Ensaio Imunoenzimático) de 3ª geração, utilizando-se de kits comerciais (kit ETI-AB-HCVK-4, DiaSorin, Itália) para detecção de anticorpos específicos anti-HCV no soro dos pacientes.

As tiras (poços) necessárias para as reações foram retiradas da geladeira com antecedência de uma hora e deixadas à temperatura ambiente, e os reagentes homogeneizados rapidamente no vórtex.

O primeiro poço da placa ficou o branco da reação, na sequência da microplaca de ELISA, foi dispensado 200 µL do controle negativo em triplicata (três poços), 200 µL do calibrador em duplicata (dois poços) e 200 µL do controle positivo em amostra única (um poço).

Adicionou-se 200 µL do Diluente de Amostra em todos os poços que continham as amostras dos pacientes a serem dosadas, na placa de ELISA, tomando cuidado para não contaminar os poços adjacentes.

Dispensou-se 50 µL do Diluente do Reagente em todos os poços de controles, calibradores e amostras; cobrimos com adesivo para evitar evaporação e contaminação das amostras; e incubamos a microplaca de ELISA por 45 min a 37°C.

Após incubação, lavou-se cada poço da microplaca de 4 a 5 vezes com 300 µL da Solução de Lavagem diluída.

Pipetou-se 100 µL de Conjugado Enzimático, exceto no poço do branco, e incubou-se a microplaca de ELISA por 45 min a 37°C. Após incubação, lavou-se cada poço da microplaca de 4 a 5 vezes com 300 µL da Solução de Lavagem diluída.

Pipetou-se 100 µL de Cromógeno/Substrato em todos os poços. Incubamos a microplaca, protegendo-a de luz intensa e direta, à temperatura ambiente (18-24°C) por 15 min.

Pipetou-se 100 µL de Ácido Sulfúrico em todos os poços, para “parar” a reação enzimática e mediu-se a absorbância da solução obtida em leitor de ELISA com filtro de 450 nM.

O teste foi validado de acordo com os valores do controle de qualidade preconizados pelo fabricante e que devem tanger os valores para o branco da reação ≤ 0.100 ; controle negativo ≤ 0.050 , controle positivo ≥ 1.000 , e calibrador ≥ 1.100 . Para as amostras testadas, os valores reagentes e não reagentes para pesquisa de anticorpos anti-HCV são interpretados da seguinte maneira: não reagentes com valores ≤ 0.9 ; reagentes com valores ≥ 1.1 ; e indeterminados entre os valores 0.9 – 1.1.

4.2.3 Detecção dos ácidos nucléicos do vírus da hepatite C por biologia molecular

Nas amostras positivas pela sorologia (ELISA) realizou-se extração do RNA viral presente no soro do paciente, utilizando kit comercial (QIAmp Viral RNA kit, Quiagen, Alemanha), seguindo a técnica adaptada no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais.

Pipetou-se 560 µL de tampão AVL (lise) contendo RNA em tubo de centrífuga de 1.5 ml identificado, adicionou-se 140 µL da amostra e homogenizou-se em vórtex por 15s; incubando a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 min. Após incubação, centrifugou-se rapidamente o tubo para remover partículas dispersas.

Adicionou-se 560 µL de etanol (96-100%) na amostra e homogenizou-se no vórtex por 15s, centrifugando-se rapidamente para remover partículas dispersas. Depois, cuidadosamente, transferiu-se 630 µL para as colunas devidamente identificadas, centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 min e descartou-se a parte de baixo, ficando só com a coluna para encaixar em outro tubo.

Colocou-se o resto das amostras nas colunas devidas, centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 min e descartou-se a parte de baixo, ficando só com a coluna para encaixar em outro tubo. Lavou-se com 500 µL de tampão da lavagem (AW1) e centrifugou-se por 1 min, mantendo-se a coluna e descartando-se a parte de baixo. Lavou-se com 500 µL de tampão da lavagem (AW2) e centrifugou-se por 4 min, mantendo-se a coluna e descartando-se a parte de baixo.

Identificados os tubos para RNA, colocou-se as colunas. Adicionou-se 60 µL de tampão para eluir (AVE) em cada amostra e centrifugou-se por 1 min, descartando a coluna e ficando com o tubo. Colocou-se em banho-maria por 10 min a 65°C, centrifugado rapidamente e colocado no gelo. As amostras extraídas foram congeladas e armazenadas em freezer a -20°C.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado de acordo com a técnica de RT-PCR qualitativa, com adaptações feitas no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais, da seguinte maneira para o Mix de uma amostra: Tampão: 12 µL; primer ou iniciador k10: 1µL; primer ou iniciador k11: 1µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 5 µL; Enzima Taq polymerase One-Step (Invitrogen): 1 µL. O primer k10 constitui-se da sequência GGC GAC ACT CCA CCA TRR e o primer k11 da sequência GGT GCA CGG TCT ACG AGA CC.

O volume do mix por amostra é de 20 µL e o volume da amostra (produto da extração) de 5 µL, perfazendo um volume total por tubo de 25 µL. As amostras foram colocadas em termociclador e a reação é realizada a 42°C por 45 minutos, temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos, com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, de anelamento a 54°C por 30 segundos, de extensão a 72°C por 45 segundos e temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos, e um hold de 4°C.

Para visualização do produto dessa 1ª PCR (RT-PCR), é feito um gel de agarose a 1% (1g de agarose para 100mL de tampão TEB 1X e 3 µL de brometo de etidium), que migrou na cuba de eletroforese com 100V, 500A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através de luz ultravioleta (UV). Os pacientes

positivos, que apresentarem “banda”, devem continuar os procedimentos e os negativos, que não apresentarem “bandas” deverão ser liberados como indetectáveis por este método.

A 2ª PCR (RFLP) foi responsável por fazer a amplificação do cDNA, produto da 1ª PCR. Para esta etapa, também com adaptações feitas no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais, foram necessários para o Mix de uma amostra: Tampão 10X: 2,5 µL; DNTP: 4 µL; MgCl₂: 1,5 µL; primer ou iniciador k15: 1 µL; primer ou iniciador k16: 1 µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 12,5 µL; Enzima Taq platinum (Invitrogen): 0,5 µL. O primer k15 constitui-se da sequência ACC ATR RAT CAC TCC CCT GT e o primer k16 da sequência CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT.

O volume do mix por amostra foi de 23 µL e o volume da amostra (produto da 1ª PCR) de 2 µL, perfazendo um volume total por tubo de 25 µL. As amostras são colocadas em termociclador e a reação se realiza a temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos, com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, de anelamento a 55°C por 45 segundos, de extensão a 72°C por 1 minuto e temperatura de extensão final de 72°C por 7 minutos, e um hold de 4°C.

O produto da 2ª PCR é observado através de um gel de agarose a 1% (1g de agarose para 100 mL de tampão TEB 1X e 3 µL de brometo de etidium), que migrou na cuba de eletroforese com 100V, 500A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através de luz UV (ultravioleta). Os pacientes positivos, que apresentaram “banda” (fragmento amplificado), se continuou os procedimentos e os negativos, que não apresentaram “bandas” foram repetidos para o procedimento da 2ª PCR.

4.2.4 Determinação do genótipo do vírus (genotipagem)

Os pacientes positivos para a 2ª PCR foram submetidos à genotipagem do vírus através do método de RFLP, utilizando um par de enzimas de restrição, AVA II e RSA I. Essa técnica também foi adaptada no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais.

Na determinação do genótipo, cada amostra é utilizada duas vezes, sendo uma reação para AVA II e uma para RSA I, portanto cada amostra teve dois tubos correspondentes.

Para a preparação do mix de uma amostra para a enzima de restrição AVA II (Promega), foram utilizados: Buffer C X 30: 2 µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 12,5 µL; AVA II: 0,5 µL. Para o mix de uma amostra de RSA I (Invitrogen), são necessários: React 1 10X: 2 µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 11 µL; RSA I: 2 µL.

O volume do mix por amostra foi de 15 µL e o volume da amostra (produto da 2ª PCR) de 5 µL, perfazendo um volume total por tubo de 20 µL para cada frasco correspondente a sua enzima de restrição. As amostras formão “pares” de tubos AVA II e RSA I e são colocadas em banho-maria a 37°C overnight para digerir (cortar) os fragmentos.

Para visualização do produto da digestão (RFLP) e verificação dos genótipos, foi preparado um gel de agarose a 2% (2g de agarose para 100 mL de tampão TEB 1X e 3 µL de brometo de etidium), que migrou em cuba de eletroforese com 100V, 500A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através de luz UV (ultravioleta). Os pacientes positivos apresentam “bandas” (fragmentos) de tamanhos diferentes. O número de bandas e sua disposição no gel formaram padrões de combinações correspondentes a cada genótipo viral.

4.2.5 Técnica da pesquisa de auto-anticorpos antinucleares (FAN) em células HEp-2

A pesquisa de auto-anticorpo contra antígenos celulares foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Amaral Costa, pela técnica de imunofluorescência indireta que os identifica através da ligação destes auto-anticorpos aos antígenos do substrato, sendo esta ligação revelada pela adição de um soro com atividade Anti-IgG conjugado à fluoresceína.

As amostras foram testadas utilizando-se um conjunto diagnóstico comercial Antinuclear Antibody HEp-2, da Hemagen Diagnostics.

Na primeira fase da reação, os soros diluídos 1/40 colocados em contato com o substrato durante 20 minutos, seguido de lavagem com solução salina tamponada por 10 minutos. Na segunda fase, aplicou-se a substância

fluorescente, sendo o conjugado diluído 1/30, deixando-se por 10 minutos seguida de nova lavagem de 10 minutos e montagem da lâmina com glicerina tamponada.

Em cada lâmina foram utilizados controle positivo e controle negativo.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência, marca Nikon, modelo Eclipse E-200.

Os critérios morfológicos observados durante a leitura foram:

- a) aspecto da matriz nuclear;
- b) aspecto do nucléolo;
- c) observação de todos os estágios de divisão nuclear;
- d) aspecto do fuso mitótico;
- e) aspecto do citoplasma.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram estruturados em um banco de dados, no qual também foram confeccionadas tabelas e gráficos para representação dos dados. Posteriormente foram analisados no programa Bioestat 5.0 para a geração de resultados estatísticos que comprovassem a associação de variáveis pertinentes ao estudo, considerando o intervalo de confiança (IC) 95% e nível α 5% (p -valor $\leq 0,05$), isto é, um achado será considerado estatisticamente significativo se valor de “ p ” for menor ou igual a 0,05 e será considerado sem significância estatística se esse valor de “ p ” for maior que 0,05.

Nas variáveis quantitativas foram realizadas as medidas de tendência central, sendo calculado a média e a mediana com seus respectivos desvios padrões. O teste t foi usado para comparar as idades entre as amostras.

O teste do Qui-quadrado e o teste G foram aplicados nas comparações de n amostras independentes, cujas proporções observadas nas diversas modalidades estiveram dispostas em tabelas de contingência $l \times c$, onde se determinou as proporções observadas nas diferentes categorias e se estas tinham alguma associação.

5 RESULTADOS

O Padrão de FAN em 100% dos 51 pacientes infectados pelo HCV e em 2% dos não infectados pelo HCV, ocorreu Citoplasmático.

Com relação à distribuição dos pacientes por gênero, observou-se uma predominância do gênero masculino (66,7%). A faixa etária predominante foi a de 30 a 50 anos de idade (62,8%), seguida da faixa etária compreendida entre 51 e 60 anos (19,6%). No que diz respeito à naturalidade, houve uma predominância de paraenses em 92,2% da amostra. A maioria dos pacientes incluídos no estudo foi proveniente da Fundação HEMOPA (98%) por se tratarem de candidatos a doação de sangue (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição dos pacientes, portadores de HCV, segundo as características demográficas, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Características demográficas	n	%	Teste estatístico
Gênero			
Masculino	34	66.7	Qui-quadrado p = 0,0251
Feminino	17	33.3	
Total	51	100.0	
Idade (anos)			
< 30	6	11.8	Qui-quadrado p = 0,0094
30 a 40	16	31.4	
41 a 50	16	31.4	
51 a 60	10	19.6	
> 60	3	5.9	
Total	51	100.0	
Naturalidade			
Paraense	47	92.2	Qui-quadrado p < 0,0001
Macapaense	1	2.0	
Maranhense	1	2.0	
Pernambucano	1	2.0	
Gaúcho	1	2.0	
Total	51	100.0	
Procedência			
HEMOPA	50	98.0	Qui-quadrado p < 0,0001
IASEP	1	2.0	
Total	51	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Identificou-se no estudo a predominância do genótipo viral do tipo 1 (88,2%) estando o genótipo 3 presente em 11,8% dos casos. Em 25,5% dos pacientes foi observado uma positividade para FAN, sendo que todos apresentaram o padrão citoplasmático (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes, portadores de HCV, conforme os resultados laboratoriais de FAN citoplasmático e genotipagem, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Exames laboratoriais	n	%	Teste estatístico
Genótipo viral - HCV			
Tipo 1	45	88.2	Qui-quadrado p < 0.0001
Tipo3	6	11.8	
Total	51	100.0	
FAN			
Positivo (citoplasmático)	13	25.5	Qui-quadrado p = 0.0008
Negativo	38	74.5	
Total	51	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Observou-se uma baixa positividade para o FAN, tanto no gênero masculino (29,4%), quanto no gênero feminino (17,6%). Não houve diferença estatística significativa entre os gêneros e a análise do FAN ($p = 0,5652$). Isto é, independentemente do gênero do paciente, nada se poderá inferir se o mesmo terá maior ou menor chance de possuir um FAN positivo ou negativo (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição do FAN citoplasmático de acordo com o gênero dos pacientes, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

FAN (citoplasmático)	Gênero				Teste estatístico (Teste G)
	Masculino		Feminino		
	N	%	N	%	
Positivo	10	29.4	3	17.6	p = 0,5652
Negativo	24	70.6	14	82.4	
Total	34	100.0	17	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Dentre os pacientes infectados o genótipo viral tipo 1 e o tipo 3 predominaram no gênero masculino, embora não havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,6376$). (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação da genotipagem de acordo com o gênero dos pacientes, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Gênero	Grupos estudados				Teste estatístico (Teste G)
	Genótipo 1		Genótipo 3		
	n	%	n	%	
Masculino	29	64.4	5	83.3	p=0,6376
Feminino	16	35.6	1	16.7	
Total	45	100.0	6	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Na faixa etária de 30 a 50 anos foi observada uma maior proporção (66,7%) do genótipo viral do tipo 3 enquanto que para o genótipo tipo 1 foi de 62,8%, não tendo essa diferença significância estatística (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes de acordo com o genótipo viral e faixa etária - janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Idade (anos)	Grupos estudados				Teste estatístico (Teste G)
	Genótipo 1		Genótipo 3		
	n	%	n	%	
< 30	04	11.8	0	0,0	p = 0,6401
30 a 40	15	31.4	3	50,0	
41 a 50	15	31.4	1	16,7	
51 a 60	08	19.6	2	33,3	
> 60	03	5.9	0	0,0	
Total	45	100.0	6	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

A análise descritiva das idades dos pacientes demonstrou que a média e a mediana foi de 43 anos, para aqueles com genótipo viral tipo 1, no entanto para o genótipo viral tipo 3 a média foi de 44 e a mediana de 42 anos. Observou-se que a idade mínima dos pacientes com genótipo viral-HCV do tipo 1 e 3 foi respectivamente de 20 e 32 anos e a máxima foi de 68 e 57 anos, perfazendo uma amplitude total de 48 e 25 anos respectivamente. Não houve significância estatística entre as idades encontradas nos genótipos 1 e 3. (Tabela 6).

De acordo com o FAN citoplasmático a idade mínima dos pacientes com FAN positivo e negativo foi respectivamente de 30 e 20 anos e a máxima foi de 53 e 68 anos, perfazendo uma amplitude total de 23 e 48 anos respectivamente. As idades média e mediana foram, respectivamente, 43,5 e 46 anos nos pacientes com o FAN positivo e média de 43 anos e mediana de 42 anos nos pacientes com o FAN

negativo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as idades encontradas nos pacientes com FAN positivo e negativo (Tabela 6).

Tabela 6 - Estudo descritivo da idade dos pacientes de acordo com o genótipo viral e presença do FAN citoplasmático, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Grupos Estudados	Genótipo viral - HCV		Auto anticorpo	
	Genótipo 1	Genótipo 3	FAN (+)	FAN (-)
	IDADE			
Tamanho da amostra	45	6	13	38
Idade mínima	20	32	30	20
Idade máxima	68	57	53	68
Amplitude Total	48	25	23	48
Média Aritmética	43	44	43.5	43
Mediana	43	42	46	42
Desvio Padrão	10.7	9.3	7.8	11.3
Teste t	p = 0,8363		p = 0,8809	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Com relação aos parâmetros bioquímicos, em que foram analisados AST, ALT, AST/ALT, γ -GT e fosfatase alcalina, identificou-se uma distribuição semelhantes dos achados entre os pacientes com genótipo viral tipo 1 e 3, não atestando significância estatística quando realizada as comparações entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7- Distribuição dos genótipos dos pacientes de acordo com os parâmetros bioquímicos, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Parâmetros bioquímicos	Genótipo viral - HCV		Teste estatístico (Teste t)
	Genótipo 1	Genótipo 3	
	$\mu \pm DP$	$\mu \pm DP$	
AST	35.3 \pm 21.9	32.8 \pm 13.7	p = 0,7907
ALT	37.2 \pm 32.1	28.8 \pm 13.6	p = 0,5355
AST/ALT	1.2 \pm 0.7	1.4 \pm 1.1	p = 0,6110
γ -GT	40.3 \pm 38	30.2 \pm 13.8	p = 0,2194
Fosfatase alcalina	112.6 \pm 44.3	108.7 \pm 37.6	p = 0,8349

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Com relação aos parâmetros bioquímicos de AST, ALT, AST/ALT, γ -GT e fosfatase alcalina identificou-se uma distribuição semelhante dos achados entre os

pacientes com FAN positivo e negativo, não sendo observada significância estatística quando realizada as comparações entre os grupos de FAN (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição do FAN citoplasmático dos pacientes de acordo com os parâmetros bioquímicos, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

Parâmetros bioquímicos	Auto anticorpos		Teste estatístico (Teste t)
	Positivo	Negativo	
	$\mu \pm DP$	$\mu \pm DP$	
AST	41.9 \pm 23.8	32.6 \pm 19.7	p = 0,1704
ALT	40.8 \pm 29	34.6 \pm 31.2	p = 0,5347
AST/ALT	1.3 \pm 0.8	1.2 \pm 0.7	p = 0,5732
γ -GT	34 \pm 21	40.9 \pm 40	p = 0,4369
Fosfatase alcalina	107.3 \pm 34.5	113.8 \pm 46.2	p = 0,6431

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Na comparação entre resultados positivos e negativos do FAN citoplasmático observou-se uma maior prevalência da negatividade tanto em pacientes não infectados (98%) como em pacientes infectados (74,5%) pelo HCV, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), o que representa uma não associação entre positividade de FAN citoplasmático e infecção pelo HCV (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição do FAN citoplasmático segundo a presença ou ausência de infecção por HCV, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

FAN (citoplasmático)	Pacientes				Teste estatístico (Teste G)
	Infectados		Não infectados		
	N	%	n	%	
Positivo	13	25,5	2	2	p < 0,0001
Negativo	38	74,5	98	98	
Total	51	100.0	100	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

Comparando-se os resultados do FAN citoplasmático entre os genótipos virais observa-se que o resultado negativo é superior ao positivo em ambos os genótipos virais, sendo 71,1% para o genótipo viral 1 e 100% para o genótipo viral 3. No entanto esta diferença observada não é estatisticamente significativa ($p = 0,2573$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição do FAN de acordo com o genótipo viral, janeiro 2009 a maio 2010, Belém – Pará

FAN (citoplasmático)	Grupos estudados				Teste estatístico (Teste G)
	Genótipo 1		Genótipo 3		
	n	%	n	%	
Positivo	13	28.9	0	0.0	p=0,2573
Negativo	32	71.1	6	100.0	
Total	45	100.0	6	100.0	

Fonte: Protocolo da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

Desde o primeiro marcador sorológico para diagnóstico do Lupus Eritematoso Sistêmico (LES), a célula LE descrita por Hargraves (1948), vários substratos antigênicos foram utilizados para o estudo dos auto-anticorpos, os quais terminaram amplamente substituídos pelas células HEp-2. Estas apresentam significativas vantagens sobre os demais, pela sua sensibilidade, variedade de antígenos presentes e pelas facilidades morfológicas para o seu estudo.

O uso da imunofluorescência indireta para a visualização dos anticorpos antinucleares nas células HEp-2 permite o reconhecimento de mais de 30 diferentes padrões de fluorescência, como: nucleares, nucleolares, da membrana nuclear, do aparelho mitótico e citoplasmático, todos são proporcionados por diferentes auto-anticorpos.

A partir do 1º Consenso Brasileiro para Padronização dos Laudos de FAN (HEp-2), os critérios para o preparo, interpretação da fluorescência e nomenclatura dos resultados, passaram a ser normatizados. Alguns padrões de fluorescência são relativamente inespecíficos, outros são ocasionados por uma gama restrita de auto-anticorpos, e outros, ainda, por um único auto-anticorpo. (DELLAVANCE et al., 2002), Os vírus podem ainda modificar proteínas do hospedeiro, de forma a torná-las imunogênicas, ativando o sistema imunológico e causando auto-reação (DE LARANAGA et al., 2000).

Apesar do padrão de fluorescência, na maioria das vezes, não se pode identificar o anticorpo presente, ele pode sugerir ao clínico qual o próximo passo a ser dado na investigação da sua especificidade. Os resultados encontrados devem estar em associação com a clínica os padrões de fluorescência e os títulos alcançados com a diluição prévia. (DELLAVANCE et al., 2003).

No presente estudo a análise de 51 pacientes com Infecção pelo Vírus da Hepatite C, esteve presente o anticorpo-antinuclear (ANA / FAN) em 13 (25.5%) dos pacientes, e todos eram padrão citoplasmático, corroborando com outros estudos encontrados na literatura como:

Bichara (2009) analisou a prevalência de ANA-Hep-2 em 3 grupos de pacientes infectados pelo vírus HIV, com Hanseníase e co-infectados com Hanseníase / HIV. Ela obteve, respectivamente as seguintes taxas de prevalências: 32%, 33,3% e 47,8%. Em todos os grupos, neste estudo, houve predomínio do

padrão citoplasmático, e o padrão nuclear só foi observado entre os pacientes com hanseníase (9,1%) e co-infectados (23,7%).

Bichara (2009) analisou a prevalência de ANA-Hep-2 em 3 grupos de pacientes infectados pelo vírus da Dengue e vírus linfotrópico de células T humanas, HTLV-1/2 e controle Normais e obteve, respectivamente as seguintes taxas de prevalências: 40%, 40% e 2%. Em todos os grupos houve predomínio do padrão citoplasmático, e o padrão nuclear foi observado entre os pacientes com dengue (6,7%) e HTLV 1/2 (13,3%).

Segundo Andrade et al. (2002); Dellavance et al. (2005); Dellavance e Andrade et al. (2007), o predomínio do padrão de FAN do tipo citoplasmático indica que determinados padrões de fluorescência são mais específicos de doença auto-imune, enquanto outros ocorrem em indivíduos com enfermidades não auto-imunes, por ser o citoplasma celular rico em proteínas para as quais auto-anticorpos naturais apresentam afinidade moderada, é comum observar positividade para FAN em indivíduos sadios, cujo significado ainda não é entendido completamente.

O padrão Citoplasmático Fibrilar Linear Anticorpo anti-actina que pode ser encontrado em: Hepatite auto-imune, Cirrose, Hepatite C, Hepatocarcinoma, entre outros. Quando em títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica definida. Um resultado positivo pode estar ou não associado a uma patologia, assim como poderá ou não vir a apresentar uma doença auto-imune, com o passar do tempo. (DELLAVANCE et al., 2003). Neste estudo não foi feita avaliação prospectiva dos resultados, embora todos sejam FAN citoplasmáticos.

Os achados de FAN positivo em populações sadias ou sem doenças auto-imunes também já observado por Leser et al. (2004) que em 394 pacientes com FAN-HEp-2 positivo não encontraram nenhum paciente com doença auto-imune.

Outro exemplo está no padrão citoplasmático de pontos isolados, estudado por Laurino et al. (2006), presente em indivíduos sem evidência de auto-imunidade, mas também em indivíduos com acometimento de doenças auto-imunes sistêmicas e não-específicas.

Os dados apresentados corroboram com este estudo, em que foi observado a presença do auto-anticorpo em 2 (2%), dos 100 indivíduos sadios do grupo controle, todos com padrão citoplasmático.

Os vírus podem ainda modificar proteínas do hospedeiro, de forma a torná-las imunogênicas, ativando o sistema imunológico e causando auto-reação (DE LARANAGA et al., 2000).

Nas Infecções agudas, espera-se que a resposta auto-imune diminua a medida que os vírus são eliminados. Entretanto, alguns trabalhos sugerem que em indivíduos geneticamente susceptíveis, as reações auto-imunes possam persistir apesar do clareamento viral uma vez que o gatilho imunológico foi ativado e não houve desativação (DE LARANAGA et al., 2000; SAKKAS et al., 2008).

Ramos-Casals et al. (2009) no estudo Doenças Sistêmica Auto-Imunes em Pacientes com Infecção pelo (72%) dos pacientes eram do gênero feminino e (28%) do masculino,(ANA/ FAN) em 61% dos pacientes, o que se diferem deste trabalho é que dos 51 pacientes com Infecção pelo (66,7%), eram do gênero masculino e (33,3%) eram do gênero feminino, com média de idade de 43,0 ($\pm 10,7$) anos, com presença de anticorpo-antinuclear em 13 (25.5%), com média e mediana, respectivamente, de 43,5 e 46 anos nos pacientes com o FAN positivo e média de 43 anos e mediana de 42 anos nos pacientes com o FAN negativo.

Alter (1995) em sua pesquisa não observou associação entre o risco de infecção e as variáveis demográficas designadas por gênero, idade e raça. Na referida pesquisa foram estudados 51 pacientes com idade média de 43,0 ($\pm 10,7$) anos, 34 (66,7%) eram do gênero masculino e 17 (33,3%) do gênero feminino, todos em fase pré-tratamento, assintomáticos, não permitindo avaliar os risco da infecção. Segundo Pordeus et al. (2008) a ocorrência destes auto-anticorpos indicaria um prognóstico desfavorável. Perperas, Mcfarlane e Mcsorley (1986) sugeriram que os auto-anticorpos poderiam estar envolvidos na progressão ou no desenvolvimento de hepatites crônicas, possivelmente por um distúrbio no controle da auto-reatividade. Outros estudos questionam a participação dos auto-anticorpos no processo de transição para cronicidade das hepatites agudas virais, porém os resultados não são convincentes (SHOENFELD; ROSE, 2004).

Lopez, Seia e Roy (1998) demonstraram a presença de anticorpo anti-actina, em baixos títulos, em crianças com hepatite aguda, por curto período de tempo, porém nenhuma associação com gravidade da agressão hepática foi descrita.

Neste estudo, a presença dos auto-anticorpos em (25.5%) dos pacientes com infecção pelo HCV, não puderam ser relacionada com a gravidade da doença,

pois este estudo foi realizado em pacientes recém diagnosticados, então seria necessário um acompanhamento destes por um período maior de tempo com a finalidade de concluir esta afirmativa. Apesar da presença transitória de auto-anticorpos já ter sido descrita em doenças virais comuns a associação entre a presença de auto-anticorpos e a gravidade das doenças necessita de comprovação.

Passaleva, Massai e Leoncini (1983) avaliaram 302 pacientes com hepatites agudas virais e encontraram complexos imunes circulantes (CIC) em 51,6% dos pacientes, com freqüência significativamente maior em hepatite aguda. Nenhuma associação entre a presença de imuno-complexos e o nível de aminotransferases ou bilirrubina foi encontrada. Segundo Andrade et al. (2002), Dellavance et al. (2005), Andrade et al. (2007), nos pacientes do estudo, foi feita a relação entre a presença dos auto-anticorpos e níveis de aminotransferases, e as elevações, não tiveram significância, porém houve associação do genótipo viral 1. Nos parâmetros bioquímicos analisados em relação aos genótipos houve uma distribuição semelhante dos achados entre os pacientes com genótipo viral tipo 1 e 3, não atestando significância estatística quando realizada as comparações entre os grupos.

Segundo Wilson (1997), três estudos mostraram correlação entre níveis altos de alanina aminotransferase e atividade histológica da doença hepática. Porém, nos pacientes, considerados individualmente, o valor preditivo dessa associação foi baixo, enquanto muitos deles com enzimas normais apresentavam graves alterações histológicas.

No presente estudo não foi observada associação entre os níveis de aminotransferases, e a cronificação da hepatite viral, pois nem todos os pacientes do estudo, apresentavam resultado de biópsia hepática.

Alter et al. (1999) afirmam que no Brasil predominam os genótipos 1a e 1b (63%), e 3a (31,3%), em estudo realizado em Goiânia, onde foi observada uma maior prevalência do genótipo 1, seguida do genótipo 3 em doadores de sangue e hemofílicos. (DELLAVANCE; ANDRADE et al., 2007). Estando esses dados em acordo com esta pesquisa que com genotipagem do vírus da hepatite C que, identificou o genótipo 1 em 45 (88.2%), seguidos pelo genótipo 3, que foi identificado em 6 (11,8%) dos pacientes com infecção pelo HCV.

Em um estudo realizado na França, com 13 pacientes lúpicas infectadas pelo vírus C, 8 apresentavam o RNA viral, sendo o genótipo 1 presente em cinco

(62,5%) casos, seguido do genótipo 3 (37,5%) (PERLEMUTER et al., 2000), dados que se assemelham aos do presente estudo, embora o estudo não tenha incluído pacientes com outras infecções associadas ao HCV. É importante ressaltar que estudos sobre genotipagem do HCV em indivíduos com doenças reumáticas são raros.

No presente estudo houve uma frequência baixa de positividade para o FAN nos pacientes com genótipo 1 e genótipo 3. Não havendo significância estatística entre os pacientes com genótipo 1 e 3.

É possível que o predomínio do genótipo 1 nesta população possa ter implicações clínico-terapêuticas, visto que este genótipo tem sido associado à menor resposta à terapia antiviral (BRUNO et al.1997), o que não foi avaliado neste estudo, pois apesar de (88.2%), dos pacientes serem genótipo 1 todos estavam em fase de reconfirmação diagnóstica seja pré- tratamento.

Agnello et al. (1998) acreditam que a infecção persistente nessa doença poderia ser devida à baixa percentagem de replicação viral nos hepatócitos. Esses autores usaram nova técnica de hibridização in situ para detectar VHC RNA, seis vezes mais específica do que a do RT-PCR. Concluem que a extensão da infecção hepatocítica varia inversamente ao índice de atividade histológica (IAH), ou seja, quando esta for mínima, aquela será máxima. No entanto, nesses casos, a concentração de VHC nos hepatócitos será muito baixa. Esses achados levam à hipótese de que a infecção persistente no fígado pode ser causada, ao menos em parte, por essa mesma baixa replicação viral (AGMON-LEVIN et al., 2009).

7 CONCLUSÕES

- O padrão dos auto-anticorpos contra antígenos celulares encontrados nos dois grupos estudados; foi o citoplasmático,
- A prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares no grupo com infecção pelo VHC foi significativamente maior do que no grupo controle;
- Nos resultados de FAN citoplasmático há uma maior prevalência da negatividade, em pacientes infectados pelo HCV, e não infectados sendo essa diferença estatisticamente significativa, conferindo a não associação entre positividade de FAN citoplasmático e infecção pelo HCV;
- Os resultados negativos do FAN citoplasmático entre os genótipos virais é superior aos positivos em ambos os genótipos virais, entretanto esta diferença não é estatisticamente significativa;
- Houve diferença entre a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares entre o grupo infectado com VHC e o grupo dos não infectado;
- Não houve diferença entre a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares entre o grupo infectado com VHC e o grupo dos não infectado, com relação ao gênero, onde predominou o gênero masculino, nos dois grupos;
- É possível que o predomínio do genótipo 1 nesta população possa ter implicações clínico-terapêuticas, visto que este genótipo tem sido associado à menor resposta à terapia antiviral, o que não foi avaliado neste estudo, pois os pacientes estavam em fase pré tratamento, sugerindo que estes pacientes sejam avaliados futuramente;
- A formação dos auto-anticorpos parece ser mais uma consequência do que uma causa da agressão hepática;
- A negatividade do FAN – Hep 2 foi maior que a positividade, mas todos os FAN positivos pertenciam ao genótipo viral tipo 1 nos pacientes infectados pelo HCV;
- Nesta pesquisa os resultados de PCR, o RNA-HCV de reconfirmação foi positivo para o anti-HCV em todos os soros analisados, mostrando, assim, que estes pacientes eram portadores de infecção por vírus C, ou seja, não houve falso positivo anteriormente, porém todos eram assintomáticos dificultando a conclusão de ser ou não uma infecção persistente.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 423-443.

AGMON-LEVIN, N. et al. Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases. **J Autoimmun.**, v. 32, n. 3-4, p. 261-6, May/Jun. 2009.

AGNELLO, V. et al. Detection of widespread hepatocyte infection in chronic hepatitis C. **Hepatology.**, v. 28, n. 2, p. 573-84, Aug. 1998.

ALMEIDA, C. M. C. G. **Alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite c crônica**. 2010. 91f. Tese (Odontologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ALMEIDA, P. R. L. et al. Estudo clínico, laboratorial e histológico em doadores de sangue anti-HVC positivos. **GED gastroenterol. endosc. DIG.**, v. 18, n. 3, p. 85-90, maio/jun. 1999.

ALTER, M. J. et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B hepatitis study team. **N Engl J Med.**, v. 327, n. 27, p. 1899-905, Dec. 1992.

ALTER, M. J. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. **N Engl J Med.**, v. 341, n. 8, p. 556-62, Aug. 1999.

ALTER, M. J: Epidemiology of hepatitis C in the West. **Semin Liver Dis.**, v. 15, n. 1, p. 5-14, Feb. 1995. Review.

ALTER, M. J: Epidemiology of viral hepatitis C infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 17, p. 2436-41, 2007.

ANDRADE, L. E. C: Como valorizar os resultados de teste de FAN (anticorpos antinúcleo) e suas diferentes metodologias. **Sinopses em Reumatologia.**, v. 4, p. 3-9, Feb. 2002.

ARGOV, S. et al. Autoantibody production by patients infected with Leishmania. **Clin Exp Immunol.**, v. 76, n. 2, p. 190-7, May. 1989.

AUGUSTO, F.; LOBATO, C. Hepatite C. IN: COTTER, J (Ed.). **HEPATITIS VÍRICAS**. [S.L]: Núcleo de Gastroenterologia dos Hospitais Distritais, 2003.

BARBARO, G. Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings. **Am J Gastroenterol.**, v. 94, n. 8, p. 2198-205, Aug. 1999.

BARBOSA, V. S.; SILVA, N. A.; MARTINS, R. M. B. Soroprevalência e genótipos do vírus da hepatite C em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) em Goiânia, Brasil. **Rev. bras. Reumatol.**, v. 45, n. 4, p. 201-205, jul./ago. 2005.

BASSIT, L. et al. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. **Hepatology**, v. 29, p. 994-5, 1999 apud RIBEIRO, L. S. et al. Fibromialgia e infecção crônica pelo vírus da hepatite C: ausência de associação em duas amostras. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n.2, pp. 97-105, 2007.

BASSIT, L.; SANTOS, G. R.; SILVA, L. C. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. **Hepatology**, v. 29, p. 994-5, 1999.

BICHARA, C. N. C. **Prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em pacientes co-infetados HIV-Hanseníase**. Belém. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

BLOCK, M.; SCHIANO, F. D. Management of overlap syndromes. In: DECKER, M. (Ed.). **Management of liver disease**. New York, 1999. p. 170-177.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução 196/96**. Aprova Diretrizes e Normas Regulamentadoras Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias**: Guia de bolso. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais**: o Brasil está atento. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

_____. **Hepatites virais**: o Brasil está atento. 2.ed. Brasília, 2005a. 40p.

_____. **Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais**: Manual de aconselhamento em hepatites virais. Brasília, 2005b. 52p.

BROWN, R. S. et al. hepatite C (VHC), sendo considerado o agente etiológico de 95% das hepatites não-A e não-B. **J Med Virol.**, v. 45, p.151-155, 1995.

BRUNO, S. et al: Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. **Hepatology**, v. 25, p. 754-8, 1997.

CACOUB, P. et al: Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 10, p. 2204-12, Oct. 1999.

CATALAN-SOARES, B. C., PROIETTI, F. A., CARNEIRO-PROIETTI, F.A., Vírus linfotrópicos Humanos: Infecção, Doença e Prevenção. In: COUTO, J. C. F. **Infecções perinatais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 279-292.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, Apr. 1989 apud RIBEIRO, L. S. et al. Fibromialgia e infecção crônica pelo vírus da hepatite C: ausência de associação em duas amostras. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 47, n.2, p. 97-105, 2007.

CLEMENTE, C. M.; ONO-NITA, S. Hepatites virais agudas. In: LOPES, A. C. (Ed.). **Diagóstico e tratamento**. Barueri, SP: Manole, 2007. v. 3, cap. 14.

CODES, L.; JESUS, R. S.; CUNHA, S.; CRUZ, M.; PARANÁ, R. Frequência e implicações dos auto-anticorpos em hepatites agudas virais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 5, p. 465-469, set.-out. 2002.

CONTE, V. P., Hepatite crônica por vírus C. Part 1. Considerações gerais. **Arq. Gastroenterol.**, v. 37, n. 3, p. 187-194. 2000.

De LARANAGA, G. F. et al. High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. **Lupus**, v. 9, n. 8, p. 594-600, 2000.

DELAPORTE, E. et al. High level of hepatitis C endemicity in Gabon, equatorial Africa. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 87, n. 6, p. 636-7, Nov./Dec. 1993.

DELLAVANCE, A. et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 207-216, 2002.

_____. II Consenso Brasileiro de Fator Anti- nuclear em Células Hep-2. Definições para a padronização da pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN Hep-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 43, n. 3, p. 129-40, maio/jun., 2003.

_____. III Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 49, n. 2, p. 89-109., nov. 2009.

FERREIRA, C. T. SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Rev. bras. epidemiol.**, v.7, n.4, p. 473-487, dez. 2004.

FIALLO, P. et al. β 2-glycoprotein I dependence of anticardiolipin antibodies in multibacillary leprosy patients. **Lepr Rev.**, v. 69, n. 4, p. 376-81, Dec. 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M., Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina (Ribeirao Preto)**, v. 32, n. 1, p. 15-20, jan./mar. 1999.

FOCACCIA, R.; BARALDO, D. C. M.; FERRAZ, M. L. G. et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v. 8, n. 5, p. 348-355. 2004.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Infectious immunological tolerance. **Immunology**, v. 21, n. 6, p. 903-14, Dec. 1971.

GIST, N. R.; BELL, E. J. A six years study of coxsakievirus B in heart disease. **Journal of Hygiene**, v. 73, p. 165-171, 1974.

GORDON, S. C. et al. The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs intravenous drug use. **Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 1338-43, Dec. 1993.

GORDON, S. C.; BAYATI, N.; SILVERMAN, A. L. Clinical outcome of hepatitis C as a function of mode of transmission. **Hepatology**, v. 28, n. 2, p. 562-7. Aug. 1998.

GRANEL, B. et al. Crossing of antinuclear antibodies and anti-leishmania antibodies. **Lupus**, v. 9, n. 7, p. 548-50, 2000.

HAYDON, G. H. et al. Clinical significance of intrahepatic hepatitis C virus levels in patients with chronic HVC infection. **Gut**, v. 42, n. 4, p. 570-5, Apr. 1998.

HIRANUMA, K. et al. Hepatitis V viral particle detected by immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol**, v. 75, p. 1755-60. 1994 apud CONTE, V. P., Hepatite crônica por vírus C. Part 1. Considerações gerais. **Arq. Gastroenterol.**, v. 37, n. 3, p. 187-194. 2000.

HOJNIK, M. et al. Anticardiolipin antibodies in infections are heterogenous in their dependency on β 2-glycoprotein I: analysis of anticardiolipin antibodies in leprosy. **Lupus**, v. 3, p. 515-521, 1994.

HORIMOTO, A. M. C., COSTA, I. P. Frequency of autoantibodies and serum complement levels in patients with visceral or cutaneous leishmaniasis **Bras J Rheumatol**;49(5):529-46; 2009.

KARMOCHKINE, M. et al. Modes de transmission du virus de l'hepatite C. **Presse Med.**, v. 27, p. 871-6, 1998 apud CONTE, V. P., Hepatite crônica por vírus C. Part 1. Considerações gerais. **Arq. Gastroenterol.**, v. 37, n. 3, p. 187-194. 2000.

KENNY-WALSH, E. The Irish Hepatology Research Group. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. **N Engl J Med.**, v. 340, p. 1228-33, 1999.

KERR, G. S. et al. Prevalence of hepatitis C virus associated cryoglobulinemia at a Veterans Hospital. **J Rheumatol.**, v. 24, n. 11, p. 2134-8, Nov. 1997.

KILLENBERG, P. G. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. **Semin Gastrointest Dis.**, v. 11, n. 2, p. 62-8, Apr. 2000.

KIVITY, S. et al. Infections and autoimmunity--friends or foes? **Trends Immunol.**, v. 30, n. 8, p. 409-14, Aug. 2009.

LAUER, G. M.; WALKER, B. D. Hepatitis C Virus Infection. **N Engl J Med.**, v. 345, p. 41-52 2001 apud SOUZA, J. F. **Infecção pelo vírus da hepatite C em receptores de transplante renal e em pacientes com insuficiência renal crônica em diálise: estudo comparativo da prevalência, distribuição genotípica e marcadores bioquímicos de doença hepática.** 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2007.

L'EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL), Paris. Conférence Internationale de Consensus sur L'hépatite C. Conclusions. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 23, p. 730-5. 1999.

- LOIZOU, S. et al. Anticardiolipin, anti-beta(2)-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. **Ann Rheum Dis.**, v. 62, n. 11, p. 1106-11, Nov. 2003.
- LOPES, S. M. O. **Abordagem diagnóstica do carcinoma hepatocelular**. 2010. 50 f. Dissertação (Mestrado em Integrado em Medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2010.
- LOPEZ, S. I.; SEIA, J.; ROY, A. Anti-actin antibodies in acute viral hepatitis A in children. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v. 28, p. 261-264, 1998.
- LOVY, M. R.; STARKEBAUM, G.; UBEROI, S. Hepatitis C infection presenting with rheumatic manifestations: a mimic of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.**, v. 23, n. 6, p. 979-83. Jun. 1996.
- MALOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat Immunol.**, v. 2, n. 9, p. 816-22, Sep. 2001. Review.
- MARKIN, R. S. Manifestations of Epstein-Barr virus associated disorders in liver. **Liver**, v. 14, n. 1, p. 1-13. Feb. 1994.
- McADAM, K. P. W. J.; MUDD, D.; SHOENFELD, Y. Autoantibodies to DNA in leprosy: antigenic similarities between DNA and mycobacterial phospholipids defined by human monoclonal antibodies. **Int J Lepr Suppl.**, v. 52, p: 697, 1984.
- McFARLONE, I. G. et al. Hepatitis C auto-antibodies in chronic active hepatitis. **Lancet**, v. 335, p. 754-757, 1990.
- MUTIMER, D. J. et al. Hepatitis C virus infection in the asymptomatic British blood donor. **J Viral Hepat.**, v. 2, n. 1, p. 47-53, 1995.
- NIWA, Y. et al. Transient autoantibodies with elevated complement levels in common viral diseases. **J Clin Lab Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 183-8. Apr. 1984.
- OLIVEIRA, M. L. A. et al.. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Braz J Med Biol Res.**, v. 32, n. 3, p. 279-82, Mar. 1999.
- OSSADRON, A. et al. Leishmania in systemic lupus erythematosus mimicking an exacerbation. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 24, n. 2, p. 186-90, Mar-Apr. 2006.
- PASSALEVA, A.; MASSAI, G.; LEONCINI, F. Acute viral hepatitis in the Florence área: II Immunologic study. **Bolletino dell' Istituto Sieroterapico Milanese**, v. 62, p. 224-237, 1983.
- PERLEMUTER, G. et al. Hepatitis C virus (HCV) infection and Systemic Lupus Erythematosus (SLE). **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. S114, 2000.
- PERPERAS, A.; MCFARLANE, B. M.; MCSORLEY, C. G. Species cross reactivity of anti LSP antibodies in acute viral hepatitis. **Journal of Clinical and Laboratory Immunology**, v. 19, p. 25-30, 1986.

PORDEUS, V. et al. Infections and autoimmunity: a panorama. **Clin Rev Allergy Immunol.**, v. 34, n. 3, p. 283-99, Jun. 2008. Review.

RAMOS-CASALS, M. et al. Systemic autoimmune diseases in patients with hepatitis C virus infection: characterization of 1020 cases (The HISPAMEC Registry). **J Rheumatol.**, v. 36, n. 7, p. 1442-8. Jul. 2009.

RESENDE, V. L. S. et al. Hepatites Virais na Prática Odontológica: Riscos e Prevenção. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v. 10, n. 2, p. 317-323, maio/ago. 2010.

RIBEIRO, L. S. et al. Fibromialgia e infecção crônica pelo vírus da hepatite C: ausência de associação em duas amostras. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 47, n.2, p. 97-105, 2007.

RIBEIRO, L. S.; PROIETTI, F. A. Fibromialgia e estresse infeccioso: possíveis associações entre a síndrome de fibromialgia e infecções viróticas crônicas. **Rev. bras. Reumatol.**, v. 45, n. 1, p. 20-29, jan./fev. 2005.

RIBEIRO, L. S.; PROIETTI, F. A. Interrelations between fibromyalgia, thyroid autoantibodies, and depression. **J Rheumatol.**, v. 31, n. 10, p. 2036-40, Oct. 2004.

SAADE, J. **Utilização da espectroscopia Raman no infravermelho próximo para estudo diagnóstico da hepatite C em soro sanguíneo humano.** 2008, 76 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. São José dos Campos, 2008.

SAKKAS, L. I. et al. Immunological features of visceral leishmaniasis may mimic systemic lupus erythematosus. **Clin Biochem.**, v. 41, n. 1-2, p. 65-8. Jan. 2008.

SANTOS, A. C. O. **Determinação do RNA – VHL no sêmen de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C.** 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SEEF, L. B. et al. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. **N Engl J Med.**, v. 327, n. 27, p. 1906-11. Dec. 1992.

SHOENFELD, Y. et al. Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantibodies react with Mycobacterium tuberculosis. **Clin Exp Immunol.**, v. 66, n. 2, p. 255-61, Nov. 1986.

SHOENFELD, Y.; ROSE, N. R. **Infection and autoimmunity.** Amsterdam: Elsevier, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. **Relatório do Grupo de Estudos da Sociedade Brasileira de Hepatologia.** Epidemiologia da infecção pelo vírus da Hepatite C no Brasil. 2005. Disponível em: <<http://www.sbhepatologia.org.br/>>. Acesso em: 26 ago. 2010.

STAUB, H. L. Vírus C da hepatite, manifestações sistêmicas e o reumatologista. **Rev Bras Reumatol.**, v. 38, p. 139-46, 1998.

STRAUS, E. Hepatite C Rev. Soc. **Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 1, p. 69-82, 2001.

TREMOLADA, F. et al. Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. **J Hepatol.** v. 16, n. 3, p. 273-81, Nov. 1992.

TRINDADE, C. M. **Identificação do comportamento das hepatites virais a partir da exploração de base de dados de saúde pública.** 2005. 141 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2005.

VOULGARI, P. V. et al. Visceral leishmaniasis resembling systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis.**, v. 63, n. 10, p. 1348-9, Oct. 2004.

WENER, M. H. et al. Hepatitis C virus and rheumatic disease. **J Rheumatol.**, v. 23, n. 6, p. 953-9, Jun. 1996. Review.

ZANDMAN-GODDARD, G.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y. Antiphospholipid antibodies and infections-drugs. In: ASHERSON, R. A.; CERVERA, R.; PIETTE, J. C.; SHOENFELD, Y. (Ed.) **The antiphospholipid syndrome II.** Amsterdam: Elsevier Science, 2002. p. 343-360.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para fazer parte de uma pesquisa, que está sendo desenvolvida pela Universidade Federal do Pará, no Núcleo de Medicina Tropical intitulada, AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES E SUA CORRELAÇÃO COM O GENÓTIPO VIRAL EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV).

O Objetivo da pesquisa é fazer uma correlação do anticorpo antinúcleo (FAN) e o genótipo viral em pacientes com hepatite C e o estágio da doença hepática a partir da histologia, sempre que permitidos, e correlacionar ao diagnóstico.

Caso você participe da pesquisa será necessário que forneça uma amostra de sangue (2ml)

O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor provocada pela agulha na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos;

Essa pesquisa não oferece riscos; as práticas são de uso rotineiro e serão utilizados materiais esterilizados e descartáveis, como agulhas, seringas, etc.

Está garantido a você todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa a qualquer momento

As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou qualquer outro meio, isto será feito de forma codificada, para manter o caráter confidencial;

Todas as despesas necessárias para a realização do estudo não são de sua responsabilidade, assim como a sua participação na pesquisa não será remunerada, (você não receberá qualquer valor em dinheiro);

Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código.

Assinatura do Pesquisador Responsável

Nome: Ana Maria Almeida Souza
End: Rodovia Mário Covas, 1426 –
Cond. Green Garden, casa 41
Fone: (91) 32352665 / 81197217
Reg. Conselho: CRM 1508

APÊNDICE B - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ___/___/___

Assinatura do sujeito da pesquisa ou do
responsável

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Protocolo: N°050/2009-CEP/NMT
2. Projeto de Pesquisa: CORRELAÇÃO DO ANTICORPO ANTINÚCLEO(FAN) E O GENÓTIPO VIRAL EM PACIENTES COM HEPATITE C.
3. Pesquisador Responsável: Ana Maria Almeida Souza.
4. Instituição / Unidade: NMT/UFPA.
5. Data de Entrada: 1º/12/2009.
6. Data do Parecer: 07/04/2010.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**


Prof^o Telichio Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.