



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Envolvimento de diferentes subpopulações de células T e células NK na resposta imune à infecção pelo vírus da hepatite C

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Artur Paiva (Centro de Histocompatibilidade do Centro), da Professora Doutora Paula Luxo (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Paula Morais (Universidade de Coimbra).

Sílvia Marise de Jesus Andrade

2012

“ O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário ”

Albert Einstein

Agradecimentos

O trabalho experimental desenvolvido e do qual resultou esta tese foi realizado no Centro de Histocompatibilidade do Centro. Assim, ao terminar este trabalho gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de forma directa ou indirecta para a sua elaboração.

Agradeço ao Professor Doutor Artur Paiva e à Professora Doutora Paula Cristina Luxo, meus orientadores, por me terem dado esta oportunidade, o meu mais sincero agradecimento por todo o apoio, disponibilidade, compreensão, orientação científica, pedagógica e análise crítica desta tese.

Agradeço, à Professora Doutora Paula Morais pode ter aceitado ser minha orientadora interna, por toda ajuda e disponibilidade.

Agradeço de forma especial à Dra. Maria Luísa Pais, directora do Centro de Histocompatibilidade do Centro, por ter consentido a realização do meu estágio.

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte do Centro de Histocompatibilidade do Centro pelo seu apoio e incentivo, principalmente às do laboratório de citometria de fluxo.

Agradeço, por ordem alfabética, à Cláudia, Mariana, Sara e Vanessa, pela amizade nos bons e maus momentos, pelo carinho, pela paciência, pela constante disponibilidade para ajudar, aconselhar e esclarecer as minhas dúvidas. Os dias passados na biblioteca e no laboratório estarão sempre no meu coração.

Agradeço às minhas amigas e colegas de faculdade, Ana Cristina Henriques, Andreia Lamaroso, Diana Carvalho, Joana Neves, Letícia Costa e Mariline Gameiro. Obrigado por todos os momentos que passamos ao longo destes anos, pela amizade, por estarem ao meu lado quando mais precisei.

Agradeço aos meus futuros sogros, Helena Maia e Carlos Lourenço, por todo o apoio e carinho que me dão desde que nos conhecemos. Muito obrigado por me tratarem como vossa filha.

Agradeço às minhas avós, Maria Augusta e Gracinda, pelo seu amor e auxílio ao longo destes anos.

Agradeço aos meus tios, Cina e Sérgio, aos meus primos, Liana, Zé, Sérgio, Raquel, Salvador e à minha afilhada, Laura, que apesar de pequenina já nos fez passar bons momentos. Obrigado pela amizade, afecto e companhia.

Agradeço aos meus amigos Zé e Leonor, família Travassos e família Silva por toda a amizade e carinho.

Agradeço aos meus pais, Amélia Jesus e Manuel Andrade, que sem eles nada disto era possível. A pessoa que sou hoje deve-se a vocês, que sempre me incentivaram a perseguir os meus sonhos, sempre acreditaram em mim, estiveram sempre ao meu lado e sei que poderei sempre contar com vocês. Obrigado por toda a ajuda, compreensão, carinho, ternura, amor incondicional e apoio infinito manifestado ao longo de toda a vida. Peço desculpa se algum dia não compreenderam as minhas opções mas espero que percebam e se orgulhem disso.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao Fábio Lourenço, meu namorado, meu amigo e companheiro. Desde que te conheci a minha vida mudou, sinto-me a pessoa mais feliz do mundo, és o amor da minha vida, sei que estás e estarás sempre comigo nos bons e maus momentos. Obrigado pela paciência, dedicação, ternura, amor, amizade e ajuda que foram preciosas para a finalização deste trabalho.

As palavras serão sempre poucas para demonstrar o meu sincero agradecimento, por isso, mais uma vez obrigado a todos!

Índice Geral

Agradecimentos.....	ii	
Índice Geral	iv	
Índice de figuras	vii	
Índice de tabelas.....	viii	
Abreviaturas	ix	
Resumo.....	xi	
Abstract	xii	
Capítulo 1	Introdução	1
<i>Hepatite C</i>	2	
Diagnóstico	3	
Epidemiologia	4	
Classificação e Organização do vírus da hepatite c.....	5	
Proteínas estruturais.....	7	
Péptido p7	7	
Proteínas não-estruturais.....	8	
Replicação do VHC	9	
Diversidade genética.....	11	
Genótipos.....	11	
<i>Quasispecies</i>	12	
Transmissão do vírus da hepatite C	13	
Tratamento da hepatite C crónica	13	
Factores que influenciam a resposta a terapia	16	
Perspectivas futuras para o tratamento	16	
Co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida	17	
<i>Sistema Imunitário</i>	17	
Resposta imune	18	
Resposta imune inata ou natural	18	
Resposta imune adquirida ou adaptativa	20	
Órgãos linfóides	20	
Órgãos linfóides primários	21	
Órgãos linfóides secundários	21	
Células do sistema imunitário.....	22	
Células linfóides ou linfócitos.....	24	
Monócitos, macrófagos e células dendríticas	24	

Granulócitos	25
Linfócitos T	25
Maturação dos linfócitos T	26
Origem da diversidade dos linfócitos T	27
Activação dos linfócitos T	28
Processo de diferenciação dos linfócitos T	28
A. Diferenciação e função de linfócitos T CD4+	29
B. Diferenciação e função de linfócitos T CD8 ⁺	30
C. Diferenciação e função de linfócitos T $\gamma\delta$	31
Células NK	32
Células NKT	33
<i>Resposta imune à infecção pelo VHC.....</i>	<i>33</i>
<i>Terapia de combinação de peg-IFN-α e ribavirina e associação à resposta imune</i>	<i>36</i>
<i>Citometria de fluxo</i>	<i>37</i>
Princípios da técnica	37
Capítulo 2	Objectivos
	39
Capítulo 3	Materiais e Métodos.....
	41
<i>População em estudo</i>	<i>42</i>
<i>Material biológico.....</i>	<i>42</i>
<i>Imunofenotipagem</i>	<i>43</i>
<i>Avaliação do perfil citotóxico.....</i>	<i>44</i>
<i>Avaliação da produção de citocinas</i>	<i>44</i>
Activação dos linfócitos	44
Marcação intra-citoplasmática das citocinas.....	45
<i>Aquisição das amostras por citometria de fluxo.....</i>	<i>46</i>
<i>Análise dos resultados</i>	<i>46</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>46</i>
Capítulo 4	Resultados
	47
<i>Quantificação de linfócitos T e das suas subpopulações do sangue periférico.....</i>	<i>48</i>
<i>Quantificação de células NK e das suas subpopulações do sangue periférico</i>	<i>49</i>
<i>Avaliação do perfil citotóxico das subpopulações de linfócitos T</i>	<i>49</i>
<i>Avaliação do perfil citotóxico das subpopulações das células NK</i>	<i>50</i>

<i>Frequência de células T produtoras de citocinas e quantidade de citocina por célula</i>	<i>55</i>
<i>Frequência de células NK produtoras de citocinas e quantidade de citocinas por célula</i>	<i>58</i>
Capítulo 5	Discussão
<i>Quantificação de linfócitos T e das suas subpopulações do sangue periférico.....</i>	<i>61</i>
<i>Quantificação de células NK e das suas subpopulações do sangue periférico</i>	<i>64</i>
<i>Avaliação do perfil citotóxico das subpopulações de linfócitos T</i>	<i>65</i>
<i>Avaliação do perfil citotóxico das subpopulações das células NK</i>	<i>66</i>
<i>Frequência de células T produtoras de citocinas e quantidade de citocina por célula</i>	<i>68</i>
<i>Frequência de células NK produtoras de citocinas e quantidade de citocinas por célula</i>	<i>69</i>
<i>Comparação da resposta imune entre doentes respondedores à terapia e doentes não respondedores</i>	<i>70</i>
Capítulo 6	Conclusões
Capítulo 7	Referências bibliográficas
	71
	73

Índice de figuras

Figura 1. Visão geral sobre a história natural da infecção por VHC (adaptado de Chen S e Morgan T, 2006).	3
Figura 2. Estimativa da prevalência global do vírus da hepatite C (adaptado de WHO, 2007).	5
Figura 3: Representação esquemática do vírus da hepatite C (adaptado de http://livercancerprognosiscenter.com/wp-content/uploads/2011/10/HCV_structure1.png).	6
Figura 4: Estrutura do genoma do VHC e a ORF que codifica os genes estruturais e não -estruturais.....	6
Figura 5. Representação esquemática do ciclo de replicação do VHC.....	10
Figura 6. Respostas virológicas ao tratamento da hepatite C (Feld J e Hoofnagle J, 2005).....	15
Figura 7. Revisão simplificada da hematopoiese (Gerrits <i>et al.</i> , 2008).	23
Figura 8. Representação esquemática da resposta imunidade adaptativa específica para o Vírus da Hepatite C.....	36
Figura 9. Representação esquemática do sistema óptico do citômetro de fluxo (adaptado de http://www.biology.sjsu.edu/specialprogs/floicyto/html/fc-p03.html).....	38
Figura 10. Frequência de células T produtoras de IFN- γ e quantidade desta citocina por célula, após estimulação <i>in vitro</i> com PMA/ionomicina na presença de brefeldina A.	56
Figura 11. Frequência de células T produtoras de TNF- α e quantidade desta citocina por célula, após estimulação <i>in vitro</i> com PMA/ionomicina na presença de brefeldina A.	57
Figura 12. Frequência de células NK produtoras de citocinas e quantidade de citocinas por célula, após estimulação <i>in vitro</i> com PMA/ionomicina na presença de brefeldina A.	59

Índice de tabelas

Tabela I. Marcação utilizada para o estudo fenotípico dos linfócitos.	43
Tabela II. Marcação utilizada na avaliação da produção de citocinas pelos linfócitos.	45
Tabela III. Percentagem (%) e valor absoluto (Células/ μ L) de linfócitos T (LT) e das suas subpopulações, no sangue periférico, no grupo controlo e nos doentes ao longo do tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.	51
Tabela IV. Percentagem (%) e valor absoluto (Células/ μ L) de células NK e das suas subpopulações, no sangue periférico, no grupo controlo e no grupo de doentes durante o tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.	52
Tabela V. Perfil citotóxico das subpopulações de linfócitos T (LT), no sangue periférico, no grupo controlo e nos doentes ao longo do tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.	53
Tabela VI. Perfil citotóxico das células NK e das suas subpopulações, no sangue periférico, no grupo controlo e no grupo dos doentes ao longo do tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.	54

Abreviaturas

ADCC – *antibody dependent cell cytotoxicity*
ALT – alanina aminotransferase
APC – *allophycocyanin*
APCs – células apresentadoras de antígenos
BCR – receptor de células B
CD – *cluster of differentiation*
CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
CLDN – claudina
CLP – células progenitoras linfóides
CMP – células progenitoras mielóides
CTL – linfócitos T citotóxicos
DC – células dendríticas
DN – duplos negativos
DNA – ácido desoxirribonucleico
DP – duplos positivos
ELISA – *enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FasL – ligando do Fas
FITC – *fluorescein isothiocyanate*
FSC – *Forward Scatter*
GAGs – glicosaminoglicanos
HC – hepatite c crónica
HCC – carcinoma hepatocelular
HSC – células estaminais hematopoiéticas
HVR – região hipervariável
IFN (s) – interferão(ões)
IL – interleucina
IMPDH – inosina monofosfato desidrogenase
Kb – kilobases
KIR – *killer cell immunoglobulin like- receptor*
LDLs – lipoproteínas de baixa densidade
LDLRs – receptores de lipoproteínas de baixa densidade
LB – linfócitos B
LT – linfócitos T
LTreg – linfócitos T reguladores

mAb – anticorpos monoclonais
MHC – complexo *major* de histocompatibilidade
MIF – média de intensidade de fluorescência das células produtoras, ou seja, a quantidade de proteína produzida por célula
NK – natural *killer*
NKT – natural *killer* T
Nm – nanômetros
NS – não – estuturais
OCLN – ocludina
ORF – *open reading frame*
PB – *pacific blue*
PBS – tampão fosfato salino
PC7 – *phycoerythrin-Cyanine 7*
PE – *phycoerythrin*
PerCp 5.5 – *peridin chlorophyll protein cy 5.5*
Peg-IFN- α – interferão- α peguilado
PMA – *phorbol 12-myristate 13 acetate*
PMT – tubos fotomultiplicadores
PO – *pacific orange*
RE – retículo endoplasmático
RIBA – *recombinant Immunoblotting Assays*
Ribavirina – 1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4 triazole-3-carboxamida
RT-PCR – *reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
RNA – ácido ribonucleico
SR-B1 – receptor scavenger classe B tipo I
SSC – *side Scatter*
Th – T *helper*
TMA – *transcription Mediated Amplification*
TNF – fator de necrose tumoral
UTR – regiões não-traduzidas
VHC – vírus da hepatite C
VIH – vírus da imunodeficiência adquirida
VLDL – lipoproteínas de muita baixa densidade
VS – versus
WHO – organização mundial de saúde

Resumo

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é um problema global de saúde pública e uma potencial causa de morbidade e mortalidade dos doentes. Desde da sua descoberta em 1989, o VHC tem sido reconhecido como uma das principais causas de doença hepática crónica no mundo.

O VHC pode escapar às defesas do sistema imunitário, afectando negativamente a resposta imune celular, incluindo a proliferação e activação das células NK, linfócitos T *helper* (LTh) e linfócitos T citotóxicos (CTL). Esta fuga permite ao vírus estabelecer infecção crónica, e a partir desta altura o seu controlo requer tratamento. A associação do interferão- α peguilado (peg-IFN- α) com ribavirina é o tratamento aprovado, conduzindo à erradicação viral em 42-82% dos doentes infectados com o VHC.

Dada a influência da resposta imune no controlo da infecção por VHC e na resposta ao tratamento, o objectivo principal deste trabalho foi caracterizar a resposta imune em doentes com infecção crónica por vírus da hepatite C, antes e ao longo do tratamento. Além disso, também se comparou as respostas imunes nos doentes respondedores à terapia e nos não respondedores, de modo a detectar um biomarcador preditivo da resposta à terapêutica. A resposta imune foi avaliada através de imunofenotipagem recorrendo à citometria de fluxo.

Nos doentes com infecção crónica verificou-se alterações na frequência, fenótipo e função dos linfócitos T (LT) e células NK, comparativamente ao grupo controlo. A terapia induziu um aumento da actividade citotóxica e um aumento da produção de citocinas nos LT e nas células NK.

Contudo como sabemos a terapia nem sempre é eficaz, sendo necessários mais estudos nesta área de modo a contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e se possível encontrar um biomarcador preditivo de resposta ao tratamento.

Palavras-chave: vírus da hepatite C, interferão-alfa peguilado e ribavirina, resposta imune, linfócitos T, células NK.

Abstract

Hepatitis c virus (HCV) infection continues to be a major global health problem and a potential cause of morbidity and mortality of patients. Since its discovery in 1989, HCV has been recognized as a major cause of chronic liver disease worldwide.

HCV can escape the immune system defenses, adversely affecting the immune response, including proliferation and activation of NK cells, helper T lymphocytes (Ly Th), and cytotoxic T lymphocytes (CTL). This breakout allows the virus to establish chronic infection, and from this time its control requires treatment. A combination of pegylated interferon-alpha (peg-IFN- α) and the synthetic nucleoside ribavirin is the standard of care for eradication of HCV, leading to eradication of viral 42-82% of patients infected with HCV.

Due to the influence of an immune response in the HCV infection control and in the response to treatment, the principal aim of this study was to characterize the immune response in patients with chronic hepatitis C virus before and during treatment.

In addition, we compared the immune responses in patients responsive to therapy and in non-responders, in order to detect a biomarker predictive of response to therapy. The immune response was evaluated by the immunophenotyping using flow cytometry.

In patients with chronic infection there are changes in frequency, the phenotype and function of T lymphocytes (Ly T) and NK cells, compared to the control group. The therapy induced an increase in cytotoxic activity and an increase in cytokine production in Ly T and NK cell.

However as we know the therapy is not always effective, more research is needed in this area to contribute to the development of new therapeutic approaches and if possible to find a predictive biomarker of response to treatment.

Keywords: hepatitis C virus, pegylated interferon-alpha and ribavirin, immune response, T lymphocytes, NK cells.

Capítulo 1

Introdução

HEPATITE C

A hepatite C é uma inflamação do fígado causada pelo vírus da hepatite C (VHC). Foi descrita em 1973 como uma hepatite associada a transfusões e não provocada pelo vírus da hepatite A ou pelo vírus da hepatite B, até 1989 quando o vírus da hepatite C foi identificado por técnicas de biologia molecular (Choo *et al.*, 1989). Desde a sua descoberta, o VHC tem sido reconhecido como uma das principais causas de doença hepática crónica no mundo inteiro.

A evolução clínica da hepatite C é variável, existindo muita controvérsia em torno da história natural da infecção pelo VHC.

Na maioria dos casos, os sintomas da infecção por hepatite C são assintomáticos. Os indivíduos infectados podem apresentar um sentimento generalizado de desânimo e cansaço, podendo envolver depressão mental, náuseas, vômitos, falta de apetite, urina escura e fezes claras, tom amarelado ao nível da pele (icterícia devido à acumulação de pigmentos biliares) bem como na parte branca do olho e dor na região superior direita do abdómen (onde o fígado está localizado) (Lerner K e Lerner B, 2003). No entanto, a maioria dos portadores, aproximadamente 75-85%, só percebe que está doente anos após a infecção, quando apresenta uma complicação grave de hepatite C crónica (HC). Surgindo muito raramente casos de hepatite fulminante.

A HC pode causar manifestações extra-hepáticas como crioglobulinemia mista e linfomas (Hodgkin e não – Hodgkin), entre outras.

Estima-se que 10-20 % dos doentes com HC desenvolvem cirrose nos primeiros 20 anos após a infecção. Além disso, indivíduos com cirrose têm um risco aumentado para desenvolver carcinoma hepatocelular (HCC) (Chen S e Morgan T, 2006).

Assim, a HC constitui um grave problema de saúde pública mundial, devido ao número de indivíduos infectados e às suas principais complicações conducentes à morte.

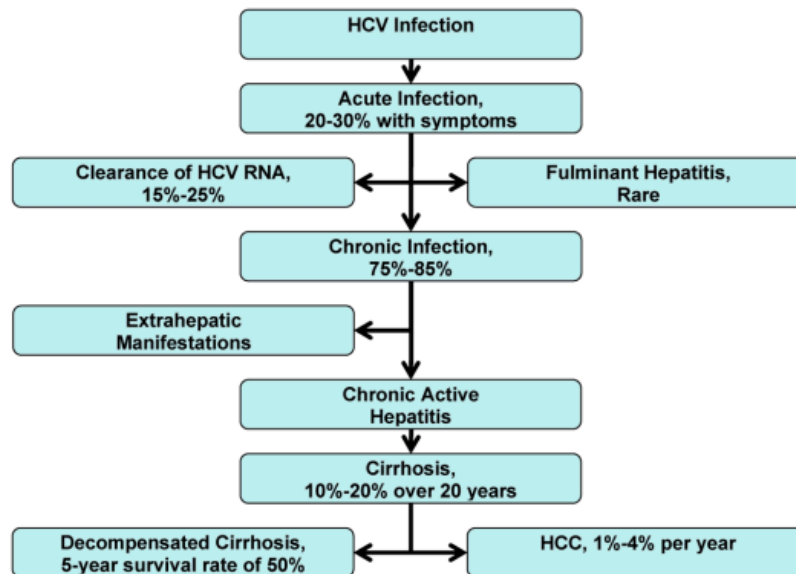


Figura 1. Visão geral sobre a história natural da infecção por VHC (adaptado de Chen S e Morgan T, 2006).

Diagnóstico

O diagnóstico desta infecção é realizado através de testes serológicos para a detecção de anticorpos anti-VHC, testes moleculares para quantificação do ácido ribonucleico (RNA) no soro e testes bioquímicos, para avaliação da função hepática pelo estudo das enzimas hepáticas.

Os testes serológicos mais usados são os testes imunoenzimáticos, nomeadamente os testes ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que se baseiam na detecção de anticorpos específicos dos vários antígenos do VHC. Estes testes apesar de serem extremamente sensíveis e específicos podem gerar falsos positivos e deste modo, foram desenvolvidos testes suplementares de confirmação. O mais utilizado é o RIBA (*Recombinant Immunoblotting Assays*) (Alter *et al.*, 2003).

Actualmente, a confirmação do diagnóstico de hepatite C realiza-se normalmente através da detecção do RNA do VHC no plasma do doente infectado, por testes moleculares. Estes testes moleculares podem ser qualitativos e quantitativos, sendo os mais utilizados, o RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*), TMA (*Transcription Mediated Amplification*) e técnica de amplificação do sinal (ácido

desoxirribonucleico (DNA) *branched*). Além de confirmar a presença do RNA do VHC, também determinam a carga viral em circulação, o que é muito importante na monitorização da resposta ao tratamento.

O estudo bioquímico das aminotransferases, principalmente da alanina aminotransferase (ALT), incide sobretudo na sua concentração, visto que níveis elevados estão associados a uma maior severidade da doença. Todavia este é um método inespecífico, existindo uma baixa correlação entre os níveis da ALT e a gravidade da doença, e o aparecimento de cirrose. Além disso, alguns autores já verificaram que em alguns doentes infectados com o VHC os valores da ALT podem ser normais (Strader *et al.*, 2004).

A biópsia hepática fornece informações sobre a severidade da doença, o grau de fibrose e avalia o nível de necrose e de inflamação. Este método é geralmente recomendado para avaliação inicial dos doentes com HC. Contudo, como apresenta algumas limitações, sendo as principais a variabilidade amostral e o número de efeitos adversos, já não é obrigatório a sua realização antes do tratamento (Poynard *et al.*, 2003).

Epidemiologia

A estimativa mais recente da organização mundial de saúde (WHO) sobre a prevalência da infecção pelo VHC é de 3%, representando 170 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (Figura 2). Os países africanos notificaram prevalências médias de 5,3 % enquanto as estimativas mais baixas surgem na Europa (1%) e nos Estados Unidos (1,7 %). O VHC é a principal causa de transplante hepático nestes países desenvolvidos (Brown R, 2005).

Em Portugal, a verdadeira prevalência não é conhecida, contudo os dados epidemiológicos existentes apontam para uma taxa de 1,5 %, ou seja, existirão cerca de 100 a 150 mil infectados (Marinho *et al.*, 2000).

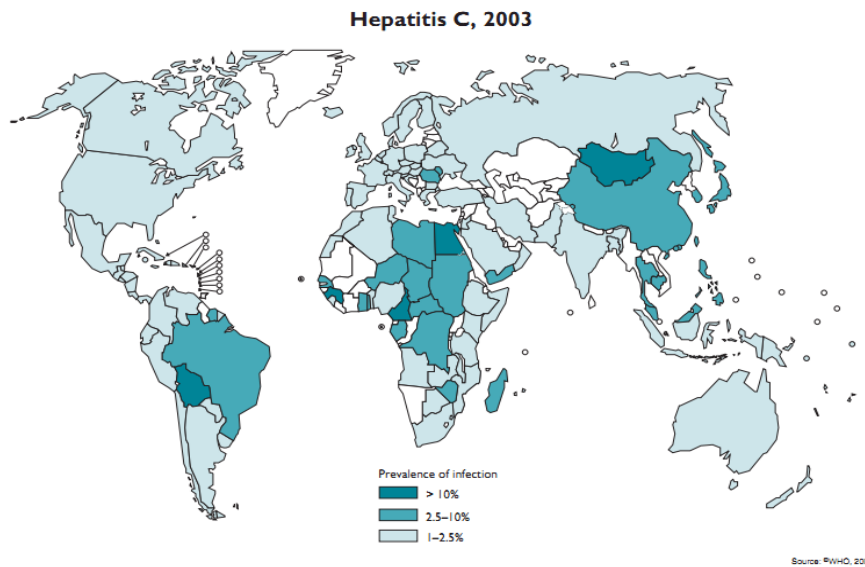


Figura 2. Estimativa da prevalência global do vírus da hepatite C (adaptado de WHO, 2007).

Classificação e Organização do vírus da hepatite c

O VHC foi identificado em 1989 sendo classificado no género *Hepacivirus* pertencente à família *Flaviviridae*. É um vírus hepatotrópico, sendo os hepatócitos os seus principais alvos celulares.

As partículas do VHC têm entre 40-60 nanómetros (nm) de diâmetro, forma esférica e existem sob forma de uma população heterogénea no sangue, reflectindo a sua associação a imunoglobulinas e lipoproteínas (lipoproteínas de baixa densidade - LDL e lipoproteínas de muita baixa densidade - VLDL) (Figura 3).

O VHC é um vírus envelopado e o seu genoma é constituído por uma única cadeia de RNA com polaridade positiva com 9,6 kilobases (kb) (Choo *et al.*, 1989).

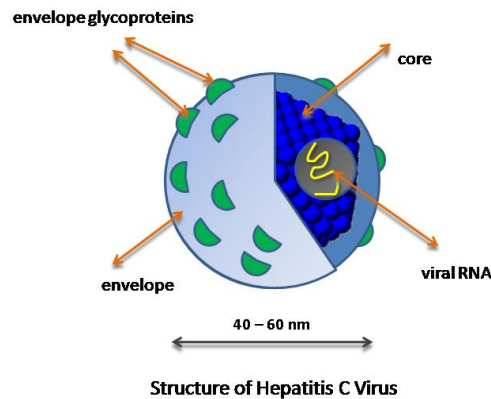


Figura 3: Representação esquemática do vírus da hepatite C (adaptado de http://livercancerprognosiscenter.com/wp-content/uploads/2011/10/HCV_structure1.png).

O genoma codifica uma única região passível de ser traduzida - *open reading frame* (ORF) e tem regiões muito conservadas não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3' (Figura 4), que desempenham um papel importante na tradução da poliproteína e replicação viral, respectivamente.

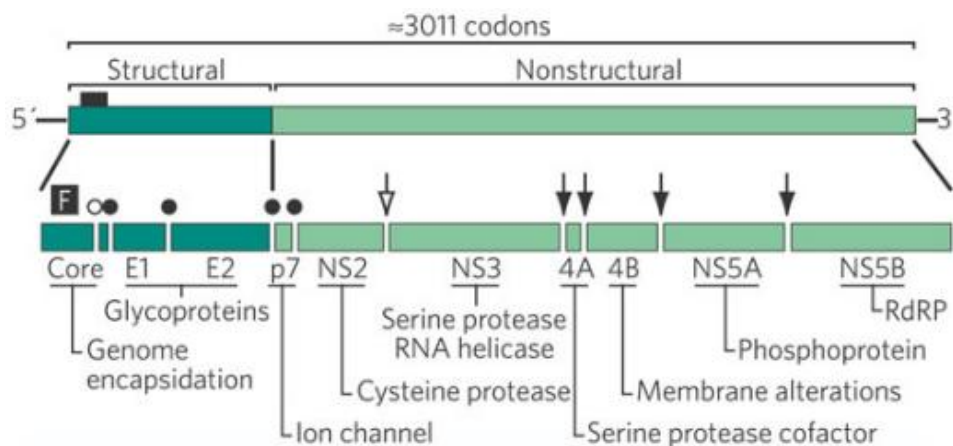


Figura 4: Estrutura do genoma do VHC e a ORF que codifica os genes estruturais e não - estruturais.

O processamento da poliproteína encontra-se na sequência abaixo. Os círculos referem-se a locais de clivagem pelas peptidases do hospedeiro. As setas referem-se aos locais de clivagem por proteases virais (adaptado de Lindenbach B e Rice C, 2005).

A região codificante codifica cerca de 3011 aminoácidos. Os genes que codificam a proteína do core e as proteínas do envelope E1 e E2, estão localizados na extremidade N-terminal. Por outro lado, os genes que codificam as proteínas não-estruturais (NS), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B, e o péptido p7 estão na extremidade C-terminal. As proteínas NS coordenam processos intracelulares do ciclo de vida do vírus (Lindenbach B e Rice C, 2005).

As proteínas estruturais são processadas por peptidases do hospedeiro, enquanto a clivagem das proteínas não estruturais é catalisada por proteases codificadas pelo VHC (Choo *et al.*, 1991).

Proteínas estruturais

A primeira proteína estrutural codificada pela ORF do VHC é a proteína da cápside (core), esta liga-se ao RNA genómico viral, condensa-o e forma a nucleocápside. A proteína do core é uma proteína α -helicoidal, citoplasmática, associada com as membranas do retículo endoplasmático (RE). Alguns estudos indicam que esta proteína pode estar envolvida na modulação de transcrição de genes, proliferação e também inibição da apoptose mediada pelos factores de necrose tumoral. Além disso, suprime as respostas imunitárias do hospedeiro em especial a formação de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos do vírus, desempenhando assim um importante papel no estabelecimento e manutenção da infecção pelo VHC (Meier V e Ramadori G, 2009).

De seguida são sintetizadas as proteínas do envelope do VHC a E1 e a E2. Estas são glicoproteínas de ligação à membrana formando um complexo, participam na formação das partículas infecciosas e são essenciais para a entrada e fusão do vírus (Sklan *et al.*, 2009).

Péptido p7

O pequeno péptido p7, assim denominado pelo seu peso molecular de 7 kDa, separa as proteínas estruturais das não estruturais. Pensa-se que a p7 funcionará como canal de iões, pertencente a família das viroporinas. A sua função na replicação ainda é

desconhecida, mas mostrou ser essencial na formação e libertação eficiente das partículas virais infecciosas (Meier V e Ramadori G, 2009).

Proteínas não-estruturais

A NS2/3 é a primeira proteína não estrutural a ser traduzida, sendo responsável pela auto-clivagem entre a NS2 e NS3. Estas duas proteínas podem-se agrupar e formar um complexo, que poderá favorecer a fixação da poliproteína num compartimento da membrana antes do processamento, podendo assim, esta interacção, ser importante para a formação do complexo de replicação.

A NS2 perde a sua actividade de proteinase após auto-clivagem a partir da NS3 e é degradada pelo proteossoma de uma forma dependente da fosforilação. Além disso, pode ter um papel na modulação da expressão dos genes celulares em células infectadas.

A NS3 é uma proteína grande, multifuncional associada a diversas actividades enzimáticas. Tem uma função pró-apoptótica pois promove a apoptose induzida pela caspase 8, ligando-se a esta e alterando a sua distribuição celular e possui ainda função de NTPase / helicase desempenhando um papel na replicação.

As proteínas NS4A e NS4B são provavelmente componentes do complexo replicase, a primeira é um cofactor da NS3 e a segunda parece estar envolvida na modulação da hiperfosforilação de NS5A (Meier V e Ramadori G, 2009).

A NS5A é uma proteína fosforilada, em múltiplos resíduos de serinas por cinases intracelulares, associada à membrana, podendo-se encontrar na forma hipofosforilada ou hiperfosforilada. Apesar de se saber que muitas proteínas intracelulares interagem com NS5A, a sua função ainda não é conhecida, apenas parece desempenhar um papel na resistência ao interferão (Sillanpaa *et al.*, 2009).

A NS5B codifica a RNA polimerase dependente do RNA, ou seja, catalisa a síntese de RNA usando um molde de RNA, constituindo assim um novo alvo para o desenvolvimento de anti-virais.

As interacções directas e indirectas das diferentes proteínas NS entre si são fundamentais para a organização do complexo replicativo funcional (Lindenbach B e Rice C, 2005).

Replicação do VHC

O ciclo de replicação do vírus da hepatite C ainda é pouco conhecido devido à ausência de um sistema de cultura de células eficaz que possibilite o estudo deste processo. No entanto julga-se que o vírus deverá entrar na célula por interacção com um receptor específico presente na membrana celular. Existem alguns receptores celulares que podem ser responsáveis pela ligação e subsequente entrada do VHC nos hepatócitos: o *cluster de differentiation* (CD) 81 (Zhang *et al.*, 2004), o receptor scavenger classe B tipo I (SR-B1 também chamado de CLA-1) (Scarselli *et al.*, 2002) e as proteínas das *tight junction* claudina 1 (CLDN1) (Evans *et al.*, 2007) e ocludina (OCLN) (Liu *et al.*, 2009).

O cluster CD81 está presente na superfície de muitos tipos celulares, incluindo as células do fígado e pode interagir com a proteína E2 do envelope viral. É uma tetraspanina com 25 kDa, constituída por 4 regiões transmembranares hidrofóbicas e 2 *loops* extracelulares (Zhang *et al.*, 2004).

O receptor SR-B1 está expresso na superfície de muitas células e tecidos, mas a sua expressão é particularmente elevada nos hepatócitos, sendo o responsável pela ligação da E2 a estas células. Este receptor contém 2 pequenos domínios citoplasmáticos, 2 sequências transmembranares e um *loop* grande altamente glicosilado. É importante para a endocitose do vírus pois pode actuar directamente através das lipoproteínas associadas ao VHC mas também indirectamente (Dubuisson *et al.*, 2008).

A CLDN1 actua numa fase tardia do processo de entrada do vírus, após a ligação do vírus ao CD81. A OCLN interactua com E2 de modo a facilitar a entrada do vírus na célula (Liu *et al.*, 2009). O papel destas proteínas ainda não está totalmente esclarecido, contudo pensa-se que induz a internalização do vírus via endocitose mediada por clatrina.

Além disso, ainda existem os glicosaminoglicanos (GAGs) e os receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLRs) que são importantes na ligação inicial às células e não são específicos, pois ligam-se devido aos lípidos e às lipoproteínas das partículas virais que se encontram em circulação (Rice C, 2011).

Após a sua entrada na célula através de endocitose mediada por clatrina, uma proteína importante na formação de vesículas membranares, o vírus vai ser internalizado para um endossoma. Este organelo tem o pH ácido, induzindo as membranas virais a alterarem a

sua conformação e fundirem-se com ele, libertando o RNA viral para o citoplasma (descapsidação).

O RNA do VHC vai funcionar directamente como RNA mensageiro. Este inicia a tradução por interacção com o RE conduzindo à produção de uma poliproteína. No lúmen do RE esta poliproteína é processada por proteases celulares e virais, em proteínas estruturais e não estruturais. Após a tradução ocorre a formação de um complexo de replicação associado à membrana. A associação da proteína core com o RNA viral forma a nucleocápside, posteriormente ocorre a formação do envelope, formando-se as partículas virais. Finalmente, o vírus sofre maturação no complexo de golgi, sendo depois libertado da célula através de vesículas citoplasmáticas que se fundem com a membrana plasmática (Rehermann B e Nascimbeni M, 2005).

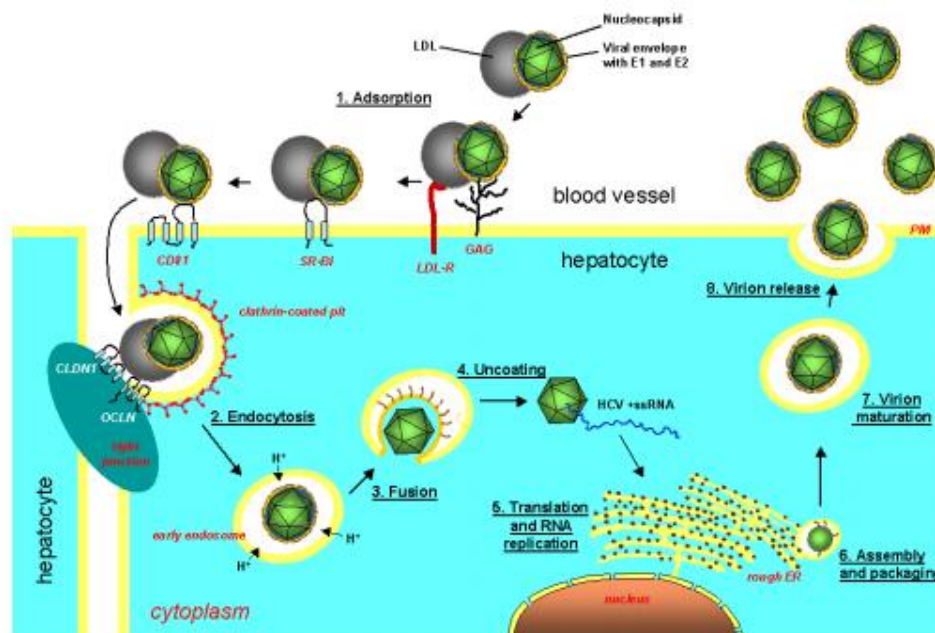


Figura 5. Representação esquemática do ciclo de replicação do VHC.

O VHC entra na célula por interacção com receptores da superfície membranar. Depois de entrar na célula, o seu RNA viral vai ser libertado do endossoma para o citoplasma onde irá funcionar directamente como RNA mensageiro na tradução da poliproteína. As proteínas não estruturais e o RNA viral formam complexos de replicação associados à membrana. Estes complexos vão induzir a síntese de novas moléculas de RNA viral que juntamente com as proteínas estruturais, forma novas partículas virais, libertadas da célula através de vesículas citoplasmáticas. (adaptado de Mauss *et al.*, 2012).

Diversidade genética

O vírus apresenta elevada capacidade replicativa associada à falta de capacidade de verificação de erros da sua polimerase (ausência de *proofreading*) tal como acontece noutros vírus de RNA. Produzem-se 10¹² viriões por dia (100 vezes mais do que o vírus da imunodeficiência adquirida (VIH) com uma semi-vida de cerca de 3 horas (Lindenbach B e Rice C, 2005).

Este processo altamente dinâmico e a elevada taxa de replicação induz a geração de diversidade genética.

Genótipos

Este vírus possui seis genótipos diferentes que podem ser subdivididos em mais de 100 subtipos (Simmonds *et al.*, 2005). Os genótipos diferem entre si em 30-35% da sua sequência nucleotídica, com maior variabilidade em regiões como as glicoproteínas E1 e E2, enquanto os vários subtipos diferem apenas em 20-25 %.

A distribuição dos genótipos pode variar significativamente em diferentes áreas geográficas. Os genótipos 1, 2 e 3 têm uma distribuição mundial, enquanto os genótipos 4, 5 e 6 são encontrados esporadicamente nalguns países (Bukh *et al.*, 1995). O genótipo 4 é mais frequente no Médio Oriente e África, sendo o genótipo 5 é mais prevalente no sul de África. No sudoeste da Ásia encontra-se maioritariamente o genótipo 6 (Nguyen *et al.*, 2005). Em Portugal predomina o genótipo 1b seguido pelos genótipos 1a e 2 (Sarmiento *et al.*, 2001).

Os genótipos têm um significado clínico importante pois são um dos principais factores preditivos de resposta ao tratamento, sendo essa informação útil para estabelecer as doses e o tempo de terapia. Os genótipos 2 e 3 são os que apresentam melhor resposta ao tratamento, sendo o tratamento administrado durante cerca de 24 semanas, enquanto o 1 e 4 apresentam mais resistência sendo necessárias 48 semanas de tratamento (Poynard *et al.*, 2003 e Halliday *et al.*, 2011).

Quasispecies

Para além da existência de diferentes genótipos, o vírus da hepatite C circula no indivíduo sob a forma de *quasispecies*, populações complexas de variantes do VHC que possuem sequências genéticas com elevada heterogeneidade, mas bastante relacionadas entre si (Bukh *et al.*, 1995).

Estas *quasispecies* permitem a sobrevivência do vírus e o estabelecimento de infecção crónica devido à selecção de mutantes que escapam à neutralização dos anticorpos ou à acção dos linfócitos T citotóxicos. As *quasispecies* também podem dificultar o desenvolvimento de uma vacina (Farci *et al.*, 1997).

A ocorrência destas *quasispecies* deve-se a mutações ocorridas durante o processo de replicação, devido à pressão selectiva exercida pela imunidade do hospedeiro ou pela NS5B.

A diversidade e a complexidade genética das *quasispecies* do VHC parece também influenciar a resposta à terapêutica, visto que doentes com populações heterogêneas são menos respondedores ao tratamento do que aqueles que possuem uma população mais homogênea (Okada *et al.*, 1992).

A taxa de mutação varia significativamente nas diferentes regiões do genoma do VHC, possuindo uma frequência mais elevada nas proteínas do envelope viral (E1 e E2), especialmente na região hipervariável 1 (HVR-1) da E2. Estas alterações podem impedir o reconhecimento por parte dos anticorpos e das células T, contribuindo para a persistência da infecção apesar da existência de anticorpos neutralizantes.

Em resumo, a diversidade de *quasispecies* desempenha um papel essencial na fisiopatologia da infecção, principalmente na persistência viral e na resistência ao tratamento, tendo ainda implicações no diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de uma vacina (Farci *et al.*, 1997).

Transmissão do vírus da hepatite C

A hepatite C, até 1990, era transmitida principalmente através de transfusões de sangue até 1990, data em que se começou a realizar testes de diagnóstico aos doadores de sangue. Uma das vias mais frequentes da transmissão deste vírus é a exposição parenteral a sangue contaminado ou derivados (Ozaras R e Tahan V, 2009).

A transmissão nosocomial é uma das formas de transmissão, que se baseia na utilização de material contaminado em procedimentos médicos (Alter, 2002). A transmissão via perinatal (mãe – feto) e a via sexual também podem ocorrer, sendo estas no entanto raras (Gerardi H e Zimmerman M, 2005).

Hoje em dia, nos países desenvolvidos a principal causa de infecção pelo VHC é a partilha de seringas contaminadas entre os utilizadores de drogas endovenosas, podendo ser responsáveis por cerca de metade dos casos da infecção por este vírus (Alter M, 2006).

Todavia nalguns casos ainda permanece por identificar qual a via de transmissão (Alter M, 2002).

Tratamento da hepatite C crónica

A terapêutica actual recomendada para o tratamento da HC é o interferão alfa peguilado (peg-IFN- α) associado a ribavirina (1-beta-D-ribofuranosil-1,2,4 triazole-3-carboxamida), a chamada terapia combinada (Pawlostsky J, 2011). Apesar de, em 2011, terem sido aprovados 2 novos fármacos para o tratamento da hepatite C, *Boceprevir* e *Telaprevir*, que são inibidores da protease NS3/NS4. Estes fármacos são administrados em associação ao interferão e à ribavirina, mas apenas para doentes infectados por VHC com o genótipo 1. Este genótipo é considerado um dos mais resistentes à terapia combinada (Liu *et al.*, 2011).

Os interferões (IFNs) são citocinas com actividade imunomoduladora produzidas em resposta a infecções virais, levando à expressão de vários genes com actividade anti-viral e anti-proliferativa. Além disso, também podem estimular as respostas imunes anti-virais. A família dos IFNs pode ser dividida em dois subtipos, o subtipo I e o subtipo 2.

No tratamento da hepatite C usa-se o IFN- α , que é um IFN do tipo I. O IFN- α promove a proliferação das células T de memória, impede a apoptose e exaustão dos linfócitos T (LT) e estimula a activação das células natural *killer* (NK) e a maturação das células dendríticas (DC) (Tilg H, 1997). O IFN também aumenta a expressão das moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe I à superfície celular, com consequente estimulação da resposta T citotóxica, e aumenta a expressão de MHC classe II com consequente aumento da imunidade humoral. Além disso, também pode induzir o aumento da resposta *t helper* (Th) – 1, através do aumento de interleucina (IL)-2 e consequente diminuição da Th2 pela diminuição da IL-4 e IL-5 (Lechner *et al.*, 2000).

A ribavirina é um análogo sintético da guanosina, possuindo actividade anti-viral contra diversos vírus de DNA e RNA (Brillanti *et al.*, 2011). Foram descritos 3 modos de acção para a ribavirina. Primeiro, este fármaco sofre fosforilação intracelular produzindo mono -, di-e trifosfatos, sendo o monofosfato inibidor competitivo da inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH). Esta inibição diminui os níveis intracelulares de guanosina trifosfato, que é essencial para a síntese de RNA viral (Malinoski F e Stollar V, 1981). Segundo, a terapia com ribavirina leva à síntese de RNA anormal, que por sua vez, se traduz na ineficácia da síntese dos transcriptos virais. (Bougie I e Bisailon M, 2004). Terceiro, a ribavirina pode ter um efeito supressor directo na actividade da polimerase viral (Toltzis *et al.*, 1988).

Além disso, este composto pode exercer um efeito modulador na resposta do hospedeiro, induzindo um estado anti-viral através do aumento das citocinas anti-virais Th1, e supressão das citocinas anti-inflamatórias Th2, mostrando ser imunomoduladora (Myrmel *et al.*, 2009).

As terapias usando apenas ribavirina não conseguem controlar a replicação do VHC, mas em associação com IFN- α conduz a um aumento de respostas relativamente à monoterapia com IFN- α .

Apesar deste aumento na taxa de resposta, verificou-se uma crescente necessidade de redução da dose ou interrupção da terapêutica devido aos efeitos secundários. Deste modo, o IFN- α convencional foi substituído pelo peg-IFN- α . Assim, para a terapia combinada obtiveram-se respostas para os genótipos 2 e 3 de 80% e para o genótipo 1 de 50 %, o que se traduz num aumento de respostas relativamente ao IFN- α convencional com a ribavirina. Esta associação foi considerada, até 2011, a terapêutica

de eleição para os doentes com HC que não apresentem contra-indicações ao uso destes fármacos (Pawlostsky J, 2011).

O processo de peguilação consiste na ligação covalente de uma molécula de polietileno glicol, produzindo uma proteína biologicamente activa com um tempo de meia-vida maior, contribuindo assim para a melhoria da farmacocinética melhor resposta (Feld J e Hoofnagle J, 2005). Actualmente existem duas formulações aprovadas para o tratamento da hepatite C: peg-IFN alfa-2a e peg-IFN alfa – 2b. O peg-IFN alfa-2b consiste na adição de uma molécula linear de peg de 12 kDa de peso molecular, enquanto o peg-IFN alfa-2a consiste na adição de uma molécula ramificada de peg com 40 kDa.

Os principais efeitos adversos associados ao tratamento com IFN são: depressão, hipotiroidismo e ideação suicida. No que concerne aos efeitos adversos da ribavirina são essencialmente teratogénicos e anemia, podendo por vezes, também ocorrer faringite, insónia, dispneia, erupção cutânea, náuseas e anorexia (Poynard *et al.*, 2003).

As respostas ao tratamento anti-viral da hepatite C são agrupadas em 3 padrões gerais (figura 6): resposta virológica sustentada (RVS); recaídas e não-resposta. Uma RVS é caracterizada por níveis indetectáveis de RNA viral no soro durante pelo menos 6 meses após a interrupção do tratamento. A recaída define-se como a perda do RNA viral durante o tratamento, seguido do seu reaparecimento nos primeiros 6 meses seguintes à conclusão do tratamento. Nos doentes não-respondedores os níveis de RNA viral permanecem detectáveis, embora possa existir um decréscimo durante o tratamento (Feld J e Hoofnagle J, 2005).

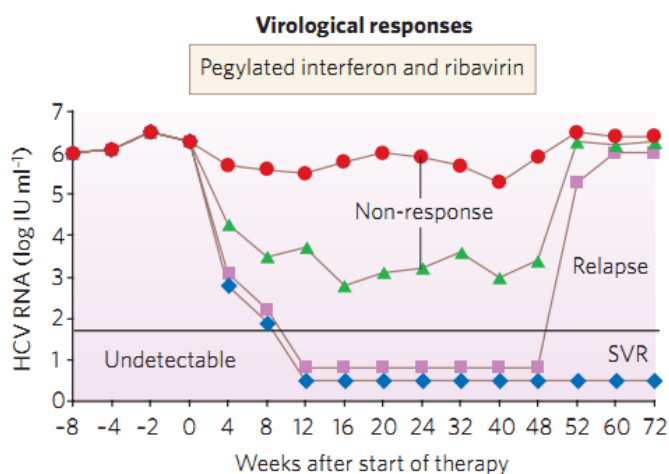


Figura 6. Respostas virológicas ao tratamento da hepatite C (Feld J e Hoofnagle J, 2005).

Factores que influenciam a resposta a terapia

A resposta à terapia é influenciada por vários factores relacionados com o hospedeiro e por factores virais. Os principais factores virais com influência na resposta à terapia são a carga viral, a heterogeneidade e o genótipo. No entanto, por vezes, indivíduos com o mesmo genótipo e carga viral semelhantes têm diferentes respostas ao tratamento o que pode ser explicado pelos factores do hospedeiro.

Quanto aos factores relacionados com o hospedeiro temos a idade no momento da infecção, apresentando os doentes mais jovens melhores taxas de resposta, a raça (indivíduos Afro-Americanos têm respostas menos favoráveis ao tratamento). As mulheres, a não-obesidade e níveis de fibrose baixa, também têm melhores respostas a terapia (Feld J e Hoofnagle J, 2005).

Perspectivas futuras para o tratamento

A terapia combinada, apesar de ser a terapêutica de eleição para o tratamento da HC, possui algumas desvantagens como os efeitos adversos graves e a taxa de resposta ser inferior ao desejado. Assim é necessário o desenvolvimento de novos tratamentos anti-virais com menos efeitos secundários, que terão como objectivo a inibição da actividade das proteínas virais essenciais à replicação do VHC.

Recentemente, em 2011, foram aprovados 2 novos fármacos para o tratamento da hepatite C, *Boceprevir* e *Telaprevir*, que são inibidores da protease NS3/NS4. Estes fármacos são administrados em associação ao interferão e à ribavirina, mas apenas para doentes infectados por VHC com o genótipo 1, pois este é considerado um dos mais resistentes à terapia combinada. Novos fármacos anti-virais tendo como alvo as proteínas virais NS5A e a NS5B, encontram-se actualmente em vários estágios de estudos pré-clínicos e clínicos. Após aprovação destes fármacos, estudos clínicos futuros podem levar à optimização da terapia de combinação, que terá parâmetros desejáveis, tais como maior eficácia, segurança, menor dose diária e menor duração do tratamento (Liu *et al.*, 2011).

Além disso, existe uma proporção significativa de indivíduos infectados que resolve espontaneamente a infecção pelo VHC, o que nos leva a acreditar que é possível o

desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o vírus. Assim, é necessário um melhor conhecimento do vírus e das suas interações com o hospedeiro.

Existem estudos de vacinas para o VHC, incluindo vacinas baseadas em péptidos, proteínas recombinantes, DNA e vectores, estas já se encontram em ensaios clínicos humanos (Halliday *et al.*, 2011).

Co-infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida

Estima-se que em todo o mundo existam 40 milhões de pessoas infectadas com o VIH, e que 4-5 milhões estejam infectados cronicamente com VHC (Alter M, 2006). A prevalência da co-infecção por VHC em doentes infectados pelo VIH, na Europa e nos EUA, ronda os 16-33% sendo especialmente elevada (50 a 90%) entre os utilizadores de drogas endovenosas. A co-infecção pelo VIH está associada a um aumento na progressão da doença hepática e a uma diminuição da sobrevivência dos indivíduos infectados com VHC. Além disto, a co-infecção aumenta o risco de transmissão de ambos os vírus (Lu *et al.*, 2009).

Actualmente a hepatite C crónica constitui uma das principais causas de mortalidade e morbidade em doentes co-infectados. O tratamento de co-infectados com VHC e VIH, utilizando apenas IFN- α , têm respostas muito baixas. Assim a terapia combinada entre peg-IFN- α e ribavirina constitui a terapêutica recomendada para co-infectados. Contudo este tratamento para VHC em co-infectados torna-se mais complicado devido às interações entre a ribavirina e alguns anti-retrovirais (Shepard *et al.*, 2005).

SISTEMA IMUNITÁRIO

O nosso corpo dispõe de um sistema imune, também designado por sistema imunológico, que é constituído por órgãos e tecidos diferentes, com características específicas, células e factores solúveis. O sistema imune é um sistema de defesa que evoluiu para proteger o organismo contra microrganismos invasores patogénicos, mas também é fundamental para o equilíbrio homeostático do organismo. Assim pode

definir-se a imunidade como a soma de todos os mecanismos de defesa que o nosso organismo dispõe para nos proteger das agressões a que está sujeito (Arosa *et al.*, 2007).

Resposta imune

A resposta imune pode dividir-se, funcionalmente, em duas actividades relacionadas, o reconhecimento e a resposta. O reconhecimento imune é caracterizado pela sua elevada especificidade, uma vez que o mesmo tem a capacidade de reconhecer as diferenças químicas que distinguem um agente patogénico estranho de um outro. Além disto, este sistema, também, tem a capacidade de discriminar entre as moléculas estranhas e as células e proteínas do próprio organismo. Após o reconhecimento do organismo estranho, o sistema imune recruta uma variedade de células e moléculas para desenvolver uma resposta apropriada, designada por resposta efectora que tem o objectivo de neutralizar ou eliminar esse organismo. Desta forma, o nosso sistema imune tem a capacidade de converter um reconhecimento inicial em diferentes respostas efectoras, sendo que cada uma delas é específica para um agente patogénico. Quando o nosso organismo é exposto ao mesmo agente patogénico, gera-se uma resposta de memória mais rápida, mais potente e mais eficaz na eliminação desse patógeno que a resposta anterior (Kindt *et al.*, 2007). Este processo de reacção do sistema imune é constituído por dois tipos de respostas inter-relacionadas: a resposta imunológica inata ou natural e a resposta imunológica adaptativa ou adquirida (Arosa *et al.*, 2007). Estas respostas não são independentes uma da outra, pelo contrário interactivam como um sistema cooperativo (Kindt *et al.*, 2007).

Resposta imune inata ou natural

A imunidade inata ou natural é a primeira linha de defesa do organismo e consiste numa resposta imediata a um estímulo agressor, sendo deste modo, um componente com pouca especificidade. Esta imunidade é constituída por 4 tipos de barreiras de defesa: anatómicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias.

As barreiras anatómicas e físicas impedem a entrada de agentes patogêneos, por isso, são consideradas a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção. A pele e a superfície das membranas das mucosas fazem parte desta categoria. A primeira é uma barreira praticamente impenetrável a um grande número de microrganismos se estiver íntegra, a segunda possui o muco que aglutina os microrganismos impedindo que estes entrem em contacto com as células epiteliais presentes nas mucosas, posteriormente os microrganismos são removidos por outros mecanismos.

As barreiras físicas são o pH baixo, a temperatura e as moléculas solúveis (lisozima, interferão e o sistema do complemento).

A fagocitose é o processo de englobar partículas estranhas pela membrana celular, de modo a formar-se um vacúolo no interior da célula que inclui a bactéria ingerida (fagossoma). O fagossoma funde-se com os lisossomas, que contêm enzimas lisossômicas digerindo a bactéria. Os produtos resultantes da digestão são libertados por exocitose. As células especializadas na fagocitose são os monócitos, os macrófagos e os neutrófilos.

Além disso, ainda existem outras células importantes no processo fagocítico. As células dendríticas (DC) imaturas presentes nos tecidos periféricos podem fagocitar microrganismos; os mastócitos presentes nos tecidos, além de terem capacidade fagocítica também têm um papel essencial no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório; e os eosinófilos residentes nos tecidos que produzem citocinas e mediadores lipídicos do processo inflamatório.

A inflamação é o processo que o organismo dispõe para localizar, neutralizar ou eliminar um agente agressor. A manifestação clínica das fases da inflamação dá-se através de 5 sinais, denominados de sinais cardinais, que caracterizam a agudização do processo inflamatório. Os 5 sinais cardinais são: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor, dor e perda de função. As principais fases da inflamação são vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e influxo de fagócitos.

Alguns linfócitos (células NK, células natural *killer* T (NKT) e linfócitos $T\gamma\delta$) podem ter funções citotóxicas contra as células-alvo, independentemente de qualquer contacto prévio com as essas células, tratando-se assim de uma resposta inata (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007).

Resposta imune adquirida ou adaptativa

Quando a eliminação ou neutralização dos organismos estranhos ao organismo não foi conseguida pela imunidade inata, é necessário desenvolver uma resposta mais específica e eficaz, a resposta imune adquirida ou adaptativa. Assim, a imunidade adquirida consiste numa resposta mais tardia capaz de reconhecer e eliminar selectivamente e especificamente os antígenos estranhos. Esta imunidade apresenta 4 características essenciais: a especificidade antigénica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento de próprio / não-próprio. A especificidade antigénica deve-se ao facto dos anticorpos conseguirem distinguir diferenças subtis entre os antígenos, mesmo que estes apenas possuem um aminoácido diferente. A diversidade deve-se ao facto, do sistema imune ser capaz de reconhecer biliões de estruturas únicas nos diferentes microrganismos. Quando o sistema imune reconhece e responde aos antígenos, gera memória imunológica, ou seja, num segundo encontro com o mesmo antígeno a resposta desenvolvida é mais rápida e mais intensa. O sistema imune, normalmente, responde apenas aos antígenos estranhos tendo assim uma capacidade de distinguir o que é próprio e do não-próprio.

A imunidade adaptativa pode dividir-se em dois tipos: a imunidade humoral, que é mediada pelos anticorpos produzidos pelos linfócitos B (LB) e a imunidade celular, que é mediada principalmente pelos linfócitos T (LT) que têm a capacidade de reconhecer e induzir a morte celular por apoptose das células portadoras de antígenos estranhos ao nosso organismo (Kindt *et al.*, 2007).

Órgãos linfóides

Os órgãos e os tecidos que constituem o sistema imunitário podem ser divididos, do ponto de vista funcional, em dois grandes grupos: os órgãos linfóides primários e os órgãos linfóides secundários.

Órgãos linfóides primários

Os órgãos linfóides primários proporcionam microambientes essenciais para a produção e maturação dos linfócitos. Este tipo de órgãos é formado pela medula óssea e pelo timo, onde ocorre a maturação dos LB e dos LT, respectivamente.

A medula óssea é um tecido mole e adiposo que se encontra nas cavidades ósseas, especialmente dos ossos compactos e dos ossos esponjosos do esterno, crânio e das vértebras da coluna. Este órgão, além de ser constituído pelas células hematopoiéticas, também possui células do tecido conectivo, células do estroma e adipócitos. As células estaminais hematopoiéticas (HSC) localizam-se na porção mais periférica da cavidade medular, (junto do osso), enquanto as células mais diferenciadas localizam-se numa posição mais central na cavidade medular (Arosa *et al.*, 2007).

O timo é uma glândula encapsulada, que se situa na parte superior do tórax, acima do coração. Ele é constituído por 2 lobos que se unem na traqueia. Cada lobo é, externamente, envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo que o divide em vários lóbulos. Cada lóbulo é por sua vez, constituído por duas zonas: o córtex, que é uma zona escura por ser densamente habitada por timócitos (LT imaturos) e a medula, que por ter poucos timócitos é uma zona mais clara. As duas zonas possuem ainda células epiteliais, células dendríticas e macrófagos, que compõem a estrutura do órgão e contribuem para o crescimento e maturação dos timócitos. O timo aumenta gradualmente de tamanho até à puberdade, altura em que começa a diminuir, sendo os tecidos linfóide e epitelial progressivamente substituídos pelos tecidos adiposo e fibroso (Arosa *et al.*, 2007; Crivellato *et al.*, 2004 e Kindt *et al.*, 2007).

Órgãos linfóides secundários

Os órgãos linfóides secundários proporcionam, eficientemente, o encontro entre os linfócitos *naive* e o antigénio para o qual são específicos. Os gânglios linfáticos, o baço e os tecidos linfóides associados às mucosas constituem este tipo de órgãos.

Os gânglios ou nódulos linfáticos são pequenos órgãos em forma de feijão, compostos por áreas ricas em LT, denominadas por “áreas T” ou timo-dependentes, e áreas ricas em LB, denominadas por “áreas B” ou timo-independentes. Estes gânglios, são revestidos por uma cápsula de tecido conjuntivo que os divide em lóbulos

incomplementos. Morfologicamente, um gânglio linfático pode ser dividido em três regiões que apresentam microambientes distintos: o córtex, o paracórtex e a medula. O córtex, região mais externa, contém na sua maioria LB, macrófagos e DC foliculares, organizados em folículos primários. Estes folículos primários podem aumentar de tamanho, em resposta a um estímulo antigénico, dando origem aos folículos secundários, que por sua vez, caracterizam-se por ter um centro germinativo. O paracórtex encontra-se abaixo do córtex e contém principalmente LT e DC. A medula, camada mais interna, é escassamente povoada por células linfóides, contudo possui muitas células plasmáticas a secretar anticorpos.

O baço é um órgão grande, muito vascularizado e ovóide localizado na cavidade abdominal esquerda. Os nódulos linfáticos captam o antigénio vindo dos tecidos enquanto o baço é especializado em filtrar e captar antigénios presentes no sangue.

O baço divide-se, morfológicamente e funcionalmente, em duas áreas: a polpa branca e a polpa vermelha. A polpa branca contém zonas ricas em LB (folículos e zona marginal) e zonas ricas em LT (bainha periarterial). A polpa vermelha consiste numa rede reticular composta por células do estroma, macrófagos, células NK, plasmócitos e glóbulos vermelhos senescentes ou danificados.

Os tecidos linfóides associados às mucosas, estão localizados, tal como o nome indica, junto às mucosas, e têm um papel importante na produção de plasmócitos secretores de anticorpos do tipo IgA. Além disso, estes tecidos possuem células epiteliais especializadas em captar antigénios das superfícies epiteliais (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007).

Células do sistema imunitário

Todas as células sanguíneas, incluindo as células do sistema imune, têm origem na medula óssea, por um processo designado hematopoiese, que ocorre após o nascimento. A hematopoiese consiste no processo de formação das células sanguíneas a partir das HSC. Estas células têm a capacidade de auto-renovação e são multipotentes podendo originar os diversos tipos de células sanguíneas. Assim, as células estaminais hematopoiéticas dividem-se em células progenitoras linfóides (CLP), que dão origem aos LT, aos LB e as células NK, e em células progenitoras mielóides (CMP), que dão

origem aos granulócitos, monócitos, eritroblastos (precursores de eritrócitos) e megacariócitos (precursores de plaquetas) (Arosa *et al.*, 2007 e Gerrits *et al.*, 2008).

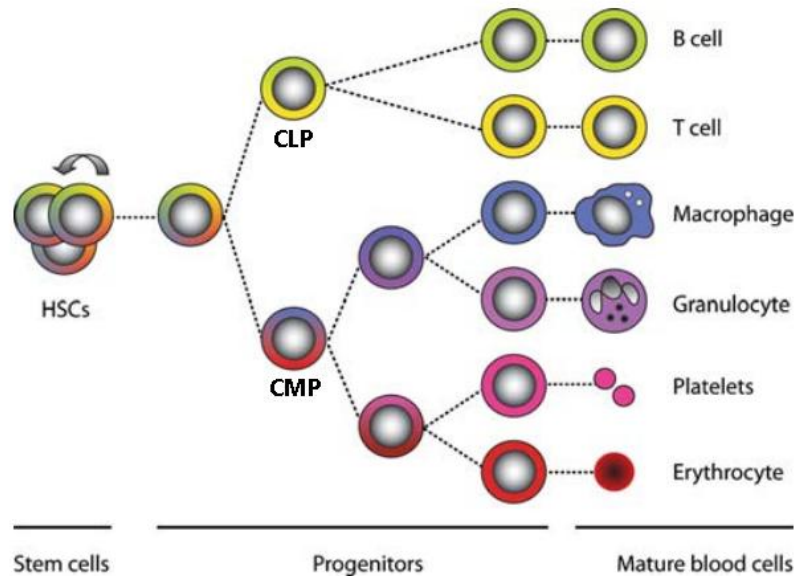


Figura 7. Revisão simplificada da hematopoiese (Gerrits *et al.*, 2008).

Durante o processo de diferenciação hematopoiética as células vão perdendo gradualmente a sua multipotência, tornando-se cada vez mais comprometidas com uma linha celular específica (Gerrits *et al.*, 2008 e Kindt *et al.*, 2007). As células do estroma, os componentes da matriz, os factores de crescimento e as citocinas presentes no meio envolvente controlam o processo de diferenciação (Kindt *et al.*, 2007).

As respostas imunológicas são mediadas por glóbulos brancos ou leucócitos. Os leucócitos dividem-se em leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) e leucócitos polimorfonucleares (granulócitos) (Arosa *et al.*, 2007). Os linfócitos são as células mais importantes neste grupo, pois são responsáveis pela imunidade adaptativa e podem conferir especificidade, diversidade, memória, e reconhecimento próprio/ não - próprio nas respostas imunológicas. Os restantes tipos celulares têm como papel fundamental secretar citocinas, apresentar antigénios, fagocitar e destruir microrganismos (Kindt *et al.*, 2007).

Células linfóides ou linfócitos

Os linfócitos constituem 20-40% dos leucócitos e 99 % das células da linfa. Estes linfócitos circulam continuamente no sangue periférico e linfa, tendo capacidade de migrar para o interior dos tecidos e órgãos linfóides. Podem distinguir-se 3 tipos de linfócitos: os LB, os LT e as células NK (Kindt *et al.*, 2007).

Os LB realizam a sua maturação na medula óssea e diferenciam-se dos outros linfócitos porque possuem na sua membrana plasmática um receptor, que apenas é expresso neste tipo celular, sendo por isso, designado de receptor de células B (BCR). Um dos componentes deste receptor é uma proteína denominada imunoglobulina que está ligada à membrana e é capaz de se ligar a antígenos específicos livres. Estas imunoglobulinas são indispensáveis para a activação dos LB e para a sua diferenciação em plasmócitos, células produtoras de anticorpos. Deste modo, estes linfócitos constituem a imunidade humoral (Arosa *et al.*, 2007). Os LB possuem ainda na sua membrana plasmática moléculas de MHC II que permitem que estes funcionem como células apresentadoras de antígenos (APCs) (Kindt *et al.*, 2007).

Os LT e as células NK serão explicados mais à frente.

Monócitos, macrófagos e células dendríticas

Os monócitos desenvolvem-se na medula óssea, depois circulam temporariamente no sangue periférico até migrarem para os tecidos, onde se diferenciam em macrófagos e alguns tipos de células dendríticas (DC) (Arosa *et al.*, 2007).

Nos tecidos, quando os monócitos se diferenciam em macrófagos, sofrem várias transformações que lhes permitem assegurar as diversas funções fisiológicas, pois existem em quase todos os tecidos do corpo. Esta diferenciação conduz a um aumento da capacidade fagocítica, do número de lisossomas portadores de enzimas hidrolíticas e da capacidade de activar LT. Além disso, também expressam níveis mais elevados de MHC II, permitindo-lhes funcionar mais eficazmente como APCs.

As DC têm uma morfologia dendrítica ou estrelada. Na sua forma imatura, estas células são especializadas em captar antígenos, tornando-se maduras em resposta a diversos estímulos e especializadas em estimular LT. Existem 4 tipos de DC, mas

apesar das suas diferenças, todas têm a capacidade de expressar níveis elevados de MHC II, sendo as APCs mais potentes (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007).

Granulócitos

Os granulócitos são classificados em três tipos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Esta divisão tem por base a morfologia celular e as características de coloração citoplasmática.

Os neutrófilos são células fagocíticas, têm um tempo de vida curto e são as primeiras células a serem recrutadas do sangue para o local de inflamação. Estas células coram com os dois tipos de corantes: ácido e básico.

Os eosinófilos também são células fagocíticas, apesar de esta sua capacidade ser mais fraca. Estas células actuam libertando o conteúdo dos seus grânulos para o meio extracelular, sendo a sua acção principalmente contra parasitas. Estas células coram de vermelho com o corante eosina vermelha, que é um corante ácido.

Os basófilos não têm capacidade fagocítica, estando principalmente envolvidos em respostas alérgicas por libertarem substâncias farmacologicamente activas como heparina e histamina. Estas células coram de azul com o corante azul-de-metileno (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007).

Linfócitos T

Os LT pertencem ao grupo dos leucócitos, como referido anteriormente, e são os principais efectores da imunidade celular. Realizam a sua maturação no timo e possuem tal como os LB, um receptor característico à superfície da membrana, denominado de receptor da célula T (TCR). O TCR apenas reconhece antígenos processados e que sejam apresentados à superfície das APCs associadas a moléculas de MHC. Estes linfócitos têm tamanho pequeno, contudo quando sofrem activação aumentam de tamanho e o seu citoplasma torna-se maior.

As células que nunca interagiram com um antígeno são referidas como células *naive*. Assim após o contacto com o antígeno combinado com uma molécula MHC à

superfície das APCs, a célula T *naive* liga-se ao antigénio, prolifera e diferencia-se em dois tipos de células: células T de memória e células T efectoras (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007).

Maturação dos linfócitos T

Os LT derivam de HSC da medula óssea e migram para o timo onde vão sofrer o processo de maturação. Após entrada no timo, os LT entram em contacto com as células do estroma tímico, induzindo sinais que induzem o comprometimento celular dos LT e fornecem os estímulos necessários para que se dê a proliferação e a maturação destas células designadas por timócitos (LT imaturos). Este processo de maturação é composto por 3 estadios (I, II e III), baseado na expressão membranar das moléculas CD4 e CD8 e do complexo TCR-CD3.

Na região subcapsular do córtex, os timócitos iniciais (estadio I) caracterizam-se por não expressarem à superfície o complexo TCR-CD3, nem os co-receptores CD4 bem como os CD8, sendo por isso, denominados por duplos negativos (DN). Estes DN constituem uma população minoritária (1 – 5% dos timócitos) com intensa actividade proliferativa, que são capazes de se auto-renovarem e de originarem todas as outras populações tímicas. Estas células podem se dividir em 4 sub-populações de acordo com a expressão de CD117, CD44 e CD25.

Quando os timócitos chegam ao córtex (estadio II), perdem a sua capacidade proliferativa e iniciam o rearranjo dos genes da cadeia β do TCR, expressando depois esta cadeia na superfície membranar. Esta cadeia combina-se com uma cadeia pré- α e associa-se ao complexo CD3 formando um pré-receptor da célula T (pré-TCR). Estas células passam a expressar níveis baixos ou intermédio do complexo CD3-TCR $\alpha\beta$, bem como dos co-receptores CD4 e CD8, sendo designados por duplos positivos (DP). Os DP constituem a população maioritária (80-90%) dos timócitos, no entanto são funcionalmente incompetentes (Ellmeier *et al.*, 1999).

Quando os DP ultrapassam a junção cortico-medular (estadio III), em direcção à medula, passam a expressar níveis elevados do complexo TCR $\alpha\beta$ -CD3 e assumem um fenótipo *single positive*, CD4⁺ ou CD8⁺. Estes timócitos com fenótipo *single positive* constituem cerca de 5 a 10 % do total de timócitos na medula do timo, correspondendo a uma pequena percentagem de timócitos que sobreviveram e alcançaram a maturidade.

Assim, estes timócitos já podem deixar a medula e colonizar os tecidos linfóides periféricos (Kindt *et al.*, 2007; Paiva A, 2008 e Virella G, 2001).

Origem da diversidade dos linfócitos T

A expressão do TCR está envolvida no processo de maturação dos LT. O TCR é responsável pelo reconhecimento do complexo péptido-molécula de MHC, contudo não consegue transmitir sinais intracelulares. Assim, o TCR é expresso na superfície dos LT em associação com uma molécula de sinalização designada CD3, por isso, normalmente é denominado de complexo TCR-CD3 (Arosa *et al.*, 2007).

O TCR é um heterodímero formado por duas cadeias peptídicas da superfamília das imunoglobulinas. Cada cadeia é formada por uma região variável e uma região constante. Existem 2 tipos de TCR: TCR $\alpha\beta$, que é formado por uma cadeia α associada a uma cadeia β , representando 95-99% dos LT presentes na circulação e o TCR $\gamma\delta$, que é formado por cadeia γ associada a uma cadeia δ , representando apenas 1-5% . Os genes do TCR estão sujeitos a rearranjos aleatórios VDJ, contribuindo deste modo para a diversidade do TCR e consequentemente diversidade dos LT. O TCR $\gamma\delta$ permanece em DN enquanto o TCR $\alpha\beta$ sofre todo o processo de maturação, mencionado anteriormente.

No entanto, a diversidade de moléculas do TCR produzidas deve ser conferida e seleccionada para que não ocorra reacção contra o próprio (reconhecimento de auto-antígenos) e apenas ocorra o reconhecimento dos antígenos exógenos que são apresentados pelas moléculas MHC I e II do próprio. Assim, os timócitos são submetidos a dois tipos de selecção, primeiro a positiva e posteriormente a negativa.

A selecção positiva ocorre na região do córtex do timo e envolve a interacção dos timócitos imaturos com as células epiteliais tímicas. Só os timócitos que apresentem um TCR capaz de se ligar com um certo grau de afinidade às moléculas de MHC I ou às MHC II, é que podem continuar a sua maturação. Se essa afinidade for muito forte ou muito fraca, essas células morrem por apoptose.

Se o TCR se ligar às moléculas MHC I, ocorre o silenciamento de CD4⁺ e os DP dão origem aos LT CD8⁺, denominados por CTL. Por outro lado, se essa ligação ocorrer com as moléculas do MHC II, é o co-receptor CD8 que é silenciado originando os LT CD4⁺, designados por linfócitos Th (Arosa *et al.*, 2007, Kindt *et al.*, 2007 e Virella G, 2001).

Todavia, alguns timócitos que são seleccionados positivamente podem possuir um TCR capaz de reconhecer alguns auto-antígenos e por isso, tem de ser seleccionados negativamente. Os timócitos que interagem com elevada afinidade com os auto-antígenos morrem por apoptose (Kindt *et al.*, 2007 e Virella G, 2001).

Cerca de 98% de todos os timócitos não matura e morre por apoptose, seja por não conseguirem realizar um rearranjo produtivo do gene do TCR, ou porque não conseguiram escapar à selecção tímica (Kindt *et al.*, 2007).

Activação dos linfócitos T

A interacção do complexo TCR-CD3 presente quer nos LT CD4⁺ quer nos LT CD8⁺, com as moléculas de MHC II e MHC I, respectivamente, é o sinal de activação primário que confere especificidade à resposta do LT. Contudo, este sinal não é suficiente para induzir a proliferação dos linfócitos T *naive*, sendo necessário o envolvimento de outros sinais designados por acessórios. Estes sinais acessórios são os sinais transmitidos pelos co-receptores CD4 e CD8 e pelo receptor CD28. O CD28 é considerado o receptor activador mais importante dos LT e transmite o sinal de activação 2 que vai sinergizar com o sinal de activação 1. Este receptor pode interagir com o CD80 e CD86 presentes nas APCs.

Além disso, os LT expressam à sua superfície moléculas de adesão e de sinalização. As moléculas de adesão facilitam a migração de LT circulantes, através da interacção com células endoteliais vasculares, para lugares de infecção. Os sinais de sinalização podem ser activadores ou inibidores, sendo que a menor ou maior expressão de um ou outro tipo dita qual o estado de activação e diferenciação de LT (Arosa *et al.*, 2007).

Processo de diferenciação dos linfócitos T

Como resultado da activação, os LT *naive* sofrem um processo de expansão clonal e, de seguida, através de um processo de diferenciação transformam-se em LT de memória e/ou efectores. Este processo de diferenciação envolve alterações na expressão quer de receptores de superfície quer de citocinas intracelulares. Esta proliferação é promovida principalmente pela citocina IL-2 produzida pelos próprios linfócitos em divisão (acção

autócrina). Desta forma, os principais marcadores da diferenciação incluem receptores para citocinas e factores de crescimento, como a cadeia α do receptor para a IL-2 (CD25) e a cadeia β do receptor para a IL-2 (Arosa *et al.*, 2007).

Os LT efectores derivam de células T *naive* e células de memória após activação. As mesmas exercem funções específicas dependendo do tipo de célula que lhe deu origem, possuindo um tempo de vida curto.

Os LT de memória derivam de células T *naive* e células efectoras, depois de estas terem estado em contacto com o antigénio. São células *resting* mas com capacidade de resposta a uma nova exposição ao mesmo antigénio. Estas células possuem um tempo de vida maior e respondem mais rapidamente ao mesmo antigénio quando ocorre um segundo contacto com o mesmo antigénio, gerando uma resposta secundária (Kindt *et al.*, 2007).

A. Diferenciação e função de linfócitos T CD4⁺

Os LT CD4 têm como função fundamental ajudar as outras células a desempenhar as suas funções, sendo por isso normalmente denominados de linfócitos T auxiliares ou LTh. Contudo podem existir algumas subpopulações de LT CD4⁺ que desempenham funções citotóxicas (Arosa *et al.*, 2007).

Após activação, resultante da apresentação do antigénio pelas APCs através das moléculas de MHC I e de outros sinais co-estimulatórios referidos anteriormente, os linfócitos Th diferenciam-se em 4 grandes subpopulações, Th1, Th2, LT reguladores (LTreg) e Th17. Estas subpopulações estão bem definidas e distinguem-se no padrão de citocinas segregado que, em grande parte, determina a sua função.

Os linfócitos Th1 originam-se como resposta à produção de IL-12 e IFN- γ pelas APCs e caracterizam-se por produzirem principalmente o IFN- γ , IL-2 e factor de necrose tumoral (TNF)- α . Estas células são responsáveis por promover respostas imunológicas contra vírus e patógenos intracelulares, através da activação de macrófagos e CTL. Além disso, também podem estar envolvidas em doenças auto-imunes.

Os linfócitos Th2 originam-se como resposta à produção de IL-4 pelas APCs e caracterizam-se pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Estas células medeiam a resposta imune contra parasitas extracelulares, e promovem a produção de anticorpos pelos LB e as respostas mediadas por eosinófilos e mastócitos, estando assim

envolvidas principalmente na imunidade humoral. Além disso, também podem estar associadas com reacções alérgicas.

As citocinas produzidas pelos Th1 suprimem a proliferação de Th2 e vice-versa. (Kindt *et al.*, 2007 e Zhu J e Paul W, 2008).

Os LTreg constituem uma pequena fracção dos LT CD4⁺ circulantes, possuem como função suprimir as respostas imunológicas mediadas por outros LT e caracterizam-se principalmente pela elevada expressão do factor de transcrição Foxp3 e do CD25. Estes linfócitos podem se subdividir em dois tipos: naturais e induzidos. Os LTreg naturais representam a maioria dos LTreg, sendo produzidos no timo como uma subpopulação de células *naive*, maduras e funcionalmente distintas, que persistem na periferia com funções estáveis. Os LTreg induzidos, como o nome indica, são induzidos de forma específica na periferia a partir de LT *naive* por estimulação antigénica (Arosa *et al.*, 2007 e Paiva A, 2008).

Os linfócitos Th17 caracterizam-se principalmente pela produção de IL-17, mas também produzem outras citocinas com carácter inflamatório, como IL-21, IL-22 e IL-10. Estas células estão envolvidas em doenças auto-imunes (Zhu J e Paul W, 2008).

B. Diferenciação e função de linfócitos T CD8⁺

Os linfócitos T CD8 activados desempenham funções efectoras mais directas, sendo também designados de CTL. Todavia podem existir algumas subpopulações de LT CD8⁺ que possuem características das células Th (Arosa *et al.*, 2007).

Após activação induzida por péptidos reconhecidos no contexto de moléculas de MHC I, os LT CD8⁺ *naive* passam por uma fase inicial de expansão, que se associa a uma actividade efectora citotóxica temporária. De seguida sofrem apoptose, sobrevivendo apenas alguns que se diferenciam em duas subpopulações: LT de memória central e LT de memória efectora, mais conhecidos por LT de memória e LT efectores, respectivamente. Os LT de memória localizam-se em órgãos linfóides secundários enquanto os LT efectores localizam-se, preferencialmente, em órgãos não-linfóides.

Os CTL maduros possuem 2 mecanismos principais para induzir a apoptose da célula. Os mecanismos que induzem a morte das células-alvo podem envolver: libertação de enzimas líticas (perforina e granzimas) e interacção do ligando Fas (FasL) com o seu receptor, o Fas, presente na superfície das células-alvo. A perforina origina poros na

membrana das células – alvo. Estes poros facilitam a entrada das granzimas (granzima a e granzima b), que são proteases serínicas, que activam cascatas bioquímicas que culminam na morte celular. A ligação do FasL ao Fas leva ao recrutamento de proteínas intracelulares que activam caspases e consequentemente induzem morte celular por apoptose.

Os LT CD8⁺ podem também secretar citocinas com actividade anti – viral, principalmente IFN- γ e TNF- α , as quais actuam na activação dos fagócitos, induzindo inflamação (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007).

C. Diferenciação e função de linfócitos T $\gamma\delta$

Os LT $\gamma\delta$ representam apenas uma pequena fracção dos LT circulantes (1-5%) (Kindt *et al.*, 2007). Têm origem em timócitos imaturos DN porque durante a sua maturação não passam pelo estágio de co-expressão de CD4 e CD8, contudo algumas células podem expressar CD8. Estes linfócitos apresentam níveis elevados de CD3 quando comparados com outros LT.

O desenvolvimento dos LT $\gamma\delta$ pode ocorrer de forma dependente do timo mas também independente, pois algumas subpopulações precisam de entrar em contacto com os tecidos periféricos para se diferenciarem (Arosa *et al.*, 2007 e Tripodo *et al.*, 2009).

Estas células são consideradas por um lado, células da imunidade inata, uma vez que desenvolvem uma resposta rápida contra agentes estranhos, por outro, são consideradas células da imunidade adaptativa pois desenvolvem memória e desempenham funções importantes no controlo da infecção (Brandes *et al.*, 2005). Os LT $\gamma\delta$ desempenham várias funções diferentes, sendo uma delas a actividade citotóxica mediada pelas moléculas citoplasmáticas, perforina e granzima B (Tripodo *et al.*, 2009).

Células NK

As células NK são linfócitos grandes granulares que derivam de CLP e exibem actividade citotóxica contra células infectadas na ausência de qualquer activação prévia, pertencendo assim à imunidade inata.

Estas células reconhecem as células-alvo através de duas vias. Nalguns casos, esse reconhecimento é feito pelo nível de expressão de MHC I nas células – alvo, ou seja, células com MHC I baixo ou ausente são alvo de lise. Por outro lado, o reconhecimento é mediado por anticorpos ou ADCC (*antibody dependent cell cytotoxicity*), devido ao facto de estas células expressarem um receptor membranar de baixa afinidade para a região constante das imunoglobulinas IgG, denominado por CD16.

Os linfócitos NK possuem na sua membrana celular um grande número de receptores com funções activadoras ou inibidoras. As três principais famílias dos receptores são: a super família dos receptores semelhantes à lectina tipo C, os receptores de citotoxicidade celular e a superfamília dos KIR (*Killer cell immunoglobulin like-receptor*). Assim, quando os sinais positivos excedem os sinais negativos, as funções efectoras das células NK são iniciadas. Essas funções incluem a secreção de citocinas, TNF $-\alpha$ e IFN- γ , e citotoxicidade directa das células alvo, através das moléculas citotóxicas (perforina e granzimas) e ligação do FasL ao Fas (Kindt *et al.*, 2007).

A maioria das células NK é definida fenotipicamente pela ausência da expressão de CD3 e pela presença de CD56. Estas células, com base nos níveis de expressão de CD56, podem ser divididas em 2 subpopulações com características distintas, NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}.

As células NK CD56^{bright} expressam níveis elevados de CD56 e baixos níveis de CD16 e caracterizam-se por terem uma elevada capacidade de produção de citocinas e quimiocinas em comparação com as NK CD56^{dim}.

As células NK CD56^{dim} representam a maioria das células NK (~90%), expressam níveis moderados de CD56 e níveis altos de CD16 e KIR, o que lhes permite terem uma actividade citotóxica elevada, comparativamente com os CD56^{bright} (Cheent K e Khakoo S, 2010).

Células NKT

As células NKT expressam, simultaneamente, receptores de células NK e TCR $\alpha\beta$, podendo interagir com moléculas MHC I e moléculas MHC II. Podem ser encontrados na corrente sanguínea e em alguns órgãos, incluindo o fígado, o baço, a medula óssea e o timo. A maioria destas células são CD8⁺, contudo podem existir também células CD4⁺ e CD4⁺CD8⁺. Estes linfócitos produzem maioritariamente citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α) e grânulos citotóxicos (perforina e granzimas), podendo estar envolvidos na regulação de doenças infecciosas, auto-imunes e tumorais (Arosa *et al.*, 2007).

RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELO VHC

O sistema imunitário tem a função de eliminar a infecção por VHC sem causar danos no hospedeiro, enquanto por outro lado, o vírus tenta co-existir escapando à resposta imune. O hospedeiro procura combater a infecção de uma forma coordenada. Primeiro pela imunidade inata que sendo a primeira linha de defesa do organismo, intervém através de vários mecanismos não específicos, como a acção de células NK. Por fim, pela imunidade adquirida que já necessita da apresentação de antígenos APCs, causando a secreção de anticorpos pelos linfócitos B activos (imunidade humoral) e acção de linfócitos Th (LT CD4⁺) e CTL (LT CD8⁺) que constituem a imunidade celular.

O VHC possui muitas estratégias para fugir à resposta imune do hospedeiro, podendo afectar especificamente as células NK. Estas células são activadas na fase aguda da infecção levando ao aumento da produção de IFN- γ e de moléculas citotóxicas. Além disso, sabe-se que ocorre um aumento das células NK CD56^{bright}, comparativamente com indivíduos saudáveis. Sabe-se que, na infecção crónica, ocorre alterações na frequência, fenótipo e função das células NK, quando comparados com indivíduos saudáveis (Cheent K e Khakoo S, 2010). No entanto, vários resultados publicados

diferem quanto ao aumento ou diminuição da expressão dos marcadores de activação, receptores de citotoxicidade natural e as suas funções efectoras (Ahlenstiel *et al.*, 2010).

A alteração do perfil de citocinas produzidas pelas células NK na infecção crónica pode ser relevante para a persistência da infecção. Assim uma resposta ineficaz das células NK pode levar à incapacidade de gerar uma resposta imunitária adaptativa adequada (Cheent K e Khakoo S, 2010).

As APCs têm como função fundamental alertar o sistema imune para a presença de uma infecção viral. Desta forma, uma atenuação das interacções das APCs com os LT pode levar à diminuição da capacidade do hospedeiro em eliminar o vírus e consequentemente promover a persistência da infecção.

Em contraste com outras doenças, em que os anticorpos têm um papel essencial na eliminação dos agentes patogénicos, através da neutralização dos viriões e degradação dos antígenos estranhos, os anticorpos produzidos contra o VHC não conseguem eliminar de uma forma eficaz o vírus. A incapacidade de “montar” uma resposta humoral eficaz pode dever-se particularmente às interacções entre as proteínas virais e os receptores celulares. A proteína E2 tem um papel importante nas etapas iniciais da ligação viral aos hepatócitos. Esta proteína possui uma elevada taxa de mutação, que leva à produção de variantes de VHC, induzindo assim um decréscimo no reconhecimento e ligação aos anticorpos. Embora sejam produzidos pelo hospedeiro, anticorpos contra outras proteínas do VHC, estes não contribuem para a neutralização viral, uma vez que não são encontrados na superfície dos viriões (Sklan *et al.*, 2009).

Uma vez que a imunidade humoral não é suficiente para erradicar o VHC, a resolução da doença depende de uma resposta celular coordenada e eficaz, sendo os seus principais efectores os LT. Doentes que recuperam da infecção aguda apresentam respostas de células T específicas ao VHC acentuadas e multi-específicas. Em contraste, as respostas de células T específicas ao VHC nos doentes infectados cronicamente, são geralmente fracas, de foco limitado, e muitas vezes disfuncionais (Boettler *et al.*, 2005).

Os linfócitos Th são os principais coordenadores da resposta imune adaptativa, uma vez que podem actuar na indução e manutenção das respostas dos LT CD8⁺ e linfócitos B. Assim, uma diminuição nestas células pode atenuar as respostas LT CD8⁺ que por sua vez, leva a uma viremia prolongada. As subpopulações das células Th têm distintas funções e a sua activação pode ter consequências clínicas importantes. As células Th1 são importantes no controlo do vírus pois libertam IFN- γ , TNF- α e IL-2, activando vários mecanismos anti-virais, aumentando a expressão de moléculas MHC na

superfície das células infectadas ou activando CTL e células NK. As células Th2 medeiam a activação das células B e a secreção de anticorpos, regulando negativamente a resposta Th1 e induzindo um efeito inibitório no sistema imune do doente (Sklan *et al.*, 2009).

Contudo durante a infecção pelo VHC a libertação de IL-12 é reduzida, levando a uma diferenciação das células T CD4⁺ para um fenótipo Th2 e modificando assim a funcionalidade das células T CD4⁺. Assim, a polarização da resposta imune para Th 1 associa-se a um combate activo à infecção enquanto a evolução para infecção crónica deve-se ao predomínio da resposta Th2 (Reiner S, 2007).

Os LT CD8⁺ são importantes células efectoras do sistema imune que conduzem directa ou indirectamente à morte da célula infectada. Além da produção de citocinas anti-virais (TNF- α e IFN- γ) os CTL podem induzir a morte das células infectadas pela produção de granzima B, perforina e pela ligação Fas/FasL (Raina D e Wu G, 2004). A infecção por VHC pode prejudicar a funcionalidade destas células, dificultando a sua maturação e alterando a sua função efectora. Na infecção aguda, ocorre uma grande actividade destes CTL, estando esta resposta multi-específica associada à diminuição da infecção viral. Após a fase aguda, verifica-se uma interrupção da sua maturação, o que conduz a uma perda da sua capacidade de proliferação, das funções efectoras, com diminuição da secreção de IFN- γ e de TNF- α , e da produção de perforina e granzima B. Estas alterações conduzem a uma capacidade reduzida dos CTL para desencadear eventos intracelulares que são essenciais na eliminação viral. Além disto, a incapacidade das células T CD8⁺ de combater algumas infecções pelo VHC poderá estar relacionada com o polimorfismo genético ao nível dos antígenos de MHC I que poderão levar ao bloqueio da maturação ou à anergia destas células efectoras, ou os dois mecanismos em conjunto (Sklan *et al.*, 2009).

Resumidamente, pode se afirmar que a resposta imunológica é insuficiente para controlar a infecção pelo VHC, que se torna persistente na maioria dos doentes. Assim são necessários mais estudos para tentar compreender melhor as respostas imunes e porque falham na protecção contra o vírus.

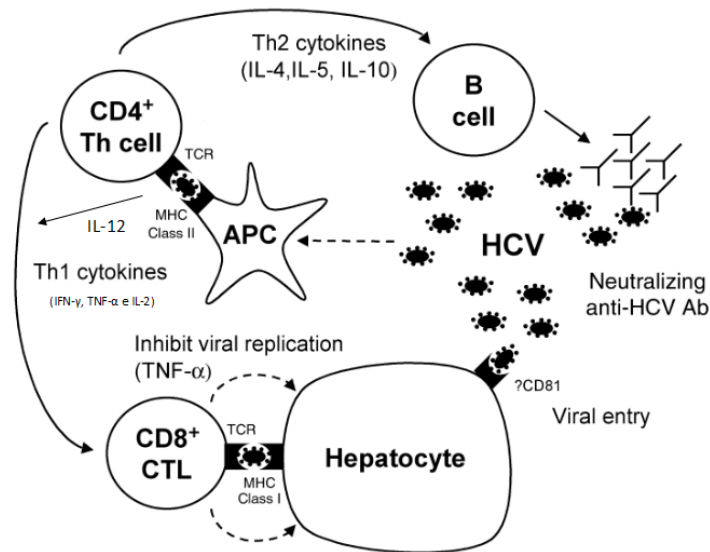


Figura 8. Representação esquemática da resposta imune adaptativa específica para o Vírus da Hepatite C. Abreviaturas: Ab, anticorpo; APC, célula apresentadora de antígeno; CD8+ CTL, Linfócitos T citotóxicos ou linfócitos T CD8+; HCV, Vírus da Hepatite C; CD4+ Th cell, células T helper ou células T CD4+ (adaptado de Freeman *et al.*, 2001).

TERAPIA DE COMBINAÇÃO DE PEG-IFN-A E RIBAVIRINA E ASSOCIAÇÃO À RESPOSTA IMUNE

Vários estudos têm sido realizados no âmbito de tentar perceber a influência do tratamento com peg-IFN- α e ribavirina na resposta imune contra o vírus da hepatite C, pois como referido anteriormente este tratamento é pouco eficaz.

Os mecanismos imunológicos do hospedeiro têm uma importância primordial na eliminação viral após a terapêutica. Os doentes que mantêm uma resposta sustentada após o tratamento apresentam uma carga viral baixa e uma resposta imune celular específica activa pré-tratamento, que vai ser amplificada durante a terapêutica. Por outro lado, os doentes que na fase antes do tratamento apresentam uma resposta imune celular pouco expressiva, não vão modificar muito essa resposta durante o tratamento e vão ser não respondedores no final da terapia (Caetano *et al.*, 2008; Lasarte *et al.*, 1998 e Lohr *et al.*, 1999).

Durante a terapia, ocorre um aumento da citotoxicidade das células NK, isto pode dever-se ao aumento da desgranulação e da capacidade de induzir apoptose. Além disso, sabe-se que a resposta ao tratamento leva ao aumento de número de células NK (Cheent K e Khakoo S, 2010).

O peg-IFN- α e a ribavirina têm ambos efeitos imunomoduladores conduzindo ao aumento da resposta Th1 e conseqüente inibição da resposta Th2. Além disso, o IFN estimula a activação das células NK e dos LT (Myrmel *et al.*, 2009 e Tilg H, 1997).

CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo (CF) é uma técnica multiparamétrica de partículas em suspensão, permitindo analisar qualitativamente e quantitativamente cada partícula individualmente.

O uso da CF tem vindo a aumentar substancialmente nos laboratórios clínicos, devido sobretudo ao desenvolvimento de citómetros mais pequenos, menos dispendiosos e mais fáceis de usar. A CF tem uma ampla aplicação clínica em imunologia, oncologia, hematologia e doenças genéticas, podendo recorrer-se à análise de uma grande variedade de amostras, como sangue total, medula óssea, urina e tecidos sólidos (Brown M e Wittwer C, 2000).

Princípios da técnica

Um citómetro de fluxo é composto por 3 sistemas principais: fluidos, ópticos e electrónicos. O sistema de fluidos transporta as partículas através da câmara de fluxo. O sistema óptico é composto pelos lasers e filtros ópticos. O sistema electrónico converte sinais de luz em sinais electrónicos que podem ser processados por um computador.

A suspensão celular incluída na corrente de fluxo laminar de um líquido condutor, atravessa a câmara de fluxo, onde ocorre a passagem de cada partícula uma a uma. Essa câmara é atravessada por um ou mais lasers com um comprimento de onda pré - estabelecido. Sempre que um laser intercepta uma célula, a radiação vai sofrer dispersão quer na direcção do feixe de luz (*Forward Scatter* – FSC) quer lateralmente (*Side Scatter* – SSC) num ângulo de 90°.

O FSC é detectado por fotodíodos, que são menos sensíveis aos sinais luminosos, e dá-nos informação sobre o tamanho celular, baseado na difracção da luz.

O SSC mede a luz refractada, sendo proporcional à granularidade / complexidade celular e é detectado por tubos fotomultiplicadores (PMTs).

Compostos intracelulares ou passíveis de se ligar a moléculas fluorescentes (fluorocromos), permitem a diferenciação selectiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos. Os fluorocromos absorvem a luz num determinado comprimento de onda e depois emitem-na noutra comprimento de onda superior. A fluorescência destes compostos é também detectada por PMTs, através de um sistema de lentes, espelhos dicrónicos e filtros ópticos. Os filtros ópticos são colocados em frente aos PMTs, de forma a permitir que cada detector seja específico para uma gama estreita de comprimentos de onda.

Os sinais luminosos são convertidos em sinais electrónicos pelos fotodetectores (fotodíodos e PMTs) e estes, por sua vez, são convertidos em sinais digitais, que são armazenados no computador. As células são depois agrupadas em diferentes formatos consoante o número de parâmetros analisados: só um parâmetro (histogramas), 2 ou 3 parâmetros em simultaneamente (2-D plot ou 3-D plot) (BD Biosciences, 2000 e Silva *et al.*, 2004).

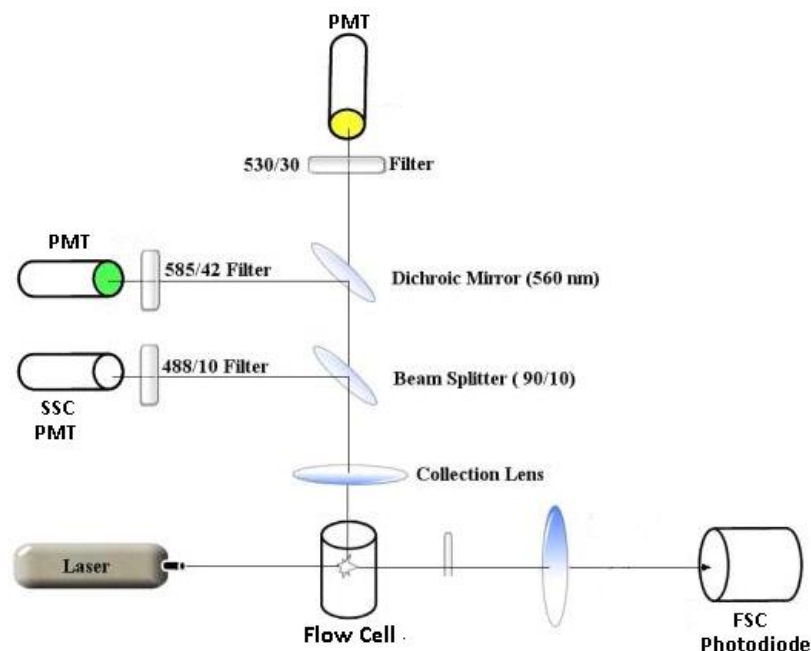


Figura 9. Representação esquemática do sistema óptico do citómetro de fluxo (adaptado de <http://www.biology.sjsu.edu/specialprogs/flocyto/html/fc-p03.html>).

Capítulo 2

Objetivos

Dada a influência da resposta imune no controlo da infecção por vírus da hepatite C e na resposta ao tratamento, o objectivo principal deste trabalho foi caracterizar a resposta imune em doentes com infecção crónica por vírus da hepatite C, submetidos a tratamento com interferão- α peguilado e ribavirina, ao longo do tratamento. Além disso, também se comparou as respostas imunes nos doentes respondedores à terapia e nos não respondedores, de modo a detectar um biomarcador preditivo da resposta à terapêutica.

Para alcançar este objectivo procedeu-se ao estudo de um grupo de indivíduos infectados cronicamente com VHC e de um grupo de indivíduos controlo, utilizando amostras de sangue periférico. Deste modo pode comparar-se os resultados obtidos, relativamente à:

- Quantificação de linfócitos T e das suas subpopulações (LT CD4⁺, LT CD4⁺/CD56⁺, LT CD4⁺/CD56⁻, LT CD8⁺, LT CD8⁺/CD56⁺, LT CD8⁺/CD56⁻, LT CD4⁺/CD8⁺, LT CD4⁺/CD8⁺/CD56⁺, LT CD4⁺/CD8⁺/CD56⁻, LT $\gamma\delta$ e LTreg).
- Quantificação de células NK e das suas subpopulações (NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}).
- Frequência das subpopulações de LT e de células NK com fenótipo citotóxico, avaliando a expressão de perforina e granzima B, bem como a quantidade destas moléculas produzidas por célula.
- Frequência das subpopulações de LT CD4⁺ e LT CD8⁺ produtoras de IFN- γ e TNF- α , após activação, assim como as subpopulações de células NK produtoras destas citocinas. Avaliando-se também a quantidade de citocinas produzidas por célula.

POPULAÇÃO EM ESTUDO

A população em estudo envolveu dois grupos, um grupo de doentes com infecção crónica por VHC submetido a terapêutica com peg-IFN- α e a ribavirina e um grupo controlo. Estes doentes foram acompanhados num hospital da região de Coimbra (Centro Hospitalar Universitário de Coimbra-CHUC).

Foram colhidas amostras de sangue periférico de 20 doentes cronicamente infectados por VHC, 16 homens com uma média de idade $40,27 \pm 7,27$ e 4 mulheres com $47,25 \pm 11,30$. Estes doentes apresentavam carga viral elevada $299860,92 \pm 256164,79$ (UI/ml), antes do início do tratamento.

Para controlos, recorreu-se a 19 indivíduos saudáveis, 15 homens com uma média de idade $45,08 \pm 11,74$ e 4 mulheres $44,83 \pm 11,60$.

O grupo dos doentes foi também, posteriormente, dividido em dois subgrupos de acordo com a resposta à terapêutica anti-viral, respondedores e não -respondedores.

MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de sangue periférico foram colhidas por punção venosa para 2 tubos de recolha de sangue, um tubo com EDTA e outro com heparina de lítio. Esses tubos apresentam tampas de cores diferentes para facilitar a sua identificação, cor roxa e cor verde, respectivamente.

O tubo de sangue de EDTA foi utilizado no hemograma, fenotipagem e estudo da actividade citotóxica. Por outro lado, o tubo de sangue em heparina de lítio foi usado na activação dos linfócitos.

As amostras de sangue dos doentes foram colhidas em vários tempos, antes do início do tratamento (mês 0) e ao 1^o, 3^o, 6^o mês de tratamento.

IMUNOFENOTIPAGEM

A análise fenotípica dos linfócitos do sangue periférico foi efectuada, por marcação directa de sangue total, a oito cores, utilizando anticorpos monoclonais (mAb) conjugados directamente com moléculas fluorescentes, chamadas de fluorocromos.

Num tubo de citómetro, pipetou-se 150 µL de SP colhido em EDTA e adicionou-se os diferentes mAb conjugados com os respectivos fluorocromos (tabela I). Os volumes utilizados foram os recomendados pelos fabricantes.

De seguida, homogeneizou-se no vortéx e colocou-se a incubar durante 15 minutos, protegidos da luz à temperatura ambiente, de modo a garantir as condições óptimas de ligação dos mAb à superfície das células e evitando a perda de fluorescência pelos fluorocromos conjugados aos monoclonais.

Tabela I. Marcação utilizada para o estudo fenotípico dos linfócitos.

mAb	Fluorocromos	Clone	Origem
CD3	PerCp 5.5 (<i>peridin chlorophyll protein cy 5.5</i>)	SK7	BD Biosciences
CD56	PC7 (<i>Phycoerythrin-Cyanine 7</i>)	N901	Beckman Coulter
CD127	Alexa	HIL-7R-M21	BD Pharmingen™
CD25	APC H7 (<i>allophycocyanin H7</i>)	M-A251	BD Pharmingen™
CD4	PB (<i>pacific blue</i>)	clone RPA-T4	BD Pharmingen™
CD8	V500-PO (<i>pacific orange</i>)	clone RPA-T8	BD Horizon
mAb intracitoplasmático			
Perforina	FITC (fluorescein isothiocyanate)	δG9	BD Pharmingen™
Granzima B	PE (<i>phycoerythrin</i>)	CLB-GB-11	Pelicluster™

Findo esse tempo, as células foram fixadas e permeabilizadas usando o kit *Intraprep* (Beckman Coulter) composto por 2 soluções. Num primeiro passo, as células foram fixadas com a solução 1. Após lavagem com tampão fosfato salino (PBS) e

centrifugação (1500 rpm, 5 minutos), foi induzida a permeabilização com a solução 2. Depois, adicionou-se os mAb intracitoplasmáticos (tabela I), sendo os volumes utilizados recomendados pelos fabricantes.

Homogeneizou-se no vortéx e realizou-se, de novo, uma incubação, nas mesmas condições anteriores.

Procedeu-se, a uma última lavagem e centrifugação, nas condições mencionadas anteriormente, seguida de rejeição do sobrenadante, com o objectivo de eliminar os anticorpos que não ligaram.

Por fim, ressuspendeu-se as células em 250 μ L de PBS para posterior aquisição no citómetro.

AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO

O perfil citotóxico das células foi avaliado no tubo utilizado na imunofenotipagem, mais precisamente na análise da expressão dos mAb intracitoplasmáticos, perforina e granzima.

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Foi também avaliada a capacidade das células para produzir citocinas como o IFN- γ e o TNF- α , após estimulação *in vitro*. As citocinas produzidas foram detectadas através de anticorpos monoclonais específicos após permeabilização da membrana celular.

Activação dos linfócitos

Procedeu-se a cultura de células num tubo de citómetro, durante 4 horas, em ambiente estéril, a 37 ° C e em atmosfera húmida com 5% CO₂. Para tal, 500 μ L de SP colhido em heparina de lítio foi cultivado em meio de cultura com 500 μ L de RPMI-1640 (*Gibco*), suplementado com 2 mM de L – glutamina, na presença de 2 μ L de Brefeldina

A (10 µg /ml; *Sigma*), 2 µL de ionomicina (1 µg / ml; *Sigma*) e 25 µL de uma diluição de 1:10 de *phorbol 12-myristate 13 acetate* (PMA) com PBS (50 ng / ml; *Sigma*).

A brefeldina A é um inibidor do transporte de proteínas, ou seja, interfere com o transporte vesicular do RE para o complexo de golgi, permitindo assim que as citocinas sintetizadas pelas células se acumulem no seu interior. Deste modo, é possível realizar posteriormente uma marcação intracelular das citocinas a estudar (Fujiwara *et al.*, 1988).

A ionomicina actua como um potente e selectivo ionóforo de Ca²⁺, aumentando os níveis de cálcio intracelular e assim permitindo estimular a produção de citocinas (Chatila *et al.*, 1989).

O PMA diluído estimula os linfócitos de modo a facilitar a produção de citocinas (Farrar *et al.*, 1980).

Marcação intra-citoplasmática das citocinas

A marcação intracitoplasmática foi efectuada conforme previamente descrito no ponto 3.3. Recorreu-se às células activadas anteriormente para essa marcação. Os mAb usados para essa marcação encontram-se descritos na tabela II.

Tabela II. Marcação utilizada na avaliação da produção de citocinas pelos linfócitos.

mAb	Fluorocromos	Clone	Origem
CD3	PerCp 5.5	SK7	BD Biosciences
CD56	PC7	N901	Beckman Coulter
CD8	APC	clone B9.11	Beckman Coulter
Citocina			
IFN-γ	FITC	MAb11	BD Pharmingen
TNF-α	PE	4S.B3	BD Pharmingen

AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a aquisição dos dados recorreu-se ao citómetro de fluxo BD FACS - Canto II (BD *Biosciences*) equipado com três lasers (um azul – 488 nm, um vermelho – 635 nm e um violeta – 405 nm), 2 detectores de dispersão de luz e 8 detectores de fluorescência, o que permitiu avaliar 8 fluorescências em simultâneo. A leitura das amostras no citómetro foi efectuada através da aplicação informática BD FACSDiva (BD *Biosciences*).

Cada amostra foi adquirida em duas etapas consecutivas. Na primeira etapa foram recolhidos e guardados 5×10^4 eventos que correspondem a todas as células nucleadas presentes na amostra. Na segunda etapa, apenas se guardou a informação dos dados referentes aos linfócitos e nesta etapa, a amostra foi obtida até esgotar.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

De forma a analisar a expressão antigénica dos dados, adquiridos por citometria de fluxo, recorreu-se ao programa Infinicyt (Cytognos). As várias populações celulares estudadas foram seleccionadas através de diferentes estratégias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. A análise estatística foi realizada com o auxílio dos programas Excel e *Statistical Package for Social Sciences*, versão 17.0 (SPSS) para o *Windows*. Foram utilizados 3 tipos de testes estatísticos não paramétricos: o teste U de *Mann-Whitney* para comparação entre grupos, o teste de *Wilcoxon* para comparar os tempos de terapia em grupos de 2, e o teste de *Friedman* para comparar todos os tempos de terapia. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$.

Capítulo 4

Resultados

QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DAS SUAS SUBPOPULAÇÕES DO SANGUE PERIFÉRICO

Os LT foram divididos em 4 populações distintas, definidas como LT CD4⁺, LT CD8⁺, LT CD4⁺/CD8⁺ e LT $\gamma\delta$, com base na expressão do TCR, de CD4 e CD8. Além disso, ainda existe uma pequena percentagem de LT, dentro das subpopulações LT CD4⁺, LT CD8⁺, LT CD4⁺/CD8⁺, que expressa CD56, denominados por NKT (Arosa *et al.*, 2007). A subpopulação de LT CD4⁺ também engloba os LTreg.

Assim efectuou-se a quantificação dos LT e das suas subpopulações em termos de percentagem e valor absoluto, encontrando-se esses valores representados na tabela III.

No grupo dos doentes, antes do início da terapia, observou-se um decréscimo estatisticamente significativo na percentagem e valor absoluto de LT, comparativamente ao grupo controlo. Estes valores vão aumentando ao longo da terapêutica principalmente em termos relativos (frequência de células T).

Uma vez que ocorre linfopenia T absoluta (diminuição no número de linfócitos T por microlitro de sangue), esta vai influenciar os valores absolutos de todas as populações *major* de linfócitos T (LT CD4⁺, LT CD8⁺, LT CD4⁺/CD8⁺, LT $\gamma\delta$ e LTreg).

Em termos percentuais ocorre uma diminuição dos LT CD4⁺ e dos LTreg, nos doentes antes do início da terapia, comparativamente ao grupo controlo, observando-se um aumento ao longo da resposta à terapêutica.

Pelo contrário, observou-se um aumento na frequência das células T CD8⁺, das células T CD4⁺/CD8⁺ e das células $\gamma\delta$, nos doentes antes do início da terapia, em comparação com os indivíduos saudáveis, havendo uma tendência para estas frequências diminuírem ao longo do tratamento.

Além disso, nos doentes, antes da terapia, observou-se um aumento na percentagem e valor absoluto dos LT CD4⁺/CD56⁺, comparativamente ao grupo controlo. No entanto, verificou-se um decréscimo destes valores durante a terapia.

Observou-se uma diminuição no valor absoluto dos LT CD8⁺/CD56⁺ antes e durante a terapêutica. Relativamente à percentagem destas células apenas se verificou uma diminuição durante a terapia.

Verificou-se também uma diminuição na percentagem e valor absoluto dos LT CD4⁺/CD8⁺/CD56⁺ antes e durante a terapia.

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NK E DAS SUAS SUBPOPULAÇÕES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células NK foram divididas em duas subpopulações distintas com base na expressão de CD56: NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}. Estando a percentagem e valor absoluto destas células representados na tabela IV.

No grupo dos doentes, antes do início da terapia, observou-se um decréscimo na percentagem e valor absoluto das células NK, comparativamente ao grupo controlo. Durante a terapia, os valores percentuais destas células foram superiores aos valores pré-tratamento, enquanto o seu valor absoluto foi menor.

Observou-se, no grupo dos doentes, antes de iniciarem a terapia, um aumento na percentagem e valor absoluto da população NK CD56^{bright} e conseqüentemente uma diminuição das células NK CD56^{dim}, quando comparado com os indivíduos saudáveis.

Verificou-se que o valor absoluto pós-tratamento em ambas as subpopulações de células NK foi inferior ao observado antes do tratamento.

Durante a terapia, em termos de percentagem relativa dentro das células NK, observou-se um decréscimo da subpopulação NK CD56^{bright} e por outro lado, um aumento na subpopulação NK CD56^{dim}.

AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T

Avaliou-se o perfil citotóxico das subpopulações de LT descritas anteriormente, excepto dos LTreg, com base na expressão de perforina e de granzima B, encontrando-se estes valores representados na tabela V.

Verificou-se que os LT CD4⁺ expressam menos moléculas com actividade citotóxica, enquanto os LT CD8⁺ são os que apresentam uma expressão mais acentuada dessas moléculas. Além disso, é nos LT CD4⁺ que se encontra uma menor percentagem de células a expressar essas moléculas.

Quando avaliada a percentagem de células a expressar as moléculas relacionadas com a citotoxicidade nos LT, verificou-se um aumento da frequência de todas as

subpopulações de LT a expressarem perforina e granzima B, no entanto a expressão destas moléculas (dada pela MIF) foi menor no grupo dos doentes, antes da terapia, comparativamente com o grupo controlo.

Observou-se uma tendência para a frequência dos LT $CD8^+/CD56^+$, LT $CD4^+/CD8^+/CD56^+$ e LT $\gamma\delta$ a expressarem ambas as moléculas com actividade citotóxica aumentarem ao longo da terapia, enquanto nas restantes subpopulações verificou-se uma diminuição comparativamente com as percentagens obtidas antes da do início da terapia. Relativamente, à expressão de perforina e granzima B, verificou-se um aumento na expressão de ambas em todas as subpopulações de LT durante a terapia, quando comparado com os valores antes do tratamento.

AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DAS SUBPOPULAÇÕES DAS CÉLULAS NK

Avaliou-se o perfil citotóxico das subpopulações das células NK com base na expressão de perforina e de granzima B, encontrando-se estes valores representados na tabela VI.

Quando se comparou as duas subpopulações de células NK verificou-se que a subpopulação NK $CD56^{dim}$ é mais citotóxica.

Em ambas as subpopulações de células NK observou-se um aumento significativo na percentagem de células a expressar perforina e granzima B, no grupo dos doentes, antes da terapia, comparativamente ao grupo controlo e de uma maneira geral ao longo da resposta ao tratamento.

No entanto quando se analisou a quantidade destas moléculas por célula (dada pela MIF), verificou-se um aumento na expressão de perforina, acompanhado de um decréscimo na expressão de granzima B, antes do início da terapêutica, nos doentes comparativamente aos indivíduos saudáveis. Ao longo da resposta à terapêutica observou-se em ambas as subpopulações de células NK, um aumento da expressão das duas moléculas com actividade citotóxica.

Tabela III. Percentagem (%) e valor absoluto (Células/ μ L) de linfócitos T (LT) e das suas subpopulações, no sangue periférico, no grupo controlo e nos doentes ao longo do tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.

	Grupo de doentes com infecção crónica por VHC						Grupo controlo
	Tempo (meses)						
	0	1	3	6			
LT							
%	15,75 \pm 4,67 ^{¥,A,B,C,Δ}	35,51 \pm 9,84 ^E	28,73 \pm 6,69	25,78 \pm 8,6		23,48 \pm 6,07	
Células/ μ L	1233,95 \pm 616,79 ^{¥,B,Δ}	1346,96 \pm 568,98 ^D	1017,6 \pm 610,62	1122,7 \pm 665,42		1610,83 \pm 414,89	
%	55,7 \pm 10,49 ^{ΔC}	60,76 \pm 8,45 ^{D,E}	59,72 \pm 10,17 ^F	63,14 \pm 10,11		60,11 \pm 7,66	
Células/ μ L	687,94 \pm 367,52 ^{¥,B,Δ}	819,99 \pm 377,04 ^D	627,08 \pm 430,41	692,45 \pm 392,31		960,81 \pm 240,44	
CD56+							
%	2,58 \pm 2,12 [¥]	2,73 \pm 2,25 ^E	1,92 \pm 1,76	1,68 \pm 1,32		1,23 \pm 1,06	
Célula/ μ L	17,14 \pm 13,43 ^{B,C}	18,48 \pm 17,27 ^{D,E}	9,67 \pm 7,09	7,45 \pm 6,33		11,31 \pm 10,00	
LTreg							
%	3,34 \pm 1,13 ^Δ	2,91 \pm 1,04 ^D	3,95 \pm 1,04	3,51 \pm 1,11		3,43 \pm 0,83	
Células/ μ L	21,86 \pm 12,16 [¥]	22,74 \pm 14,82	23,26 \pm 15,67	22,90 \pm 14,05		37,38 \pm 18,07	
LT CD8+							
%	36,89 \pm 10,83 ^{ΔC}	34,04 \pm 9,11	32,82 \pm 9,57	31,91 \pm 9,96		33,17 \pm 6,63	
Células/ μ L	456,91 \pm 271,67 ^B	450,89 \pm 224,26 ^D	317,37 \pm 178,07	374,83 \pm 310,80		540,59 \pm 222,12	
CD56+							
%	14,00 \pm 10,18	12,62 \pm 9,03	13,97 \pm 8,81	11,00 \pm 6,63		13,81 \pm 7,64	
Células/ μ L	53,07 \pm 43,58 ^B	58,72 \pm 54,11 ^D	42,48 \pm 39,40	38,22 \pm 37,38		72,11 \pm 41,97	
LT							
%	0,92 \pm 0,70 ^{B,C,Δ}	0,73 \pm 0,54	0,69 \pm 0,57	0,59 \pm 0,30		0,81 \pm 0,57	
Células/ μ L	11,40 \pm 8,51 ^{A,B,C,Δ}	8,37 \pm 7,19	6,89 \pm 6,40	5,67 \pm 3,56		12,35 \pm 9,03	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺							
%	10,94 \pm 6,48	14,74 \pm 10,12 ^{D,E}	9,63 \pm 5,10	8,72 \pm 4,52		13,20 \pm 7,04	
Células/ μ L	1,03 \pm 0,97 ^{B,C}	1,01 \pm 0,87	0,72 \pm 0,69	0,45 \pm 0,42		1,69 \pm 1,56	
LT $\gamma\delta$							
%	5,03 \pm 4,41	4,96 \pm 2,39 ^E	5,15 \pm 3,74 ^F	3,51 \pm 1,47		4,75 \pm 3,83	
Células/ μ L	63,30 \pm 61,16	67,95 \pm 46,58 ^{D,E}	49,52 \pm 38,54	33,68 \pm 31,68		77,14 \pm 65,95	

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de Mann-Whitney; ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controlo; teste de Wilcoxon: A antes do tratamento (mês 0) vs 1º mês de terapia, B mês 0 vs 3º mês de terapia, C mês 0 vs 6º mês de terapia, D 1º mês de terapia vs 3º mês de terapia, E 1º mês de terapia vs 6º mês de terapia, F 3º mês de terapia vs 6º mês de terapia; Teste de Friedman: Δ mês 0 vs 1º mês vs 3º mês vs 6º mês de terapia.

Tabela IV. Percentagem (%) e valor absoluto (Células/ μ L) de células NK e das suas subpopulações, no sangue periférico, no grupo controlo e no grupo de doentes durante o tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.

	Grupo de doentes com infeção crónica por VHC					Grupo controlo
	Tempo (meses)					
	0	1	3	6		
%	2,34 \pm 2,02 ^{¥,A,A}	4,11 \pm 2,63	3,56 \pm 1,81	3,85 \pm 2,17	4,63 \pm 2,52	
Células / μ L	188,63 \pm 175,01 [¥]	169,28 \pm 140,00	122,03 \pm 81,20	169,31 \pm 119,19	319,83 \pm 191,39	
CD56 ^{dim}	88,97 \pm 2,58 ^{¥,A,B,C,Δ}	90,73 \pm 4,91	91,22 \pm 2,91	91,81 \pm 2,60	95,35 \pm 2,44	
Células NK	161,98 \pm 154,65 [¥]	157,15 \pm 136,16	112,78 \pm 77,22	154,94 \pm 109,05	304,98 \pm 183,20	
CD56 ^{bright}	11,03 \pm 2,58 ^{¥,A,B,C,Δ}	9,26 \pm 4,91	8,78 \pm 2,91	8,19 \pm 2,60	4,65 \pm 2,44	
Células / μ L	20,55 \pm 19,26	12,11 \pm 9,30	9,25 \pm 4,69	14,37 \pm 10,84	14,85 \pm 10,52	

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de Mann-Whitney: ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controlo; teste de Wilcoxon: A antes do tratamento (mês 0) vs 1º mês de terapia, B mês 0 vs 3º mês de terapia, C mês 0 vs 6º mês de terapia, D 1º mês de terapia vs 3º mês de terapia, E 1º mês de terapia vs 6º mês de terapia, F 3º mês de terapia vs 6º mês de terapia; Teste de Friedman: Δ mês 0 vs 1º mês vs 3º mês vs 6º mês de terapia.

Tabela V. Perfil citotóxico das subpopulações de linfócitos T (LT), no sangue periférico, no grupo controlo e nos doentes ao longo do tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.

		Grupo de doentes com infecção crónica por VHC						Grupo controlo
		Tempo (meses)						
		0	1	3	6			
LT CD4 ⁺ / CD56 ⁺	Perforina	7,12 \pm 6,23 ^{A,¥}	2,81 \pm 1,91	3,18 \pm 2,84	3,88 \pm 2,34	1,53 \pm 1,21		
	MIF	574,93 \pm 205,14 ^{A,C,¥,A}	1070,65 \pm 552,30	499,52 \pm 256,44 ^F	1020,78 \pm 698,20	1723,72 \pm 894,49		
LT CD4 ⁺	Granzima B	8,99 \pm 6,57 ^A	3,96 \pm 2,50	5,19 \pm 2,77 ^F	7,32 \pm 3,97	7,40 \pm 4,76		
	MIF	779,44 \pm 468,22 [¥]	1060,78 \pm 869,28	1285,66 \pm 1196,28	1425,63 \pm 837,81	2195,61 \pm 1842,31		
LT CD4 ⁺ / CD56	Perforina	2,64 \pm 2,46 ^{B,¥}	1,69 \pm 1,28	1,02 \pm 0,83	1,14 \pm 0,63	1,09 \pm 0,85		
	MIF	555,58 \pm 236,64 ^{A,B,C,¥,A}	874,46 \pm 489,56	823,95 \pm 650,60	887,64 \pm 393,00	1465,38 \pm 561,96		
LT CD8 ⁺ / CD56 ⁺	Granzima B	3,45 \pm 2,98 ^B	2,55 \pm 1,86	1,22 \pm 0,66	2,19 \pm 1,16	2,72 \pm 2,53		
	MIF	788,85 \pm 367,95 [¥]	885,39 \pm 747,71 ^E	1068,84 \pm 712,18	1406,96 \pm 843,15	1495,30 \pm 1091,94		
LT CD8 ⁺ / CD56 ⁺	Perforina	50,72 \pm 22,73 ^{C,¥,A}	51,62 \pm 27,74	61,55 \pm 27,17	69,84 \pm 20,63	6,82 \pm 6,32		
	MIF	1112,83 \pm 521,71 ^{A,B,C,A}	2270,71 \pm 1502,95	1907,55 \pm 993,00	2599,88 \pm 1622,52	1417,74 \pm 603,86		
LT CD8 ⁺	Granzima B	58,63 \pm 23,58 ^{B,¥,A}	47,98 \pm 24,65 ^{D,E}	66,06 \pm 22,40	66,00 \pm 19,79	28,83 \pm 16,31		
	MIF	1428,9 \pm 608,53 ^{B,C,A}	2012,67 \pm 1500,09	2269,01 \pm 1537,44	2551,69 \pm 1090,56	1943,35 \pm 1163,75		
LT CD8 ⁺ / CD56	Perforina	23,09 \pm 17,36 ^{B,¥,A}	22,62 \pm 17,44	23,76 \pm 18,30	20,28 \pm 10,16	4,28 \pm 3,78		
	MIF	1046,79 \pm 577,31 ^{A,C,A}	2057,45 \pm 1163,78	1616,91 \pm 880,58	2081,91 \pm 1075,30	1260,50 \pm 586,88		
LT CD4 ⁺ / CD8 ⁺	Granzima B	37,48 \pm 23,42	22,64 \pm 17,37 ^D	27,44 \pm 15,79 ^F	26,95 \pm 12,30	23,78 \pm 16,90		
	MIF	1288,15 \pm 522,71 ^{B,C,A}	1745,08 \pm 1278,53 ^E	2044,10 \pm 1360,13	2752,43 \pm 1781,47	1759,73 \pm 1002,65		
LT CD4 ⁺ / CD8 ⁺	Perforina	43,29 \pm 21,87 [¥]	43,13 \pm 23,30	41,43 \pm 21,69	50,41 \pm 18,85	4,08 \pm 2,52		
	MIF	862,90 \pm 471,87 ^{C,¥}	1194,65 \pm 583,09	1577,24 \pm 1389,75	1211,18 \pm 775,68	1824,90 \pm 1065,59		
LT CD4 ⁺ / CD8 ⁺	Granzima B	57,62 \pm 24,87 [¥]	43,26 \pm 26,51	47,30 \pm 29,84	58,29 \pm 21,41	18,42 \pm 16,16		
	MIF	1073,67 \pm 923,82	1694,86 \pm 1449,21	1657,35 \pm 1140,99	1395,47 \pm 969,67	1821,41 \pm 1627,06		
LT CD4 ⁺ / CD56	Perforina	28,09 \pm 17,15 [¥]	23,85 \pm 14,83	20,94 \pm 12,23	22,32 \pm 9,33	1,62 \pm 1,17		
	MIF	887,37 \pm 372,36 ^{A,¥}	1386,61 \pm 858,57	1208,22 \pm 1046,65	1196,05 \pm 781,64	1818,03 \pm 963,14		
LT $\gamma\delta$	Granzima B	34,93 \pm 21,85	25,66 \pm 16,13	24,30 \pm 16,61	22,30 \pm 12,29	21,58 \pm 18,84		
	MIF	1076,81 \pm 695,93 [¥]	1032,40 \pm 816,74	1431,68 \pm 891,50	1960,41 \pm 1542,27	2104,69 \pm 1468,05		
LT $\gamma\delta$	Perforina	30,49 \pm 22,15 ^{B,C,¥,A}	35,31 \pm 23,57 ^E	53,06 \pm 26,98	56,25 \pm 17,97	8,43 \pm 7,20		
	MIF	1026,75 \pm 495,08 ^{A,B,C,¥,A}	1489,15 \pm 678,84	1457,03 \pm 729,18	1903,42 \pm 1075,08	2032,94 \pm 999,84		
LT $\gamma\delta$	Granzima B	41,50 \pm 20,89 ^{B,C,A}	36,66 \pm 20,67 ^{D,E}	58,49 \pm 20,24	53,53 \pm 19,09	29,44 \pm 18,59		
	MIF	1083,30 \pm 520,19 ^C	1351,66 \pm 1011,28 ^E	1474,78 \pm 814,71	1634,67 \pm 804,22	1965,30 \pm 1515,34		

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de Mann-Whitney: ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controlo; teste de Wilcoxon: ^A antes do tratamento (mês 0) vs 1^o mês de terapia, ^B mês 0 vs 3^o mês de terapia, ^C mês 0 vs 6^o mês de terapia, ^D 1^o mês de terapia vs 3^o mês de terapia, ^E 1^o mês de terapia vs 6^o mês de terapia, ^F 3^o mês de terapia vs 6^o mês de terapia; Teste de Friedman: ^A mês 0 vs 1^o mês vs 3^o mês vs 6^o mês de terapia. MIF - média de intensidade de fluorescência.

Tabela VI. Perfil citotóxico das células NK e das suas subpopulações, no sangue periférico, no grupo controlo e no grupo dos doentes ao longo do tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão.

	Grupo de doentes com infecção crónica por VHC					Grupo controlo	
	0	1	3	6	6		
Células NK	Perforina	%	75,44 \pm 19,56 [¥]	74,33 \pm 24,45	75,57 \pm 14,77	76,63 \pm 12,90	44,96 \pm 22,21
	Granzima B	MIF	2690,90 \pm 1671,33 ^{¥,A,B,C,Δ}	4113,99 \pm 1990,69	4702,33 \pm 2436,52	5342,33 \pm 2021,38	1442,57 \pm 823,64
		%	74,32 \pm 17,55 ^{¥,A,C,Δ}	56,11 \pm 25,33	60,15 \pm 19,28	53,79 \pm 17,36	53,11 \pm 26,46
	Perforina	MIF	1714,08 \pm 696,65 ^{B,C,Δ}	2409,25 \pm 1961,43	3497,68 \pm 2380,76	3404,39 \pm 2047,31	2140,79 \pm 1103,57
Células CD56 ^{bright}	Granzima B	%	3,29 \pm 2,63 ^{¥,Δ}	3,46 \pm 2,58 ^{D,E}	2,52 \pm 2,22	2,17 \pm 1,95	1,32 \pm 1,14
		MIF	1399,15 \pm 1009,24 ^{A,B}	2762,06 \pm 1721,79	2743,39 \pm 1700,59	2198,99 \pm 1827,00	1194,32 \pm 1026,01
	Granzima B	%	13,45 \pm 12,36 ^{B,C,¥,Δ}	9,60 \pm 7,10 ^E	6,64 \pm 2,01	6,21 \pm 2,08	4,65 \pm 3,33
		MIF	966,33 \pm 451,40 ^{A,B,C,¥,Δ}	1839,24 \pm 1572,48	1989,10 \pm 1265,24	2159,91 \pm 1481,31	1786,54 \pm 1114,42

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de *Mann-Whitney*: ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controlo; teste de *Wilcoxon*: ^A antes do tratamento (mês 0) vs 1º mês de terapia, ^B mês 0 vs 3º mês de terapia, ^C mês 0 vs 6º mês de terapia, ^D 1º mês de terapia vs 3º mês de terapia, ^E 1º mês de terapia vs 6º mês de terapia, ^F 3º mês de terapia vs 6º mês de terapia; Teste de *Friedman*: ^Δ mês 0 vs 1º mês vs 3º mês vs 6º mês de terapia.

FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T PRODUTORAS DE CITOCINAS E QUANTIDADE DE CITOCINA POR CÉLULA

Procedeu-se à quantificação da frequência de células T produtoras de citocinas (IFN- γ e o TNF- α) e da quantidade de citocina por célula, após estimulação *in vitro*, durante 4 horas, com PMA e ionomicina, na presença de brefeldina A. Este procedimento apenas se realizou nas diferentes subpopulações de LT CD4⁺ e LT CD8⁺. Na figura 10 e 11 estão representados os valores das frequências de células T a produzirem IFN- γ e TNF- α , bem como, a expressão destas citocinas, respectivamente.

Observou-se que existem mais células produtoras de IFN- γ e TNF- α , nas subpopulações de células T que expressam CD56 comparativamente às subpopulações que não expressam CD56. Contudo, quando se analisou a frequência de células produtoras de IFN- γ e TNF- α , nas subpopulações de LT que não expressam o CD56, verificou-se que é na subpopulação LT CD8⁺ que se encontra um maior número de células produtoras de IFN- γ (figura 10 e 11).

No grupo dos doentes, antes do início da terapia, observou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência de todas as células T produtoras de IFN- γ e na quantidade desta citocina por célula, comparativamente ao grupo controlo. Verificou-se que existe uma tendência para a frequência destas células diminuir com a terapia, enquanto a expressão de IFN- γ possui tendência para aumentar (figura 10).

Na mesma linha, observou-se um aumento na frequência de todas as células T produtoras de TNF- α , no grupo dos doentes, antes do início da terapia, em comparação com o grupo controlo. Esse aumento foi estatisticamente significativo excepto na subpopulação LT CD8⁺/CD56⁻. Durante a terapia, observou-se uma tendência para a frequência das células produtoras de TNF- α na subpopulação de LT CD8⁺/CD56⁺ diminuir, não se encontrando diferenças nas outras subpopulações (figura 11.a e 11.b). Relativamente à quantidade de TNF- α por célula, observou-se um aumento sem significado estatístico em ambas as subpopulações de LT CD8⁺, antes do início da terapia, nos doentes comparativamente com o grupo controlo. Além disso, verificou-se uma tendência para a expressão de TNF- α nos LT CD8⁺/CD56⁺ aumentar com o decorrer da terapêutica. Na subpopulação dos LT CD4⁺/CD56⁺ observou-se um aumento na expressão de TNF- α antes do início da terapêutica que diminuiu com o decorrer desta, observando-se o contrário nos LT CD4⁺/CD56⁻ (figura 11.c e 11.d).

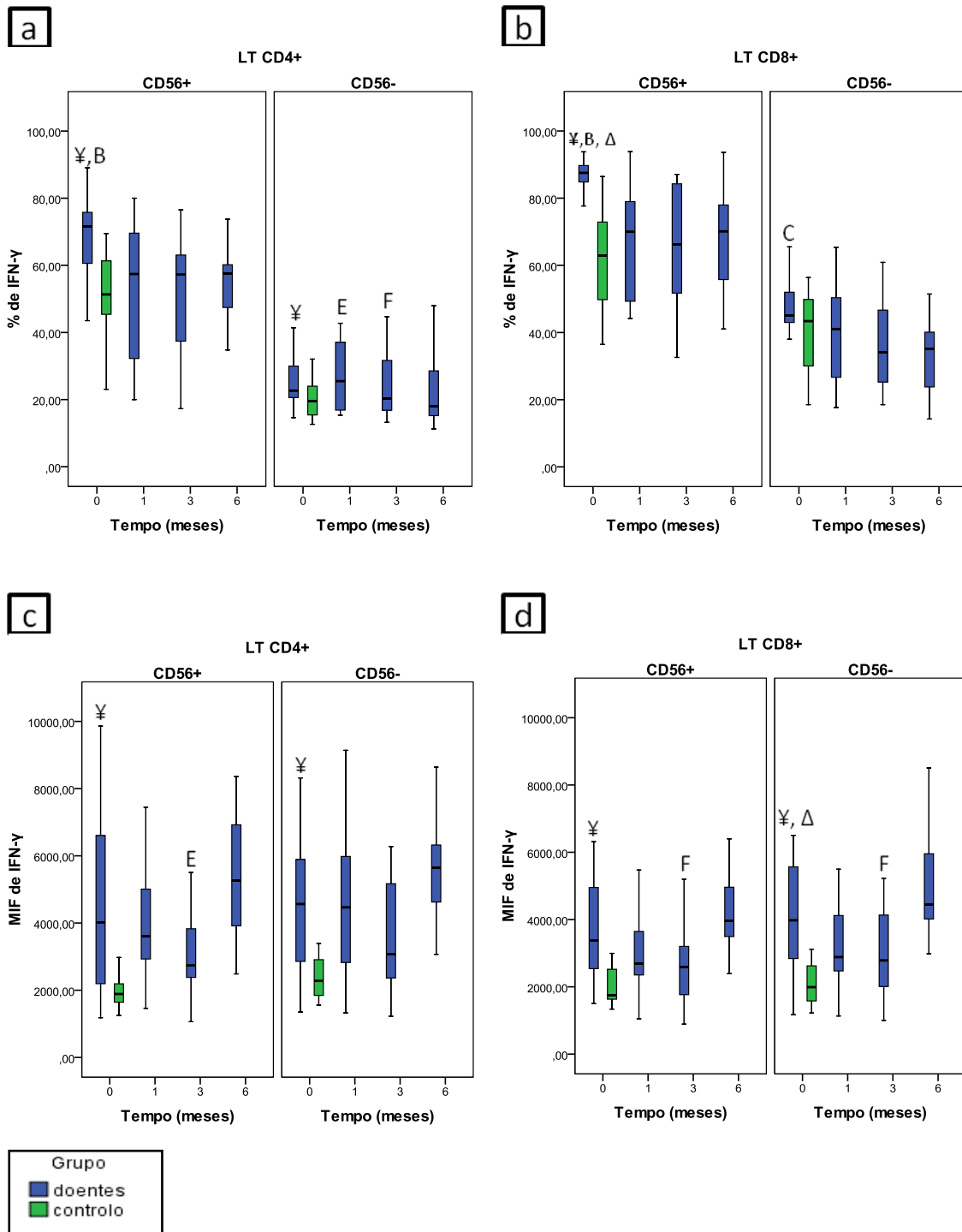


Figura 10. Frequência de células T produtoras de IFN- γ e quantidade desta citocina por célula, após estimulação *in vitro* com PMA/ionomicina na presença de brefeldina A.

a) Percentagem (%) de células produtoras de IFN- γ nas subpopulações de LT CD4⁺; b) percentagem (%) de células produtoras de IFN- γ nas subpopulações de LT CD8⁺; c) quantidade de IFN- γ por célula nas subpopulações de LT CD4⁺ e d) quantidade de IFN- γ por célula nas subpopulações de LT CD8⁺.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de *Mann-Whitney*: ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controle; teste de *Wilcoxon*: ^A antes do tratamento (mês 0) vs 1^o mês de terapia, ^D 1^o mês de terapia vs 3^o mês de terapia, ^F 3^o mês de terapia vs 6^o mês de terapia; Teste de *Friedman*: ^Δ mês 0 vs 1 mês vs 3 meses vs 6^o mês de terapia.

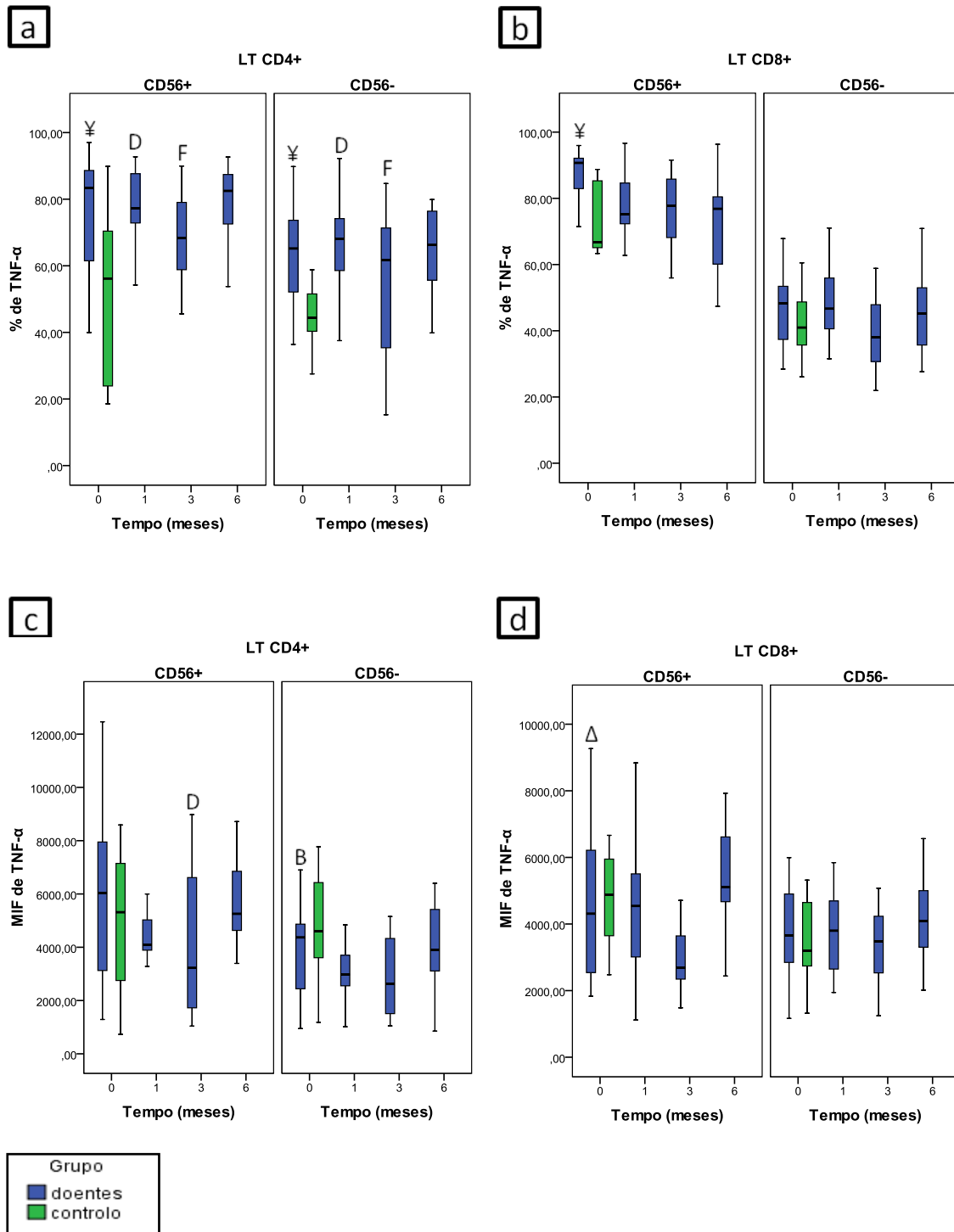


Figura 11. Frequência de células T produtoras de TNF- α e quantidade desta citocina por célula, após estimulação *in vitro* com PMA/ionomicina na presença de brefeldina A.

a) Percentagem (%) de células produtoras de TNF- α nas subpopulações de LT CD4+; b) percentagem (%) de células produtoras de TNF- α nas subpopulações de LT CD8+; c) quantidade de TNF- α por célula nas subpopulações de LT CD4+ e d) quantidade de TNF- α por célula nas subpopulações de LT CD8+.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de *Mann-Whitney*: ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controle; teste de *Wilcoxon*: ^A antes do tratamento (mês 0) vs 1º mês de terapia, ^D 1º mês de terapia vs 3º mês de terapia, ^F 3º mês de terapia vs 6º mês de terapia; Teste de *Friedman*: ^A mês 0 vs 1 mês vs 3º mês vs 6º mês de terapia.

FREQUÊNCIA DE CÉLULAS NK PRODUTORAS DE CITOCINAS E QUANTIDADE DE CITOCINAS POR CÉLULA

Procedeu-se à quantificação da frequência das células NK produtoras de citocinas (IFN- γ e o TNF- α) e da quantidade de citocina por célula, após estimulação *in vitro*, durante 4 horas, com PMA e ionomicina na presença de brefeldina A. Este procedimento foi efectuado nas subpopulações NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}. Na figura 12 estão representados os valores das frequências de células NK a produzirem IFN- γ e TNF- α , bem como, a expressão destas citocinas.

Antes e durante a terapia, verificou-se que é na subpopulação NK CD56^{bright} que se encontra um maior número de células produtoras de IFN- γ e TNF- α (figura 12.a e 12.b).

Nas subpopulações de células NK, observou-se um aumento não significativo na percentagem de células produtoras de TNF- α , no grupo dos doentes, antes da terapia, comparativamente ao grupo controlo. Por outro lado, verificou-se um aumento estatisticamente significativo na percentagem de células a produzirem IFN- γ na subpopulação NK CD56^{bright} e um aumento mas não significativo na subpopulação NK CD56^{dim}.

Relativamente à quantidade de citocina por célula, observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão de IFN- γ , acompanhado de um aumento mas não significativo da quantidade de TNF- α por célula, em ambas as subpopulações, no grupo dos doentes, antes do início da terapêutica quando comparado com os resultados obtidos nos indivíduos saudáveis.

Em termos percentuais, verificou-se um decréscimo na frequência das células NK CD56^{dim} produtoras de ambas as citocinas e na frequência de células NK CD56^{bright} produtoras de TNF- α , durante o tratamento quando comparado com valores obtidos antes da terapia. Não se verificou nenhuma diferença na frequência de células NK CD56^{bright} produtoras de IFN- γ .

Na subpopulação NK CD56^{bright} verificou-se uma tendência para a expressão de ambas as citocinas aumentarem durante a terapia, enquanto na subpopulação NK CD56^{dim}, observou-se uma diminuição na expressão de IFN- γ . No entanto a quantidade de TNF- α por célula nas células NK CD56^{dim} não sofreu alterações durante a terapia.

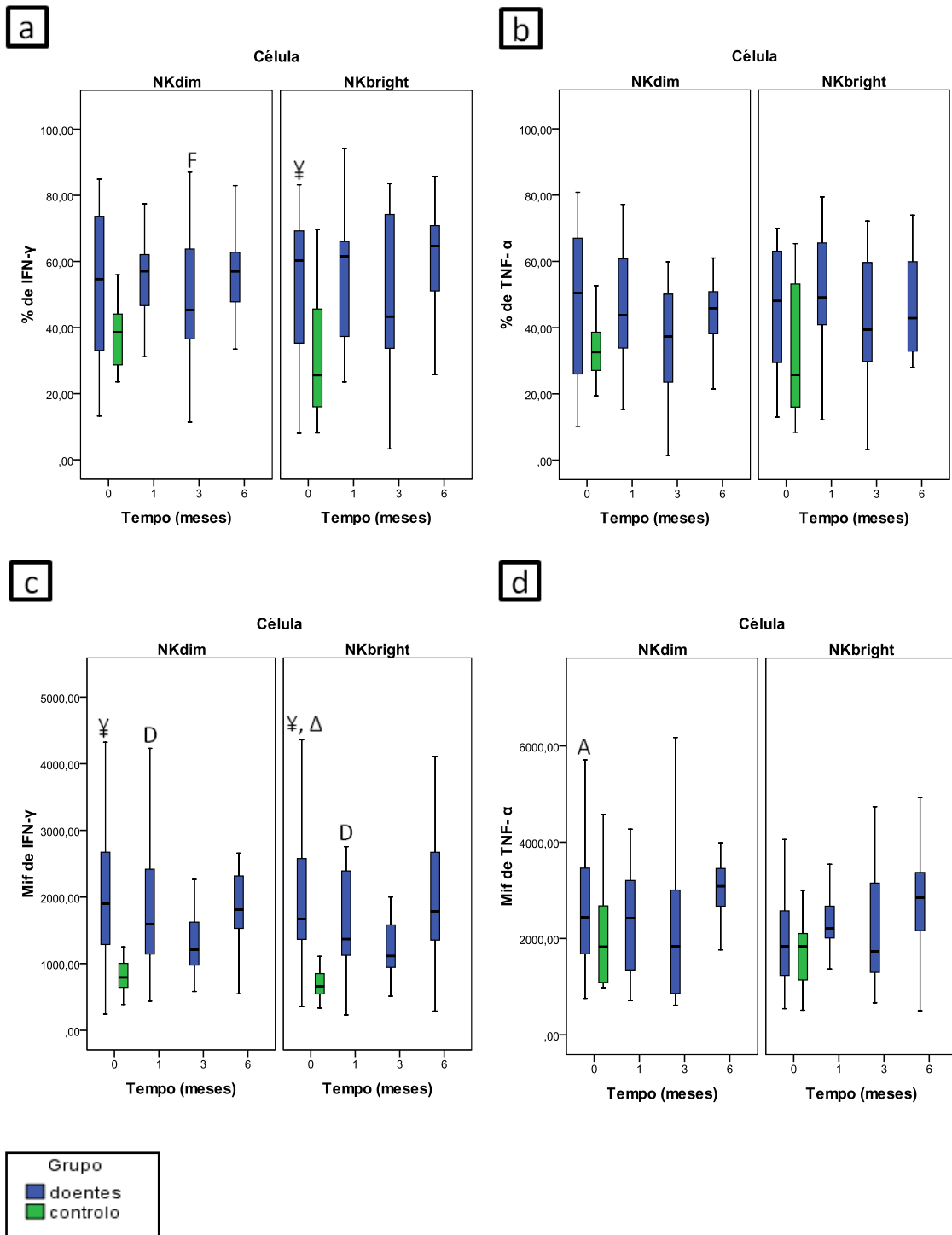


Figura 12. Frequência de células NK produtoras de citocinas e quantidade de citocinas por célula, após estimulação *in vitro* com PMA/ionomicina na presença de brefeldina A.

a) Percentagem (%) de células produtoras de IFN- γ ; b) Percentagem de células produtoras de TNF- α ; c) quantidade de IFN- γ por célula e d) quantidade de TNF- α por célula.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0,05$. Teste U de Mann-Whitney: ¥ Grupo de doentes versus (vs) Grupo controle; teste de Wilcoxon: A antes do tratamento (mês 0) vs 1 mês de terapia, D 1 mês de terapia vs 3 meses de terapia, F 3 meses de terapia vs 6 meses de terapia; Teste de Friedman: A mês 0 vs 1 mês vs 3 meses vs 6 meses de terapia.

Capítulo 5

Discussão

Tendo em conta a evolução da infecção crónica pelo VHC, o objectivo primordial do tratamento é a erradicação viral sustentada e a cura da doença, no entanto nem sempre é possível atingir esse objectivo.

Nos últimos anos, tem se verificado uma crescente necessidade de se efectuar o estudo da resposta imunológica do hospedeiro para tentar identificar qual a causa principal no insucesso da terapia, pois sabemos que esta resposta é importante no controlo da infecção pelo VHC e na resposta ao tratamento da mesma (Caetano *et al.*, 2008 e Thimme *et al.*, 2001) Assim sendo o objectivo geral deste trabalho foi avaliar a resposta mediada pelas células T e células NK ao longo do tratamento.

QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T E DAS SUAS SUBPOPULAÇÕES DO SANGUE PERIFÉRICO

Os LT são considerados os principais efectores da resposta imune, sendo assim essenciais para o controlo da infecção viral pelo VHC. Deste modo, realizou-se a quantificação destas células e das suas subpopulações no SP, por citometria de fluxo.

Nos doentes infectados cronicamente por VHC verificou-se uma diminuição na frequência dos LT em comparação com os indivíduos saudáveis (tabela III), o que já havia sido relatado anteriormente (Pár *et al.*, 2002). Doentes que recuperam da infecção aguda apresentam respostas de células T específicas ao VHC acentuadas e multi-específicas. Em contraste, as respostas de células T específicas ao VHC nos doentes infectados cronicamente, são geralmente fracas, de foco limitado, e muitas vezes disfuncionais (Boettler *et al.*, 2005).

Os LT CD4 são os principais coordenadores da resposta imune adaptativa, uma vez que podem actuar na indução e manutenção das respostas dos LT CD8 e LB. Assim, uma diminuição nestas células pode atenuar as respostas mediadas pelos LT CD8 que por sua vez, leva a uma virémia prolongada (Sklan *et al.*, 2009). Nos doentes com infecção crónica observou-se uma diminuição na percentagem dos LT CD4 e consequentemente um aumento na percentagem dos LT CD8 (tabela III) indo ao encontro dos resultados obtidos por Pár *et al.* (2002), o que é um tanto paradoxal relativamente aos dados anteriormente referidos por Sklan *et al.*, (2009). Assim, os resultados obtidos podem seguir o modelo proposto por Boettler *et al.* (2005), em que as

células T CD4 têm diferentes funções no decurso da infecção por VHC. Na fase aguda, estas células contribuem para a indução e manutenção das respostas dos LT CD8, enquanto na fase crónica os LTreg suprimem as respostas dos LT CD8 e assim ajudam o vírus a persistir.

No entanto nos nossos resultados observou-se uma diminuição na frequência e valor absoluto dos LTreg antes da terapia (tabela III) contrariamente aos resultados publicados que apresentam um aumento na frequência desta subpopulação (Tseng *et al.*, 2011).

Os LT CD4⁺/CD8⁺ encontram-se pouco representados na circulação sanguínea, no entanto sabe-se que a frequência destas células aumenta durante as infecções virais. O seu papel, função e significado biológico ainda não estão muito bem esclarecidos. Estudos em chimpanzés, o único modelo animal para a infecção por VHC, mostram uma correlação entre a frequência destas células activadas e a carga viral. Estas células participam nas respostas imunes às infecções virais persistentes, possuindo um perfil citotóxico e libertando citocinas Th1, podendo também proliferar. Além disso, estão presentes no local da infecção (por exemplo, encontram-se no fígado durante a infecção crónica por VHC) (Nascimbeni *et al.*, 2004).

Estudos anteriores demonstram resultados divergentes na frequência destas células durante a infecção crónica por VHC, em alguns casos ocorre uma diminuição (Pár *et al.*, 2002), enquanto em outros ocorre um aumento (Nascimbeni *et al.*, 2011). Nos nossos resultados verificou-se um aumento na frequência de LT CD4⁺/CD8⁺ nos doentes (tabela III) comparativamente aos indivíduos saudáveis (tabela III). Deste modo, podemos considerar que estas células, apesar de serem uma pequena fracção dos LT, parecem ser importantes na resposta imune adaptativa à infecção por VHC.

O papel dos LT $\gamma\delta$ na infecção por VHC ainda não está muito bem esclarecido. No entanto, vários estudos têm demonstrado respostas acentuadas dos LT $\gamma\delta$ em infecções virais (Wallace *et al.*, 1995). Além disso, Tseng *et al.*, (2001) demonstraram que existe um número elevado de LT $\gamma\delta$ no fígado de indivíduos infectados cronicamente por VHC. Tendo em conta estes dados, podemos dizer que os nossos resultados estão de acordo com estes estudos, uma vez que se verificou um aumento na frequência LT $\gamma\delta$ nos doentes, antes da terapia, comparativamente ao grupo controlo (tabela III).

As respostas imunitárias durante a terapêutica apresentaram algumas discrepâncias. Observou-se um aumento na frequência dos LT CD4 durante a terapia, enquanto nos LT CD8, LT CD4/CD8 e LT $\gamma\delta$ verificou-se uma diminuição (tabela III), estes resultados

estão de acordo com estudos anteriores (Soldevila *et al.*, 2011). No entanto, nos estudos de Soldevila *et al.* (2011) também se verificou uma diminuição dos LT e LTreg, contrariamente aos nossos resultados em que se observou um aumento. Durante a terapia, os níveis virais diminuem, por isso não será tão necessário haver uma frequência elevada de LT com características mais citotóxicas ou outra possível razão será o aumento da migração destas células para o fígado, local onde ocorre a infecção.

No entanto, alguns estudos demonstram que os doentes que na fase antes do tratamento apresentam uma resposta imune celular pouco expressiva, não modificam muito essa resposta durante a terapia e vão ser não respondedores no final desta (Caetano *et al.*, 2008; Lasarte *et al.*, 1998 e Lohr *et al.*, 1999). Além disso, a frequência dos LTreg pode ser um factor preditivo de resposta, uma vez que os doentes não respondedores apresentaram uma frequência dos LTreg antes do tratamento superior aos indivíduos respondedores (Soldevila *et al.*, 2011).

As células NKT predominam especialmente no fígado, constituindo apenas uma pequena percentagem dos linfócitos circulantes. Estas células possuem características de LT e de células NK, representando uma população heterogénea de células imunorreguladoras e efectoras (Yamagiwa *et al.*, 2008).

Yamagiwa *et al.* (2008), não encontraram diferenças na frequência das células NKT dos indivíduos infectados cronicamente por VHC e os indivíduos saudáveis. Contudo esta análise foi realizada para todas as células CD3⁺/CD56⁺, enquanto o nosso estudo foi mais específico pois analisamos a frequência dos LT CD4⁺/CD56⁺, LT CD8⁺/CD56⁺ e LT CD4⁺/CD8⁺/CD56⁺. Verificou-se um aumento na percentagem de células a expressar CD56 nos LT CD4, acontecendo o oposto nos LT CD4/CD8. Por outro lado, na subpopulação de LT CD8⁺ não se encontrou qualquer diferença na percentagem de células a expressar CD56, quando comparado o grupo dos doentes com o grupo controlo (tabela III). Globalmente, podemos dizer que os nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos anteriormente por Yamagiwa *et al.* (2008). Além disso, este grupo também verificou que nos doentes que respondem à terapia, a frequência dos NKT diminui. No nosso estudo também observamos uma diminuição na frequência das subpopulações de células T que expressam CD56, durante a terapia (tabela III), isto pode dever-se a um aumento da migração destas células para o fígado.

QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS NK E DAS SUAS SUBPOPULAÇÕES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células NK também são muito importantes no controlo da infecção pelo VHC pois além de fazerem parte da imunidade inata podem regular a resposta imune adaptativa.

Estas células são capazes de mediar a actividade citotóxica e produzir citocinas anti-virais após a ligação de vários receptores. Estes receptores podem gerar sinais activadores ou inibidores, sendo a actividade destas células regulada por um equilíbrio entre estes sinais. Um dos receptores activadores é o NKG2D que reconhece as moléculas MICA e MICB, que são proteínas transmembranares codificadas por genes que fazem parte do complexo do MHC. Estas proteínas apresentam expressão aumentada em células submetidas a “stress” ou células tumorais. O NKG2D também tem capacidade de reconhecer as ULBP1, ULBP2 e ULBP3, inicialmente identificadas pela capacidade de se ligarem a uma proteína codificada pelo citomegalovírus humano (proteína UL16). Contudo os vírus possuem muitos mecanismos para escapar às células NK, incluindo ligação aos receptores activadores impedindo que as células NK sejam activadas (Orange *et al.*, 2002). Desta forma, efectuou-se a quantificação destas células e das suas subpopulações no sangue periférico.

Estudos anteriores demonstraram que, na infecção crónica, ocorre alterações na frequência, fenótipo e função das células NK, quando comparados com indivíduos saudáveis. Existe uma redução na percentagem e no valor absoluto das células NK presentes na corrente sanguínea, em doentes infectados cronicamente quando comparados com indivíduos saudáveis (Cheent K e Khakoo S, 2010).

Tendo em conta estes dados, podemos referir que os nossos resultados estão de acordo com estes estudos, uma vez que se verificou uma diminuição na frequência e no número absoluto das células NK no grupo dos doentes, antes do tratamento, comparativamente com o grupo controlo (tabela IV). O decréscimo da frequência das células NK pode ser consequência da infecção e também pode ser um factor predisponente para a infecção crónica por VHC. Além disso, observou-se um aumento nos valores percentuais destas células durante a terapia (tabela IV), indo ao encontro de resultados anteriores (Cheent K e Khakoo S, 2010).

Nos doentes infectados parece ocorrer um aumento da subpopulação NK CD56^{bright} e consequentemente uma diminuição das células NK CD56^{dim}, quando se comparou com

os indivíduos saudáveis. Este aumento foi observado em vários estudos (Cheent K e Khakoo S, 2010), incluindo neste (tabela IV). Durante a terapia ocorreu um decréscimo da subpopulação NK CD56^{bright} e conseqüentemente, um aumento na subpopulação NK CD56^{dim} (tabela IV).

O desenvolvimento, maturação e função das células NK é fortemente influenciado pelas citocinas presentes no meio, entre elas a IL-15. Meier *et al.* (2005) demonstrou que uma redução nos níveis da IL-15 em doentes infectados com VHC e que a IL-15 impede a apoptose das células NK nos indivíduos infectados, aumentando a sua proliferação e maturação *ex vivo*. Noutros estudos, observou-se uma diminuição na produção de IL-15 pelas células dendríticas, na infecção crónica por VHC (Jinushi *et al.*, 2003). Deste modo, verificou-se uma redução na maturação das células NK, consistente com o aumento da frequência das células NK CD56^{bright} que são consideradas células imaturas.

Após a terapêutica os níveis de IL-15 voltam à normalidade e conseqüentemente pode aumentar o processo de maturação das células NK. Deste modo, durante a terapia, em termos de percentagem relativa dentro das células NK, observou-se um decréscimo da subpopulação NK CD56^{bright} e por outro lado, um aumento na subpopulação NK CD56^{dim}, comparativamente com os valores antes do tratamento (tabela IV).

AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T

Os LT CD8 são restritos às moléculas MHC I e são reconhecidos como um importante mecanismo efector nas infecções virais, conduzindo à eliminação do vírus. Estes CTL podem induzir a apoptose das células – alvo, através de 2 mecanismos principais, libertação de enzimas líticas (perforina e granzimas) e interacção do ligando Fas (FasL) com o seu receptor, o Fas, presente na superfície das células – alvo (Arosa *et al.*, 2007).

Os LTh são restritos às moléculas MHC II e têm como principal função ajudar as outras células a desempenhar as suas funções, mas também podem desempenhar funções citotóxicas (Arosa *et al.*, 2007).

Os LT CD4/CD8 reconhecem moléculas MHC I e II, e também podem apresentar funções citotóxicas contra antígenos virais, tendo funções muito semelhantes aos LT CD8 (Nascimbeni *et al.*, 2004).

Os LT $\gamma\delta$ e as células NKT apesar de exibirem menor restrição ao MHC podem ter funções citotóxicas contra as células - alvo (Arosa *et al.*, 2007 e Kindt *et al.*, 2007). Assim, avaliou-se o perfil citotóxico das subpopulações de LT descritas anteriormente, com base na expressão de perforina e de granzima B.

Na globalidade, verificou-se que, os LT CD4 expressam menos moléculas com actividade citotóxica, enquanto os LT CD8 são os que apresentam uma expressão mais acentuada dessas moléculas. Além disso, estes LT CD4 representam uma percentagem minoritária dos LT que expressam moléculas com actividade citotóxica (tabela V). Estes resultados estão de acordo com os dados referidos anteriormente (Arosa *et al.*, 2007).

Observou-se um aumento na frequência de todas as subpopulações de LT a expressarem perforina e granzima B no grupo dos doentes, antes da terapia, comparativamente com o grupo controlo (tabela V). Estes resultados são diferentes dos dados apresentados por Pár *et al.* (2002). Este mesmo grupo também observou que a expressão de perforina nos LT era menor nos doentes infectados, em comparação com os indivíduos saudáveis, indo ao encontro dos resultados obtidos neste estudo (tabela V). Contudo, observou-se que a expressão de granzima B encontra-se aumentada. Assim, as células T encontram-se activadas no combate ao vírus.

A expressão de perforina e granzima B aumentou em todas as subpopulações de LT durante a terapia, quando comparado com os valores antes do tratamento, indo ao encontro de estudos anteriores (Pár *et al.*, 2002). Deste modo, ocorre um aumento na actividade citotóxica destas células para poderem combater o vírus de forma mais eficaz.

AVALIAÇÃO DO PERFIL CITOTÓXICO DAS SUBPOPULAÇÕES DAS CÉLULAS NK

À semelhança das subpopulações de células T com actividade citotóxica, as células NK também eliminam as células infectadas por vírus através da libertação de grânulos que contêm perforina e granzimas (Ashfaq *et al.*, 2011). Assim, a avaliação do perfil

citotóxico das subpopulações destas células (NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}) teve por base a expressão de perforina e de granzima B.

Quando se comparou as subpopulações de células NK verificou-se que a subpopulação NK CD56^{dim} é a mais citotóxica (tabela VI), indo ao encontro de estudos anteriores (Fathy *et al.*, 2010).

Vários estudos referem que na infecção crónica por VHC ocorre uma diminuição da actividade citotóxica das células NK (Meier *et al.*, 2005 e Pár *et al.*, 2002). No entanto, os nossos resultados são divergentes, uma vez que se observou um aumento na percentagem de células NK a expressar perforina e granzima B, em doentes antes da terapia, comparativamente ao grupo controlo. Por outro lado, verificou-se um aumento na expressão de perforina e um decréscimo na expressão de granzima B (tabela VI). Estes resultados sugerem que as células NK estão a contribuir para uma resposta celular eficaz, com o objectivo de poder controlar a infecção viral.

Alguns estudos anteriores a este trabalho evidenciaram um aumento da citotoxicidade das células NK, após a terapia, confirmada pelo aumento da expressão de perforina e granzima B, em relação aos valores antes da terapêutica. Contudo a frequência das células a expressar ambas as moléculas com actividade citotóxica diminuiu (Cheent K e Khakoo S, 2010). Tendo em conta estes dados, podemos referir que os nossos resultados estão de acordo com estes estudos, uma vez que se observou um aumento na expressão de perforina e granzima B nas duas subpopulações de células NK. Além disso, também se verificou uma diminuição na percentagem de células a expressarem granzima B, enquanto apenas se observou uma diminuição na frequência de células a expressarem perforina nas células NK CD56^{bright} (tabela VI). Estes resultados sugerem que as células NK são muito importantes no combate à infecção, principalmente pela produção de moléculas com actividade citotóxica que induzem a destruição das células infectadas.

FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T PRODUTORAS DE CITOCINAS E QUANTIDADE DE CITOCINA POR CÉLULA

As células Th1 caracterizam-se principalmente pela produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , sendo responsáveis por promover respostas imunológicas contra vírus e patógenos intracelulares, através da activação de macrófagos e CTL. Por outro lado, as células Th2 caracterizam-se principalmente pela produção de IL-4 e IL-10, entre outras, regulando negativamente a resposta Th1 e induzindo um efeito inibitório no sistema imune do doente (Sklan *et al.*, 2009).

Os LT CD8 e as células NKT também secretam citocinas com actividade anti-viral, incluindo IFN- γ e TNF- α , diminuindo a replicação viral mas mantendo intacta a célula infectada (Ashfaq *et al.*, 2011 e Kindt *et al.*, 2007). Desta forma, procedeu-se à quantificação da frequência de células T produtoras de citocinas (IFN- γ e o TNF- α) e da quantidade de citocina por célula, após estimulação *in vitro*.

No grupo dos doentes, antes do início da terapia, observou-se um aumento da frequência dos LT CD4⁺/CD56⁺, LT CD4⁺/CD56⁻, LT CD8⁺/CD56⁺ e LT CD8⁺/CD56⁻ produtores de IFN- γ e TNF- α e um aumento da quantidade destas citocinas por célula, em comparação com o grupo controlo, excepto na subpopulação LT CD4⁺/CD56⁻ (figura 10 e 11). Estudos anteriores confirmam o aumento da produção de citocinas Th1 em pacientes com infecção crónica por VHC, comparativamente aos indivíduos saudáveis (Cacciarelli *et al.*, 1996). Este aumento de citocinas indica que as células T estão activadas. No entanto, Cacciarelli *et al.* (1996) demonstrou que as citocinas Th2 também estão aumentadas na infecção crónica, podendo interferir negativamente com a resposta Th1 e contribuindo para a persistência viral e comprometimento da resposta imunológica mediada pelas células T na infecção crónica.

Durante a terapia, observou-se um aumento na expressão de IFN- γ (figura 10.c e 10.d) em todas as subpopulações de LT analisadas, e um aumento na expressão de TNF- α apenas nas subpopulações de LT CD4⁺/CD56⁻ e LT CD8⁺/CD56⁺ (figura 11.c e 11.d). Estes resultados apoiam o conceito de que o peg-IFN- α e a ribavirina têm ambos efeitos imunomoduladores conduzindo ao aumento da resposta Th1 e conseqüente inibição da resposta Th2. Além disso, o IFN- γ estimula a activação dos LT. Estes dois efeitos podem ser considerados um dos mecanismos através da qual a carga viral é reduzida no final da terapia (Cacciarelli *et al.*, 1996; Myrnel *et al.*, 2009 e Tilg H, 1997).

FREQUÊNCIA DE CÉLULAS NK PRODUTORAS DE CITOCINAS E QUANTIDADE DE CITOCINAS POR CÉLULA

As células NK possuem muitas funções anti-virais, entre elas a produção de citocinas como o IFN- γ e o TNF- α (Ashfaq *et al.*, 2011). Deste modo, procedeu-se à quantificação da frequência das células NK produtoras de citocinas (IFN- γ e o TNF- α) e da quantidade destas citocinas por célula, após estimulação *in vitro*. Este procedimento foi efectuado nas subpopulações de células NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}.

As células NK CD56^{bright} representam uma minoria das células NK, sendo consideradas uma importante fonte de citocinas imunorreguladoras (Fathy *et al.*, 2010). Nos nossos resultados também se verificou que, durante a terapia, era na subpopulação NK CD56^{bright} que se encontrava um maior número de células produtoras de IFN- γ e TNF- α (figura 12.a e 12.b).

No grupo dos doentes, antes da terapia observou-se um aumento na percentagem de células produtoras de IFN- γ e TNF- α , e um aumento na quantidade destas citocinas por célula, nas 2 subpopulações das células NK, comparativamente com o grupo controlo (figura 12). Maria *et al.* (2007) demonstrou que além do aumento da produção de IFN- γ e TNF- α , também se verificou um aumento na produção de IL-10 na infecção crónica por VHC, contribuindo assim para a incapacidade do sistema imune de controlar a infecção crónica.

Durante a terapia, observou-se um aumento na expressão das citocinas (IFN- γ e TNF- α) na subpopulação NK CD56^{bright}, enquanto na subpopulação NK CD56^{dim} verificou-se uma diminuição na expressão de IFN- γ e idêntica expressão de TNF- α (figura 12). Estes dados vão ao encontro de resultados anteriores, apoiando mais uma vez o conceito de que o peg-IFN- α e a ribavirina têm ambos efeitos imunomoduladores, e que o IFN- γ pode também induzir a activação das células NK (Cacciarelli *et al.*, 1996; Myrmmel *et al.*, 2009 e Tilg H, 1997).

COMPARAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ENTRE DOENTES RESPONDEDORES À TERAPIA E DOENTES NÃO RESPONDEDORES

Com o objectivo de tentar encontrar biomarcadores periféricos que se possam correlacionar com o sucesso da resposta à terapêutica, comparou-se a resposta imune entre doentes respondedores à terapia e doentes não respondedores.

No entanto, quando se realizou essa comparação não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (dados não apresentados).

Alguns estudos anteriores envolvendo a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ específicos para o VHC, demonstram que os doentes respondedores à terapia apresentaram valores superiores na percentagem destes linfócitos e na frequência dos mesmos a expressar moléculas com actividade citotóxica, antes e durante a terapia, relativamente aos doentes que não responderam ao tratamento. O que poderá constituir uma vantagem selectiva, e tornar estes indivíduos (doentes respondedores) mais susceptíveis a acção anti-viral do tratamento e justificar o aumento da eficácia observada (Caetano *et al.*, 2008).

Nos estudos de Lohr *et al.*, (1999) verificou-se que os doentes que respondem à terapêutica apresentaram níveis baixos de virémia antes do início do tratamento e uma frequência mais elevada nos precursores de linfócitos T citotóxicos específicos para o VHC, durante a eliminação do vírus, comparativamente com doentes não respondedores.

Outros estudos evidenciam que a frequência dos LTreg também pode ser um factor preditivo de resposta, uma vez que os doentes não respondedores apresentaram uma frequência dos LTreg antes do tratamento superior aos indivíduos respondedores (Soldevila *et al.*, 2011).

Capítulo 6

Conclusões

O vírus da hepatite C pode escapar ao sistema imunitário dos doentes infectados, progredindo para infecção crónica. Neste estado de cronicidade é necessário recorrer ao tratamento com interferão- α peguado e a ribavirina, contudo nem todos os doentes respondem à terapêutica.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho parece verificar-se que quer as células T quer as células NK exibem um perfil predominantemente citotóxico e de célula activada, comprovado pelo aumento da frequência destas células a expressarem perforina e/ou granzima B e a produzirem IFN- γ e/ou TNF- α , respectivamente, que se mantém de uma maneira geral ao longo do tratamento.

Estes achados, e tendo por base o facto de não se ter verificado diferenças estatisticamente significativas entre doentes que respondem à terapia e doentes que não respondem, sugere que estas células não se encontram imunocomprometidas e por isso, não parecem contribuir para a não resposta à terapêutica.

Estudos mais alargados envolvendo um maior número de doentes e não restringidos só à actividade pró-inflamatória, como efectuado neste estudo, mas também abrangendo células e moléculas com actividade reguladora do sistema imune podem permitir clarificar melhor os principais achados encontrados neste trabalho.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

Ahlenstiel G, Titerence R, Koh C, Edlich B, Feld J, Rotman Y *et al.* (2010). Natural Killer Cells are Polarized towards Cytotoxicity in Chronic Hepatitis C in an Interferon- α -Dependent Manner. *Gastroenterology* 138 (1): 325 – 335.

Alter M (2002). Prevention of Spread of Hepatitis C. *Hepatology* 36 (5): S93 – S98.

Alter M (2006). Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *Journal of Hepatology* 44: S6 – S9.

Alter J, Kuhnert L, Finelli L (2003) Guidelines for Laboratory Testing and Result of Antibody to Hepatitis Virus. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and reports / Centers of Diseases Control* 52 (RR03): 1 – 16.

Ashfaq U, Javed T, Rehman S, Nawaz Z e Riazuddin S (2011). An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal* 8 : 161.

Arosa F, Cardoso E e Pacheco F (2007). *Fundamentos de Imunologia (1ªedição)*. Lisboa: LIDEL.

BD Biosciences (2000). *Introduction to flow cytometry : a learning guide*. Manual parte number: 11 – 11032-01. San Jose, California.

Boettler T, Spangenberg H, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum H *et al.* (2005). T Cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8 T cells during chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* 79 (12): 7860 – 7867.

Bougie I e Bisaillon M (2004). The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral RNA capping enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 22124 – 22130.

Brandes M, Willimann K e Moser B (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 309 (5732): 264 - 268.

Brillanti S, Mazzella G e Roda E (2011). Ribavirin for chronic hepatitis C: And the mystery goes on. *Digestive and Liver Disease* 43 (6): 425 – 430.

Brown M e Wittwer C (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry* 46:8 1221 – 1229.

Brown R (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436: 973 – 978.

Bukh J, Miller R e Purcell R (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis c virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in Liver Disease* 15 (1): 41 – 63.

Cacciarelli T, Martinez O, Gish R, Villanueva J e Krama S (1996). Immunoregulatory Cytokines in Chronic Hepatitis C Virus Infection: Pre- and Posttreatment With Interferon Alfa. *Hepatology* 24 (1): 1 – 9.

Caetano J, Martinho A, Paiva A, Pais B, Valente C e Luxo C (2008). Differences in hepatitis C virus (HCV) - specific CD8 T-Cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV. *Journal of Virology* 82 (15): 7567 – 7577.

Chatila T, Silverman L, Miller R e Geha R (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *The Journal of Immunology* 143 (4): 1283 – 1289.

Chen S e Morgan T (2006). The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *International Journal of Medical Sciences* 3 (2): 47 – 52.

Cheent K e Khakoo S (2010). Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut* 60 (2): 268 – 278.

Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D e Houghton M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244 (4902): 359 – 362.

Choo Q, Richman K, Han J, Berger K, Lee C, Dong C *et al.* (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88 (6): 2451 – 2455.

Crivellato E, Vacca A e Ribatti D (2004). Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends in Immunology* 25 (4): 210 – 217.

Dubuisson J, Helle F, e Cocquere L (2008). Early steps of the hepatitis C virus life cycle, *Cellular Microbiology* 10 (4): 821 – 827.

Ellmeier W, Sawada S e Littman D (1999). The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annual Reviews Immunology* 17 (1): 523 – 554.

Evans M, Hahn T, Tscherne D, Syder A, Panis M, Wölk B *et al.* (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446: 801 – 805.

Farci P, Bukh J e Purcell R (1997). The quasispecies of hepatitis C virus and the host immune response. *Springer Seminars in Immunopathology* 19 (1): 5 – 26.

Farrar J, Fuller-Farrar J, Simon P, Hilfiker M, Stadler B e Farrar W (1980). Thymoma production of T cell growth factor (interleukin 2). *The Journal of Immunology* 125 (6): 2555 – 2558.

Fathy A, Eldin M, Metwally L, Eida M, Abdel-Rehim M e Esmat G (2010). Interferon therapy shifts natural killer subsets among Egyptian patients with chronic hepatitis C. *The Brazilian Journal of Infectious Disease* 14 (4): 398 – 405.

Feld J e Hoofnagle J (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436 (7053): 967 – 972.

Freeman A, Marinos G, Ffrench R e Lloyd A (2001). Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunology and Cell Biology* 79 (1): 515 – 536.

Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A e Ikehara Y (1988). Brefeldin A causes disassembly of the golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (34): 18545 – 18552.

Gerardi H e Zimmerman M (2005). Hepatitis virus group (capítulo 6). *Wastewater Pathogens*. John Wiley & Sons 31 – 38.

Gerrits A, Dykstra B, Ott M, Bystrykh L e Haan G (2008). Combining transcriptional profiling and genetic linkage analysis to uncover gene networks operating in hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunogenetics* 60 (8): 411 – 422.

Halliday J, Klenerman P e Barnes E (2011). Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target. *Expert Reviews Vaccines* 10 (5): 659 – 672.

http://livercancerprognosiscenter.com/wp-content/uploads/2011/10/HCV_structure1.png.

<http://www.biology.sjsu.edu/specialprogs/flocyto/html/fc-p03.html>

Kindt T, Goldsby B e Osborne R (2007). *Kuby Immunology* (6ª edição). Freeman e Company.

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T *et al.* (2003). Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell

expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *Journal of Immunology* 171 (10): 5423 – 5429.

Lasarte J, Garcia- Granero M, Lopez A, Casares N, Garcia N, Civeira M *et al.* (1998). Cellular immunity to hepatitis C virus core protein and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 28 (3): 815 – 822.

Lechner F, Wong D, Dunbar P, Chapman R, Chung R, Dohrenwend P *et al.* (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *The Journal of Experimental Medicine* 191 (9): 1499 – 1512.

Lerner K e Lerner B (2003); *World of microbiology and immunology; Gale Vol 1 (A-L)*: 264 – 267.

Lindenbach B e Rice C (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 436: 933 – 938.

Liu J, Shi S, Zhuang H e Luo G (2011). Recent advance in antiviral drugs for hepatitis C. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 36 (11): 1025 – 1036.

Liu S, Yang W, Shen L, Turner J, Coyne C e Wang T (2009) Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *Journal of Virology* 83 (4): 2011 – 2014.

Lohr H, Schmitz D, Arenz M, Weyer S, Gerken G e Büschenfelde K (1999). The viral clearance in interferon-treated chronic hepatitis C is associated with increased cytotoxic T cell frequencies. *Journal of Hepatology* 31 (3): 407 – 415.

Lu Y, Robinson M e Zang F (2009). Human immunodeficiency virus and hepatitis C virus co-infection: epidemiology, natural history and the situation in China. *Chinese Medical Journal* 122 (1): 93 – 97.

Malinoski F e Stollar V (1981). Inhibitors of IMP dehydrogenase prevent sindbis virus-replication and reduce GTP levels in *Aedes-albopictus* cells. *Virology* 110 (2): 281 – 91.

Marinho R, Giria J, Ferrinho P e Carneiro de Moura M (2000). Aspectos epidemiológicos da Hepatite C em Portugal. *Jornal Português de Gastrenterologia* 7: 72 – 79.

Maria A, Fogli M, Mazza S, Basso M, Picciotto A, Costa P *et al.* (2007). Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from

chronically infected viremic HCV patients. *European Journal of Immunology* 37 (2): 445 – 455.

Mauss , Berg, Rockstroh, Sarrazin, Wedemeyer (2012). Short guide to hepatitis C. The Flying Publisher.

Meier U, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C *et al.* (2005). Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *Journal of Virology* 79 (19): 12365 – 12374.

Meier V e Ramadori G (2009). Clinical staging of hepatocellular carcinoma; *Digestive Diseases* 27 (2): 131 – 141.

Myrmel H, Ulvestad E e Asjo B (2009). The hepatitis C virus enigma. *Acta Pathologica , Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 117 (5 - 6): 427 – 439.

Nascimbeni M, Pol S e Saunier B (2011). Distinct CD4 + CD8 + Double-Positive T Cells in the Blood and Liver of Patients during Chronic Hepatitis B and C. *PLoS One*. 6 (5): e20145.

Nascimbeni M, Shin E, Chiriboga L, Kleiner D e Rehmann B (2004). Peripheral CD4+CD8+ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood* 104 (2): 478 – 486.

Nguyen MH, Keeffe EB (2005). Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3 (2): S97 – S101.

Okada S, Akahane Y, Susuki H, Okamoto H e Mishiro S (1992). The degree of variability in the amino terminal region of the E2/NS1 protein of hepatitis C virus correlates with responsiveness to interferon therapy in viremic patients. *Hepatology* 16 (3): 619 – 624.

Orange J, Fassett M, Koopman L, Boyson J e Strominger J (2002). Viral evasion of natural killer cells. *Nature immunology* 3 (11): 1006 – 1012.

Ozaras R e Tahan V (2009). Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Review Anti-infective Therapy* 7 (3): 351– 361.

Paiva A (2008). Estudo da aloreactividade das células de Sangue do Cordão Umbilical. Dissertação de Doutorado em Biologia Celular pela Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Pár G, Rukavina D, Podack E, Horányi M, Szekeres-Bartho J, Hegedus G *et al.* (2002). Decrease in CD3-negative-CD8dim1 and Vd2/Vg9 TcR 1 peripheral blood lymphocyte counts, low perforin expression and the impairment of natural killer cell activity is associated with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 37 (4): 514 – 522.

Pawlostsky J (2011). Treatment Failure and Resistance with Direct-Acting Antiviral Drugs Against Hepatitis C Virus. *Hepatology* 53 (5): 742 – 1751.

Poynard T, Yuen M, Ratziu V, Lai C (2003). Viral hepatitis C. *Lancet* 362 (9401): 2095 – 2100.

Raina D e Wu G (2004). Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Current Hepatitis Reports* 3 (4): 136 – 139.

Rehermann B e Nascimbeni M (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature* 5: 215 – 229.

Reiner S (2007). Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129 (1): 33 – 36.

Rice C (2011). New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Topics in Antiviral Medicine* 19 (3): 117 – 120.

Sarmiento J, Vasques T, Carneiro F *et al.* (2001) Relação entre os genótipos do vírus da hepatite C (VHC) e as características clínicas e epidemiológicas de um grupo de doentes do noroeste de Portugal. *Hepatite C. Biblioteca das hepatites víricas. Permanayer Portugal* 7 – 12.

Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca R, Acali S, Filocamo G *et al.* (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal* 21 (19): 5017 – 5025.

Shepard C, Finelli F e Alter M (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious Disease* 5 (9): 558 – 567.

Sillanpaa M, Melén K, Porkka P, Fagerlund R, Nevalainen K, Lappalainen M e Julkunen I (2009). Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *Virology Journal* 6 (84): 1 – 12.

Silva T, Reis A, Hewitt C e Roseiro J (2004). Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim da Biotecnologia* 77: 32 – 40.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S *et al.* (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42(4): 962 – 973.

Sklan E, Charuworn P, Pan P e Glenn J (2009). Mechanisms of HCV survival in the host. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 6: 217 – 227.

Soldevila B, Alonso N, Martínez-Arconada M, Granada M, Baía D, Vallejos V *et al.*, (2011). A prospective study of lymphocyte subpopulations and regulatory T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection developing interferon-induced thyroiditis. *Clinical Endocrinology* 75 (4): 535 – 543.

Strader D, Wright T, Thomas D e Seeff L (2004). Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology* 39 (4): 1147 – 1171.

Thimme R, Oldach D, Chang K, Steiger C, Ray S e Chisari F (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine* 194 (10): 1395 – 1406.

Tilg H (1997). New insights into the mechanisms of interferon : an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology* 112 (3): 1017 – 1021.

Toltzis P, Oconnell K e Patterson J (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis-virus transcription. *Antimicrobial Agents Chemother* 32 (4): 492 – 497.

Tripodo C, Iannitto E, Florena A, Pucillo C, Piccaluga P, Franco V *et al.* (2009). Gamma-delta T-cell lymphomas. *Nature Reviews Clinical Oncology* 6 (12): 707 – 717.

Tseng C, Miskovsky E, Houghton M e Klimpel G (2001). Characterization of liver T-cell receptor gammadelta T cells obtained from individuals chronically infected with hepatitis C virus (HCV): evidence for these T cells playing a role in the liver pathology associated with HCV infections. *Hepatology* 33 (5): 1312 – 1320.

Virella G (2001) *Medical Immunology* (5ª edição) New York: Marcel Dekker, Inc.

Wallace M, Malkovsky M e Carding S (1995). Gamma/delta T lymphocytes in viral infections. *Leukocyte Biol* 58 (3): 277–283.

WHO (World Health Organization) (2007). International Travel and Health (Capítulo 5). 53 – 92.

Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S *et al.* (2008). Sustained response to interferon- α plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatology Research* 38 (7) : 664 – 672.

Zhang J, Randall G, Higginbottom A, Monk P, Rice C e McKeating J (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of Virology* 78 (3): 1448 – 1455.

Zhu J e Paul W (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112 (5): 1557 - 1569.