



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR  
EM PATOLOGIA TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA A  
MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS E  
COMPORTAMENTAIS DO SONO EM PACIENTES COM  
HEPATITE C**

**CARLOS MAURÍCIO OLIVEIRA DE ALMEIDA**

**MANAUS  
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR  
EM PATOLOGIA TROPICAL**

**CARLOS MAURICIO OLIVEIRA DE ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA A  
MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS E  
COMPORTAMENTAIS DO SONO EM PACIENTES COM  
HEPATITE C**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração Diagnóstico e Controle.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Malheiro**

**Co-orientador: Prof. Dr. Wornei Silva Braga**

**MANAUS**  
**2007**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central - UFAM)

Almeida, Carlos Maurício Oliveira de

*A447a* Avaliação da resposta imune associada a manifestações neurológicas e comportamentais do sono em pacientes com hepatite C / Carlos Maurício Oliveira de Almeida. - Manaus: UFAM, 2007.

155 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientadora: Prof .Dra. Adriana Malheiro  
Co-orientador: Prof .Dr. Wornei Silva Braga

1. Hepatite C 2. Saúde pública 3. HCV I.Título

CDU 616.36(043.3)

**CARLOS MAURICIO OLIVEIRA DE ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA A  
MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS E  
COMPORTAMENTAIS DO SONO EM PACIENTES COM  
HEPATITE C**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical, na área de concentração Diagnóstico e Controle.

30 de outubro de 2007

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dra. Adriana Malheiro  
Fundação HEMOAM

Prof. Dra. Maria Cristina dos Santos  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Felipe Naveca  
Fundação Medicina Tropical do Amazonas

## DEDICATÖRIA

Aos meus pais Fernando e Célia.

À minha esposa Priscila e minha filha Gabriela.

À memória de minhas avós.

À Deus pela saúde conferida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Malheiro** pela presteza e orientação durante esta jornada;

À **Fundação HEMOAM**;

À **Dra. Kátia Torres** pela imensa ajuda nas análises moleculares;

À **Tatiana e Daniel** pela amizade e importante participação, genotipagem e análises das citocinas;

À **Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM);**

À **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** com o respectivo coordenador, do  
mestrado em patologia Tropical, **Dr. Nelson Fraijii.**

Aos **pacientes** que colaboraram para o sucesso deste trabalho;

À todos os **colegas do mestrado** que conseguiram concluir mais uma etapa de longo e árduo  
trabalho.

## **RESUMO**

A hepatite C é um grande problema de saúde pública atual com aproximadamente 180 milhões de pessoas infectadas no mundo todo. O HCV é um vírus RNA de fita simples, pertencente à família *flaviviridae*. O HCV é um agente infeccioso altamente imunogênico levando ao desenvolvimento de uma intensa resposta imune humoral e celular. No entanto cerca de 80% dos pacientes evoluem para uma doença crônica, podendo desenvolver cirrose hepática ou câncer. Apenas 15-20% dos pacientes infectados apresentam "clearance" viral e evoluem para a cura. Os mecanismos pelo qual o HCV evade-se do sistema imunológico ainda não são totalmente conhecidos, mas a polarização da imunidade através da produção de citocinas parece ser uma das principais causas. Pacientes infectados pelo HCV podem apresentar várias manifestações extra-hepáticas como fadiga, depressão e distúrbios do sono. As manifestações neurológicas podem envolver o sistema nervoso periférico na forma de polineuropatias ou o sistema nervoso central como encefalopatia agudo-subaguda, acidente vascular cerebral e um comprometimento subcortical. O acometimento neurológico pode ocorrer pela própria replicação do vírus no tecido nervoso, ou indiretamente pela resposta imunológica do paciente. Estas alterações podem levar ao comprometimento da qualidade de vida, talvez secundárias as queixas de sono. O sono é um estado fisiológico-comportamental que se associa com o sistema imune e com várias citocinas como IL1, IL2, IL-6, TNF- e IFN-. Pouco se sabe sobre as manifestações neurológicas, incluindo o sono, a resposta imune e o perfil de citocinas entre estes pacientes. Desta forma o objetivo do presente estudo é avaliar as manifestações neurológicas como os distúrbios do sono, a resposta imune celular e

o perfil de citocinas, o genótipo viral entre esses pacientes HCV + da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Para a avaliação da resposta imune celular foi utilizado a fenotipagem dos leucócitos do sangue periférico e para a avaliação das citocinas Th1 e Th2 e inflamatórias o ELISA. As alterações neurológicas foram avaliadas por um questionário clínico criado para o estudo. A qualidade do sono foi avaliada pelo Questionário de Pittsburg (PSQI) e de fadiga pela escala FSS. Nossos resultados mostraram que as manifestações extra-hepáticas são muito frequentes entre eles a fadiga, artralguas e mialgias. As queixas de sono foram tão frequentes quanto às demais com 72,4% entre os pacientes. Os pacientes tiveram uma média de PSQI de 6,21 e de FSS de 3,16. Pacientes HCV positivos apresentam uma maior ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e marcação para CD69<sup>+</sup>, além de níveis elevados de citocinas IL-6, IL-12 e IL-8 do que controles saudáveis. Os pacientes com Hepatite C com queixas de sono apresentam mais fadiga e níveis aumentados de IL-4 e IL-6 podendo corresponder como um marcador de sono ruim nestes pacientes. O genótipo 1 foi o mais frequente, seguido do genótipo 3 e do genótipo 2 na nossa região. O genótipo 1 tendeu a uma maior secreção de citocinas supressoras Th2, além de maiores níveis de ALT/AST, do que os outros genótipos, embora não atingisse valores estatisticamente significantes. O HCV foi isolado do líquido de apenas um paciente do estudo. Uma das possíveis explicações para tais manifestações neuro-psiquiátricas seria uma ação conjunta do vírus sobre o SNC e a resposta imune, com a secreção de algumas citocinas como IL-4, IL-6. No entanto é necessário mais estudos sobre a ação do HCV sobre o SNC e o papel destas citocinas na produção desses sintomas.

Palavras-chaves: Hepatite C; Resposta Imune; Sono

## ABSTRACT

Hepatitis C is a major public health problem today with about 180 million people infected worldwide. The HCV is a single-stranded RNA virus, belonging to the family *flaviviridae*. The HCV is a highly immunogenic agent infectious leading to the development of a strong humoral and cellular immune response. But about 80% of patients develop into a chronic disease, and may develop liver cirrhosis or cancer. Only 15-20% of patients infected exhibit viral clearance and evolve to cure. The mechanisms by which HCV escape of the immune system are not yet fully known, but the polarization of immunity through the production of cytokines seems to be a major cause. Patients infected by HCV may have several extra-hepatic manifestations such as fatigue, depression and sleep disorders. The neurological manifestations may involve the peripheral nervous system in the form of polyneuropathy or the central nervous system such as sub-acute encephalopathy, stroke and a subcortical involvement. The neurological involvement can occur by the replication of the virus in nerve tissue, or indirectly by the patient's immune response. These changes may lead to compromise the quality of life, perhaps secondary complaints of sleep. The sleep is a physiological state-behavioral which combines with the immune system and with various cytokines such as IL1, IL2, IL-6, TNF- and IFN- . Little is known about the neurological manifestations, including sleep, the immune response and the profile of cytokines among these patients. Thus the objective of this study was to evaluate the neurological manifestations such as sleep disorders,

the cellular immune response and the profile of cytokines, the viral genotype among those HCV + patients of the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. For the evaluation of the cellular immune response was used to flow cytometry and for the evaluation of Th1 and Th2 cytokines and inflammatory an ELISA test. The neurological manifestations were assessed by a questionnaire designed for the clinical study. The quality of sleep was assessed by questionnaire from Pittsburg (PSQI) and the fatigue scale (FSS). Our results showed that the extra-hepatic manifestations are very frequent among them fatigue, arthralgia and myalgia. Complaints of sleep were so frequent as to the other with 72.4% among patients. The patients had a mean PSQI of 6.21 and 3.16 for FSS. HCV positive patients have a higher activation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and CD69<sup>+</sup>, high levels of cytokines IL-6, IL-12 and IL-8 than healthy controls. Patients with Hepatitis C with complaints of sleep have more fatigue and increased levels of IL-4 and IL-6 and could be a marker of poor sleep in these patients. The genotype 1 was the most common, followed by 3 and 2 in our region. The genotype 1 tended to increased secretion of Th2 cytokines suppressor, and higher levels of ALT/AST, than the other genotypes, although not statistically significant. The HCV was isolated from the liquor of only one of the study patients. One of the possible explanations for such neurological and psychiatric events would be a joint action of the virus on the CNS and the immune response, with the secretion of some cytokines such as IL-4, IL-6. But we need more studies on its share of HCV on the CNS and the role of these cytokines in the production of these symptoms.

Keywords: Hepatitis C; Immune response; Sleep.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência e distribuição dos pacientes	44
Tabela 2	Sintomas apresentados pelos pacientes do estudo	46
Tabela 3	Frequência dos pacientes, Escalas de Epworth, Pittsburg e Krupp, TGO e TGP	48
Tabela 4	Distribuição segundo a média das citocinas em pacientes HCV e controles saudáveis	51
Tabela 5	Correlação das citocinas com o questionário de Pittsburg e escala de Epworth	52
Tabela 6	Correlação das citocinas com TGO-AST	55
Tabela 7	Correlação das citocinas com TGP -ALT	55
Tabela 8	Comparação entre os dois grupos Sono1 e Sono-2	56
Tabela 9	Análise dos resultados da citometria de fluxo entre pacientes e controles	57
Tabela 10	Caracterização e distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C	59
Tabela 11	Análise das citocinas entre os genótipos	64

Tabela 12	Transaminases e genótipos virais	65
Tabela 13	Análise do líquido dos pacientes com HCV e PCR	65

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1	Ciclos no termociclador	37
Quadro 2	Programa dos iniciadores	38
Quadro 3	Iniciador utilizado	38
Quadro 4	Ciclos no termociclador	40

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Genoma do vírus HCV	16
Figura 2	Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo	32
Figura 3	Agarose com produtos de PCR	39
Figura 4	Gel de agarose corado com brometo de etídeo contendo amostras de líquor (21 e 22). A amostra 21 mostra a formação da banda após a corrida por eletroforese	66
Figura 5	A-Paciente FFL com RM cerebral corte axial demonstrando lesão com hipersinal em substância branca na seqüência Flair. B-Paciente VSC com RM cerebral corte axial demonstrando lesão com hipersinal em substância branca na seqüência Flair. C-Paciente VSC com RM cerebral corte sagital demonstrando lesão com hipersinal em substância branca na seqüência Flair. D- Angioressonância cerebral normal de um paciente.	67
<i>Figura 6</i>	Modelo neuro-imune no surgimento das manifestações neuropsiquiátricas na infecção pelo HCV.	76
Gráfico 1	Avaliação da escala de sono de Pittsburg entre os 33 pacientes com Hepatite C	47
Gráfico 2	A-Correlação da Escala de fadiga com a de Pittsburg nos 33 pacientes estudados B-Correlação da Escala de fadiga com a de Epworth nos 33 pacientes estudados	49
Gráfico 3	A-Correlação da Escala de fadiga nos 33 pacientes com a TGO B-Correlação da Escala de fadiga nos 33 pacientes com a TGP	50
Gráfico 4	A-Correlação da IL-4 com a escala de fadiga nos 33 pacientes B-Correlação da IL-6 com a escala de fadiga nos 33 pacientes C-Correlação da IL-8 com a escala de fadiga nos 33 pacientes D-Correlação da IL-10 com a escala de fadiga nos 33 pacientes	53
Gráfico 5	A-Correlação da IL-12 com a escala de fadiga nos 33 pacientes B-Correlação do TNF- $\alpha$ com a escala de fadiga nos 33 pacientes C-Correlação do IFN- $\gamma$ com a escala de fadiga nos 33 pacientes	54
Gráfico 6	Genótipos do vírus da Hepatite C encontrados na população de estudo	58

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Gráfico 7	A-Relação da carga viral com L TCD4 <sup>+</sup> B-Relação da carga viral com L TCD8 <sup>+</sup>	60
Gráfico 8	Associação da carga viral e fadiga nos pacientes HCV positivos	60
Gráfico 9	A-Relação da carga viral com M69 <sup>+</sup> nos pacientes infectados B-Relação da carga viral com N69 <sup>+</sup> nos pacientes infectados C-Relação da carga viral com L69 <sup>+</sup> nos pacientes infectados D-Relação da carga viral com E69 <sup>+</sup> nos pacientes infectados	61
Gráfico 10	A-Relação da carga viral com IL-6 nos pacientes infectados. B-Relação da carga viral com TNF- $\alpha$ nos pacientes infectados. C-Relação da carga viral com IL-8 nos pacientes infectados	62
Gráfico 11	A-Relação da carga viral com IL-4 nos pacientes infectados. B-Relação da carga viral com IL-10 nos pacientes infectados.	62
Gráfico 12	A-Relação da carga viral com IL-12 nos pacientes infectados B-Relação da carga viral com IFN- $\gamma$ nos pacientes infectados	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>Ângio-RM</b>	Ângio-Ressonância
<b>EEG</b>	Eletrencefalograma.
<b>EMG</b>	Eletroneuromiografia
<b>EOG</b>	Eletro-oculograma.
<b>FSS</b>	Fatigue Severity Scale
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-12</b>	Interleucina-12
<b>IFN</b>	Interferon.
<b>IFN-</b>	Interferon-gama
<b>IFN-b</b>	Interferon -beta
<b>IRF-3</b>	Fator liberador de Interferon-3.
<b>5-HT</b>	5-Hidroxitriptamina.
<b>LTCD4<sup>+</sup></b>	Linfócito TCD4 <sup>+</sup>
<b>LTCD8<sup>+</sup></b>	Linfócito TCD8 <sup>+</sup>
<b>NAA</b>	N-Acetil Aspartato
<b>NK</b>	Natural Killers
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NREM</b>	Sono não-REM
<b>Pg/ml</b>	Pico-grama/ml
<b>REM</b>	Sono REM.
<b>RM</b>	Ressonância Magnética.
<b>Sd</b>	Desvio Padrão
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SOCS</b>	Citocinas inibitórias.
<b>TNF-</b>	Fator de Necrose Tumor-alfa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Hepatite C no mundo.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 O vírus C.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Os Genótipos virais.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Transmissão.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Resposta imune ao HCV.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 A hepatite C e as manifestações neurológicas.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Sono e o sistema imune.....</b>	<b>23</b>
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Geral.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Modelo de estudo.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 População de estudo.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Amostragem.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Critérios de inclusão e exclusão.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5 Avaliação neurológica e avaliação do sono.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6 Coletas de amostras.....</b>	<b>31</b>
3.6.1 Análise dos fenótipos celulares através da citometria de fluxo .....	31
3.6.2 Quantificação de citocinas.....	33
3.6.3 Exame de Líquor.....	34
<b>3.7 Análise Molecular do HCV.....</b>	<b>36</b>
3.7.1 Extração de RNA.....	36
3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	37
3.7.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	37
3.7.4 Purificação dos produtos amplificados.....	38
3.7.5 Quantificação dos produtos de PCR.....	39
3.7.6 Seqüenciamento dos produtos de PCR.....	39
3.7.7 Reação de Precipitação.....	40
3.7.8 Análise de Seqüências.....	41
3.7.9 PCR Quantitativo.....	41
<b>3.8 Exames de imagem.....</b>	<b>41</b>
<b>3.9 Análise dos resultados.....</b>	<b>42</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Anamnese e exame neurológico.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Questionário clínico e o sono.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Escala de sonolência de Epworth e de fadiga (FSS).....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Análise do perfil de citocinas em pacientes com Hepatite C.....</b>	<b>50</b>
<b>4.5 Análise da citometria de fluxo nos pacientes HCV positivos.....</b>	<b>57</b>
<b>4.6 Distribuição genotípica do HCV na população de pacientes infectados.....</b>	<b>58</b>
<b>4.7 Análise líquor e Ressonância Magnética cerebral dos pacientes HCV.....</b>	<b>65</b>
<b>5. DISCUSSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>93</b>

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 A Hepatite C no mundo**

A Hepatite C é considerada, na atualidade, um problema de saúde pública e econômica mundial. Segundo dados da OMS, é a principal causa de hepatite pós-transfusional, correspondendo a 80-90% dos casos e com alto grau de cronificação (KOZIOL et al., 1986; KUO et al., 1989; ALTER et al., 1992; OMS, 2007). Estima-se que 180 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente pelo vírus C e que 3 a 4 milhões sejam contaminadas anualmente (OMS, 2007). O continente americano é responsável por 13,1 milhões de casos. O Brasil é um dos países que mantém uma endemicidade intermediária com taxas de prevalência de 2,6 casos por 100.000 habitantes, ficando atrás apenas da Bolívia (11,2 casos/100.000), países africanos como a Nigéria, Mongólia, Ruanda, República do Congo, Egito e alguns países orientais como a Tailândia e o Vietnam (OMS, 1999).

Na Região Amazônica os estudos até hoje realizados mostram uma soroprevalência que varia de 0,37% a 2,4% na população geral (FERRARI et al., 1999; SOUTO et al., 1999; PAULA et al., 2001; SOUTO et al., 2001; KHOURI et al., 2005).

Souto et al. (1999), em um estudo de prevalência dos marcadores do vírus C na região de Terra Nova, observaram a presença de anticorpos para o HCV no soro em 2,4% da população. Os pesquisadores associaram a infecção ao uso de drogas ilícitas e cirurgias prévias. Eles concluíram que a Amazônia tem uma endemicidade viral intermediária.

Corroborando os dados anteriores, Paula et al (2001) em um trabalho de campo na região do rio Purus e Acre, verificaram a prevalência do vírus C em 1,7% dos pacientes daquela região.

## **1.2 O Vírus C**

O vírus da Hepatite C foi detectado em 1989 por Choo e colaboradores, através do sangue de chimpanzés infectados experimentalmente com sangue de pacientes com Hepatite não-A, não-B. Ele é um vírus RNA de fita simples, formado por aproximadamente 10.000 nucleotídeos e menos de 80 nm de diâmetro (CHOO et al., 1989).

O HCV pertence à família *flaviviridae*, gênero hepacivírus e apresenta muitas semelhanças genômicas com outros da mesma família, por exemplo, com o vírus da Dengue, da Febre Amarela, da Encefalite Japonesa e com os pestivírus (KATO et al. 1990; CHOO et al., 1991; BUKH et al., 1992). O genoma viral tem uma longa área codificadora ("Open Reading Frame") formada pelas regiões gênicas C, E1 e E2 que codificam as proteínas estruturais do capsídeo e do envelope viral, enquanto as regiões gênicas NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b dão origem a várias enzimas como RNA helicase, RNA polimerase e proteases importantes na replicação viral (FINE, 1995; SUZUKI et al., 2007) (Fig.1).

O genoma viral tem duas regiões terminais: a região terminal 5', com 341 bases nitrogenadas, também denominada região não-variável por manter mais de 90% de homologia entre os vários genótipos existentes, permitindo, assim, o estudo do RNA viral por PCR. Acredita-se que a mesma tenha esta propriedade por ser um local de importância para a expressão e replicação viral (HAN et al. 1991; BUKH et al. 1992; FINE 1995). A região terminal 3' tem consideráveis variações no seu comprimento e sequência de bases, sendo também conhecida como região hiper-variável e responsável pela presença de diferentes genótipos do HCV (BUKH et al., 1992).

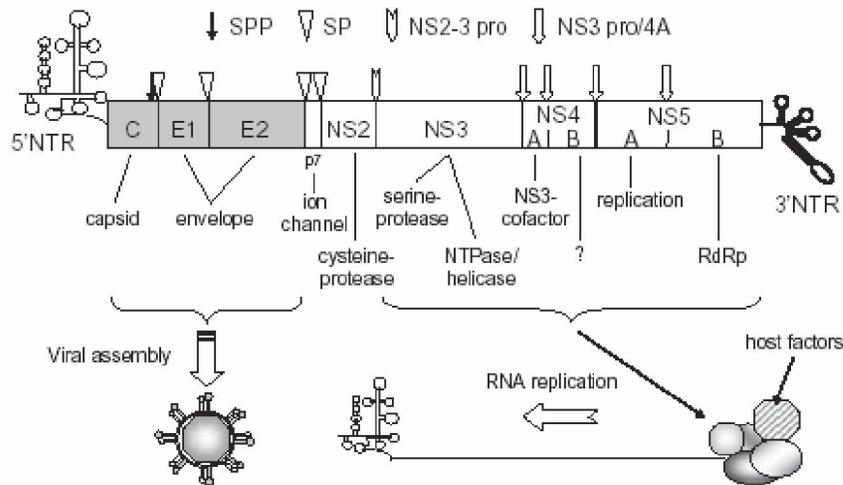


Figura1- Genoma do vírus HCV

Fonte: SUZUKI et al. 2007

### 1.3 Os genótipos virais

Atualmente, pela análise de seqüência de bases do genoma do vírus C, conhecem-se 6 genótipos distintos (1 ao 6) com 76 subtipos descritos (SIMMONDS, et al. 1994; SIMMONDS et al. 2005). A distribuição dos genótipos é variável no mundo. Os genótipos 1, 2 e 3 estão presentes na maioria dos continentes, enquanto o genótipo 4 ocorre no norte da África, especialmente no Egito e no Oriente Médio, e os tipos 5 e 6 são prevalentes na África do Sul e Ásia, especialmente em Hong-Kong e no Vietnam (TAKADA et al., 1991; CHA, et al., 1992; TAKADA et al., 1992; BUKH, et al, 1993; KINOSHITA et al., 1993; SIMMONDS et al., 1993; ALONSO et al., 1994; KLETER et al., 1994; MACOMISH, et al., 1994; PISTELLO et al., 1994; RAVAGGI et al., 1994; ZHANG et al. 1995).

No Brasil existem poucos estudos de genotipagem, mas os dados não diferem muito em relação aos encontrados nos países ocidentais, sendo o genótipo 1 responsável pela maioria das infecções (61 a 77%), seguido do genótipo 3 (25 a 39%) e do 2 (1,6 a 4,6%). Os genótipos 4, 5 e 6 correspondem de 0,1 a 0,2% dos casos (GINABREDA et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1999; AMORIM et al., 2004; VOGLER et al., 2004; CAMPIOTTO et al., 2005).

Recentemente, Campiotto et al. (2005), em um estudo envolvendo pacientes com Hepatite C crônica de vários centros nacionais de referências, demonstraram que os genótipos variavam entre as diferentes regiões do País. O tipo 1 foi o mais prevalente em todas as regiões. No Norte, representou 74,1% das amostras, seguido pelos genótipos 3 (22-33%) e 2 (7,1%). O genótipo 2 foi mais frequente na Região Centro-Oeste (11,4%), o tipo 3 no Sul (43,2%). Os tipos 4 e 5 foram raros em todos os estados (0,3-0,2%). Eles concluíram que tal distribuição possa representar uma infecção endêmica de longa data nestas áreas, após a chegada de imigrantes europeus, quando a prática de transfusão de sangue tornou-se comum e nenhum teste para o vírus era ainda disponível.

O conhecimento dos genótipos virais existentes é importante, pois são fortes preditores para a resposta sustentada à terapia com interferon- $\alpha$ . Dados da literatura apontam para uma maior resistência do genótipo 1 à terapia com interferon- $\alpha$  do que os genótipos 2 e 3 (TONG et al. 1997; EASL, 1999).

#### **1.4 Transmissão**

O HCV já foi isolado de várias secreções orgânicas como sangue, medula, bile, mucosa intestinal, oral e líquido (CHOO et al., 1989; CAUDAI et al. 1997; MORSICA et al. 1997; MAGGI et al. 1999; CARROZZO et al. 2002; LASKUS et al. 2002), nervos periféricos

(HECKMANN et al. 1999), substância branca, córtex e gânglio da base (BOLAY et al. 1996; VARGAS et al. 2002; FORTON et al. 2004).

Em mais de 50% dos casos, a transmissão se dá pela transfusão de sangue e derivados contaminados, acidentes com materiais perfuro-cortantes e pelo uso de drogas injetáveis (ALTER et al. 1982; ALTER et al., 1989; ALTER et al., 1990; ROMERO-PEREZ et al., 1990; ALTER et al., 1992).

A transmissão via sexual e a transmissão materna ou vertical são meios raros e incomuns de infecção, sendo responsáveis por menos de 10% de todos os casos (ALTER et al. 1982; ALTER et al., 1989; ALTER et al., 1990; ALTER et al., 1992; ROMERO-PEREZ et al., 1990; OHTO et al., 1994).

### **1.5 Resposta imune ao HCV**

A Hepatite C é uma doença com curso clínico variável. Em geral, ela é lentamente progressiva (FOCCACIA; SOUZA, 2000). Cerca de 15 a 20 % dos pacientes recuperam-se espontaneamente, 25% tem doença assintomática com transaminases persistentemente normais e lesões histológicas hepáticas benignas e o restante, desenvolvem uma hepatite de leve a moderada intensidade com fibrose (EASL, 1999).

Vinte por cento dos pacientes com hepatite crônica desenvolvem cirrose em 10 a 20 anos de doença. Entre estes, há um risco anual de 1 a 4% para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (EASL, 1999).

O quadro clínico se torna mais evidente no início da fase crônica, com o surgimento de disfunção hepática, cirrose, hipertensão portal, coagulopatias e hemorragias (FOCCACIA; SOUZA, 2000). As manifestações extra-hepáticas são comuns e envolvem o tecido cutâneo com o surgimento de vasculites, fenômeno de Raynaud, púrpuras, porfiria cutânea tardia, manifestações neurológicas, desordens auto-ímmunes como doenças do colágeno, Síndrome

Sjogren-like, tireodites, glomerulonefrites membrano-proliferativas, poliarterite nodosa, crioglobulinemia mista e também a associação com vários auto-anticorpos teciduais (GUMBER et al. 1995; PAWLITSKY et al. 1995; CACAOUB et al. 1994, CACOUB et al. 2000; RAMOS-CASALS et al. 2005).

Dados da literatura demonstram que parte das manifestações clínicas observadas em pacientes com Hepatite C acontece devido à resposta imune desenvolvida pelos indivíduos (KIETERSAUER et al. 1997; NELSON et al. 1997).

A Hepatite C caracteriza-se por uma importante resposta imune celular e humoral (COOPER et al. 1999; TAKAKI et al. 2000; THIMME et al. 2001).

A resposta imune humoral é fundamental na neutralização de partículas virais livres e para impedir a entrada do vírus nas células do hospedeiro. No entanto, a resposta imune celular (TCD4<sup>+</sup>) é crítica para a geração e manutenção de um estado antiviral, tanto pela secreção de citocinas estimulatórias de linfócitos B, ativação de células TCD8<sup>+</sup> específicas e pela geração de uma memória imune celular (GRAKOUÏ et al. 2003; ABBAS ; LICHTMAN, 2005).

A produção de citocinas é um fator predominante no perfil da resposta imune. Dependendo do perfil de citocinas produzidas, as células TCD4<sup>+</sup> são divididas em Th1, com conhecida função citotóxica através da ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e produção de citocinas antivirais como IFN- $\gamma$ , IL-12 e inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 ou uma resposta Th2, com função supressora sobre a resposta imune e produção de IL-10 e IL-4 que agem inibindo a secreção de IFN- $\gamma$  e IL-12 (ABBAS; LICHTMAN, 2005; FUKUDA ; NAKANO, 2003).

Os mecanismos responsáveis pelo dano à célula hepática e infecção crônica não são bem conhecidos. Porém dados existentes na literatura apontam a resposta imune e não o próprio vírus como o grande vilão do processo inflamatório crônico (FUKUDA ; NAKANO, 2003). O principal mecanismo de lesão hepática e citotoxicidade parece ser devido à

imunidade celular, com a ativação de células T helper e subseqüentes células citotóxicas TCD8<sup>+</sup> com lise das células-alvo infectadas (FUKUDA ; NAKANO, 2003; KIETERSAUER et al. 1997; NELSON et al. 1997).

Os mecanismos pelos quais apenas 15-20% das pessoas infectadas eliminam o vírus e mais de 50% tornam-se portadores crônicos do HCV, ainda são incertos (KOZIOL et al., 1986; ALTER et al., 1992; COX et al., 2005). Sabe-se, por exemplo, que uma rápida e sustentada resposta policlonal específica Th1 (T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) no início da infecção é fundamental para o controle da viremia e cura (COOPER et al. 1999; TAKAKI et al. 2000; THIMME et al. 2001), enquanto que uma fraca resposta celular específica é, talvez, um dos fatores de persistência do vírus (COX et al. 2005).

Esta habilidade do HCV na evasão da resposta imune se deve, também, a outros mecanismos possíveis, tais como: infecção e comprometimento das células apresentadoras de antígenos (BAIN et al., 2001); modulação da resposta imune do hospedeiro, inibição da sinalização e expressão de IFN- por meio de fatores reguladores de interferon como o IRF-3, bloqueio das enzimas sinalizadoras (JAK/STAT) pelas proteases NS3/NS4 virais (SU et al., 2002; BLINDENBACHER et al. 2003; FOY et al. 2005; LI et al., 2005), ação de citocinas sinalizadoras supressoras (SOCS) produzidas pelas proteínas do vírus (BODE et al. 2003) e o bloqueio do fator NF-kB com a conseqüente diminuição na liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 (FOY et al. 2005). Além disso, como muitos vírus RNA, a inexistência de uma polimerase com atividade corretiva permite a formação de muitas variantes ou quase-espécies, dificultando mais ainda a resposta imune e favorecendo o escape viral (WEINER, et al. 1992; FARCI et al 2000).

## **1.6 A Hepatite C e as manifestações neurológicas**

Há alguns anos, tem-se descrito o surgimento de várias manifestações neurológicas durante a fase aguda e crônica da Hepatite C. O sistema nervoso periférico é, freqüentemente, o mais envolvido na forma de polineuropatias, mononeuropatias, mononeurites múltiplas e poliradiculoneurite aguda (Síndrome de Guillan-Barré), com o comprometimento tanto desmielinizante quanto axonal (CAUDAI et al. 1997; TEMBL, et al. 1999; FILLIPPINI et al., 2002; NEMNI et al. 2003; AMMENDOLA et al. 2005; GEMIGNANI et al. 2005; COLLE et al. 2002).

O envolvimento do sistema nervoso central pela Hepatite C também é descrito apresentando-se como Acidente Vascular Cerebral (AVC) (HECKMANN et al.,1999), Encefalomielite aguda ou progressiva (BOLAY et al., 1999; FUJITA et al., 1999; TEMBL et al., 1999; BUCCOLIERO et al., 2006), Síndrome das Pernas Inquietas (TEMBL et al. 1999) e outras menos caracterizadas como fadiga, perda da memória, desatenção, depressão, parestesias e queixas de sono (LANG et al., 2006). Muitos destas manifestações já podem estar presentes precocemente, porém, é possível ocorrer de não serem associadas à infecção pelo HCV (GUMBER et al., 1995).

É bem estabelecido que o comprometimento é freqüentemente observável em pacientes com insuficiência hepática, termo este conhecido como encefalopatia hepática (FERENCI et al., 2002). O conhecimento do envolvimento precoce do sistema nervoso central (funções corticais) em pacientes não cirróticos e com o vírus C é recente (FORTON et al. 2001; FORTON et al., 2002; HILSABECK et al., 2002; MCANDREWS et al., 2005).

Hilsabeck et al. (2002), em estudo transversal com portadores de infecção crônica pelo HCV, demonstraram a ocorrência de comprometimentos cognitivos precoces na área da

atenção, velocidade psicomotora, flexibilidade mental e aprendizagem, em mais de 50% dos pacientes não cirróticos e estes foram independentes de doenças psiquiátricas, idade e QI.

Em estudo de ressonância magnética com espectroscopia, Forton et al. (2001) demonstraram anormalidade no metabolismo cerebral, com aumento da relação de colina/creatina na substância branca e nos gânglios da base em pacientes com infecção leve pelo vírus C em relação aos controles saudáveis e pacientes com vírus B. Um ano após, Forton et al. (2002), em outro estudo, comparando pacientes com infecção leve pelos vírus C, controles saudáveis e indivíduos com remissão espontânea, observaram um comprometimento maior na concentração e memória de trabalho nos pacientes infectados do que nos outros grupos, junto com um aumento de relação de colina/creatina na substância branca e gânglios da base destes pacientes.

Pouco se sabe como tais manifestações neurológicas ocorrem e se são oriundas de um processo viral direto dentro do sistema nervoso central ou de um processo inflamatório vascular intenso. No entanto, é sabido que o vírus C replica-se em vários sítios extra-hepáticos como nos monócitos, linfócitos, macrófagos (LERAT et al., 1998; LASKUS et al., 2000; LAPORT et al., 2003; RADKOWSKI et al., 2000). Trabalhos recentes mostraram o isolamento de seqüências de RNA viral replicativo em tecido cerebral de necropsia de pacientes infectados cronicamente pelo vírus (LASKUS et al., 2002; VARGAS et al., 2002; RADKOWSKI, et al., 2002; FORTON et al., 2004). A forma pelo qual o HCV penetra no SNC permanece ainda incerta. É possível que o tráfego de células sanguíneas infectadas, especialmente os monócitos/macrófagos, precursores da micróglia, ocasione, lentamente, a troca por células saudáveis, um mecanismo conhecido pelo nome de Cavalo-de-Tróia ("Trojan Horse"), similar ao que ocorre na infecção pelo HIV (PRICE et al. 1988; LASKUS, et al., 2005)

## 1.7 Sono e o sistema imune

Apesar de um considerável progresso no entendimento do mecanismo neurobiológico do sono NREM-REM, não conhecemos, ainda, a sua exata função e tampouco a sua relação com o sistema imune (ZEPELIN et al. 2005).

O sono é considerado um estado fisiológico-comportamental caracterizado por atividade motora reduzida, diminuição da resposta a estímulos, postura estereotípica e estado de consciência reversível (KANDEL et al., 2000).

No seres humanos, o sono é definido por fases cíclicas e alternadas de sono NREM e REM ao longo da noite, com duração média de 60-90 minutos (KANDEL, 2000).

Há quase cem anos, descobriu-se, através de estudos anátomo-patológicos de casos de Encefalite Letárgica (VAN ECONOMO, 1930) e análise do líquor de animais privados de sono (PAPPENHEIMER, 1975), que havia uma rede neural e fatores humorais liberados pelo sistema nervoso central e responsável pela regulação do ciclo sono-vigília (OPP, 2004).

Dentre esses fatores, tem-se descrito que algumas citocinas envolvidas na resposta imune também modulam o comportamento, como o ciclo sono-vigília (MOLDOFSKY et al., 1986). Dentre elas, a IL-1, o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  e, recentemente, a IL-6 são as mais importantes. Sabe-se, por exemplo, que a IL-1 age em alguns neurônios da área pré-óptica hipotalâmica- $Ca^{2+}$  dependentes, estimulando a neurotransmissão gabaérgica (DE et al., 2003; ALAM et al., 2004). Alguns autores relatam que ocorre um pico na liberação de IL-1 e IL-2, especificamente na fase NREM do sono humano (MOLDOFSKY et al., 1986), sendo isso independente da temperatura corporal (TOBLER et al., 1984). A infusão de IL-1 no ventrículo, no hipotálamo anterior e mesencéfalo basal e de TNF- $\alpha$  no córtex, aumenta o sono de ondas lentas (fase 3 e 4 NREM) (TOBLER et al., 1984; MANFRIDI et al., 2003; YOSHIDA et al., 2004). Trabalhos existentes na literatura sugerem que o TNF- $\alpha$  participe da

oscilação do sono de ondas lentas através dos receptores AMPA excitando os interneurônios inibitórios tálamo-corticais (DE et al., 2003). Estudos recentes demonstram que a IL-1 interage com o sistema serotoninérgico em vários níveis e que a microinfusão da mesma no núcleo dorsal da Rafe aumenta o NREM em ratos (IMERI et al., 1999; MANFRIDI et al., 2003).

Trabalhos recentes também sugerem que a IL-6 pode estar envolvida em muitos distúrbios associados a hipersonolência e privação do sono (REDWINE et al., 2000; SHEARER et al., 2001; OKUN et al., 2004).

O sono altera a função imune, com uma diminuição da resposta imune celular com o seu início (MOLDOFSKY et al. 1986), mas também a função imune pode influenciar o sono, como ocorre na vigência de algum processos infecciosos e de algumas doenças imunodeficientes como a AIDS, onde se observam profundas alterações na arquitetura do sono, com o predomínio do sono delta na segunda metade da noite, despertares freqüentes e queixas de fadiga, insônia e sonolência excessiva com a progressiva queda dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, observada no sangue periférico (NORMAN et al., 1990; DARKO et al., 1992; NORMAN et al., 1992; DARKO et al., 1995).

Estudos com privação total e parcial do sono em ratos levam à progressiva debilitação, lesões ulcerosas, aumento da ingestão de alimentos, perda de peso, aumento do gasto de energia, culminando com hipotermia e morte (11-32 dias em privação total e 16-54 em privação parcial) (RECHTSCHAFFEN et al., 1989). Estudos em humanos com privação de 6 até 64 horas levam a uma alteração transitória da resposta celular, com uma diminuição seguida de um aumento do número e da atividade das células "Natural Killers" (NK), uma redução da atividade das linfocinas associada às células NK (LAK), da proliferação mitótica dos linfócitos e diminuição na produção de IL-2 pelos mesmos (MOLDOFSKY et al. 1989; DINGES, et al., 1994; IRWIN et al. 1996).

Apesar dos vários trabalhos relatando a existência de alterações neurológicas entre os pacientes com Hepatite C, pouco se sabe da relação entre a infecção pelo vírus C, a resposta imune e o surgimento de tais manifestações.

Como a função imune está intimamente vinculada ao sono e as alterações deste ocorrem nas mais variadas doenças crônicas (The International Classification of Sleep Disorders, 1997), é provável que o vírus C colabore direta ou indiretamente nas manifestações neurológicas e talvez no sono, podendo, então, ter impacto na qualidade de vida e na adesão do paciente ao tratamento da doença (LEE et al. 1997; BERNSTEIN et al. 2002).

Assim, o estudo da resposta imune celular e humoral e de algumas citocinas na infecção pelo HCV, bem como a sua correlação neurológica com queixas de sono nesses pacientes, é importante para o entendimento da doença, colaborando para uma maior eficácia na preconização do tratamento.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliação da resposta imune em pacientes com hepatite C associado à alterações neurológicas e do sono.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Avaliar o perfil da resposta imune celular em pacientes HCV positivos.

2.2.2 Avaliar o perfil de produção de citocinas dos pacientes com infecção pelo HCV.

2.2.3. Associar a resposta imune com as alterações neurológicas e do sono.

2.2.4 Descrever os genótipos virais e a carga viral nos pacientes HCV positivos.

2.2.5 Relacionar resposta imune, genótipo viral a alterações do sono nos pacientes HCV positivos.

## **3.METODOLOGIA**

### **3.1 Modelo de estudo**

O estudo foi observacional, com base em uma série de casos do tipo descritivo.

### **3.2 População de estudo**

Foi composta de pacientes de demanda espontânea, com o diagnóstico de Hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Estado do Amazonas (FMT-AM) e que ainda não haviam iniciado tratamento clínico no período de junho de 2006 a maio de 2007. O projeto fez parte de um estudo mais abrangente sobre Hepatite C, recebendo apoio financeiro do CNPq, Convênio nº. : 403602-2004-1.

### **3.3 Amostragem**

A população de estudo foi composta por 33 pacientes encaminhados ao ambulatório de hepatites do Hospital Tropical do Amazonas (FMT-AM), com o diagnóstico sorológico positivo para o vírus C. Os pacientes foram convidados a participar do estudo e a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice-F).

Para a análise da citometria de fluxo e citocinas foi criado um grupo controle, composto por 40 doadores saudáveis de sangue, selecionados aleatoriamente.

Após essa primeira fase, os pacientes foram submetidos a um exame clínico/neurológico e responderam um questionário validado internacionalmente sobre

distúrbios do sono. Os pacientes foram divididos em dois grupos: Grupo 1-pacientes com HCV e queixas de sono (Sono 1-“maus dormidores”) e Grupo 2- pacientes HCV e sem queixas de sono (Sono 2 “bons dormidores), de acordo com a pontuação obtida no questionário de Pittsburgh ser maior  $>$  ou  $= 5$  ou  $<5$ , respectivamente. Os dois grupos foram comparados quanto à resposta imune, perfil de citocinas e genotipagem (Apêndice-G).

### **3.4 Critérios de inclusão e exclusão.**

Foram incluídos no estudo todos os pacientes adultos, com mais de 18 anos, com diagnóstico confirmatório, composto de um ELISA e Immunoblot positivos para o HCV, atendidos no ambulatório de hepatite da Fundação de Medicinal Tropical do Amazonas (FMT-AM).

Foram excluídos pacientes com história de uso de drogas ilícitas nos últimos sete anos ou consumo diário de álcool, doenças psiquiátricas diagnosticadas na entrevista ou em tratamento em outros serviços, doenças degenerativas neurológicas ou processos expansivos no sistema nervoso central, diagnosticado pelo exame clínico e pela ressonância magnética de crânio, sintomas sugestivos de apnéia obstrutiva do sono, como ronco, apnéias noturnas e sonolência diurna. Foram, também, excluídos pacientes sob o uso drogas antidepressivas, anti-histamínicos, corticóides, tratamento com interferon ou ribavirina que podiam interferir na secreção de algumas citocinas, segundo Vannier et al. (1993), diagnóstico de outras hepatites virais, diagnóstico de HIV, diabetes mellitus (glicemia de jejum  $>110\text{mg/dl}$ ), pacientes com insuficiência renal crônica, pacientes com doença hepática avançada ou cirrose evidenciada pelo exame clínico e pela ultrassonografia abdominal, além de portadores de distúrbio tireoidiano (hipotireoidismo ou hipertireodismo) diagnosticada através de exames de TSH e T4 livre.

Os pacientes com sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) descobertos durante a pesquisa, foram encaminhados ao ambulatório especializado do próprio hospital para tratamento.

### **3.5 Avaliação neurológica e avaliação do sono**

Os pacientes foram submetidos à rigorosa anamnese clínica e neurológica, com o objetivo de observar sinais e sintomas de insuficiência hepática, cirrose, sinais de vasculites como púrpuras cutâneas, artralgias e todas as outras manifestações extra-hepáticas. Para a avaliação neurológica foi feito teste de força motora, reflexos, avaliação da sensibilidade, avaliação da coordenação e marcha e de nervos cranianos. Para o exame da sensibilidade superficial foram usados um pincel e agulha própria ao exame semiológico. O exame da sensibilidade profunda foi pesquisado com diapasão e avaliação cinética-postural.

Também foi aplicado um questionário (Apêndice-B) composto por informações pessoais, aspectos sociais, econômicos e familiares, dados sobre doenças anteriores e atuais, tratamentos anteriores e em curso, medicamentos em uso, utilização de drogas ilícitas e álcool, percepção sobre a doença e satisfação pessoal, sintomas subjetivos como fadiga, artralgia, mialgia, perda da memória, fraqueza em extremidades, dormência nos membros, cefaléia e insônia.

Para a avaliação da fadiga foi utilizada a definição utilizada em outros trabalhos (GERSHON et al. 2000; FORTON et al. 2001) como uma incapacidade de manter uma força específica sustentada ou incapacidade de manter uma tarefa mental contínua. Os pacientes foram também submetidos a um questionário sobre a severidade da fadiga (Escala de Severidade de Fadiga - FSS) (KRUPP et. al, 1989 ). Esta é uma escala validada internacionalmente com uma sensibilidade e especificidade maior que 90%, diferenciando

indivíduos com e sem fadiga. Ela é composta de nove itens cada uma com pontuação que varia de 1 a 7 pontos. Ela avalia o impacto da fadiga na vida pessoal, profissional e social. A pontuação é somada e dividida por 9. Quanto maior a pontuação maior a severidade da mesma (Apêndice –C).

Todos os pacientes do estudo submeteram-se a um questionário validado internacionalmente: Questionário de Pittsburgh-PSQI (BUYSSE et. al., 1988) (Apêndice-A). Pittsburgh é um questionário usado mundialmente nas pesquisas sobre qualidade do sono, é composto de 19 itens reunidos em 7 grandes grupos que avaliam a duração, a latência, a eficiência do sono e queixas diurnas. Cada grupo recebe uma nota de 0-3 que é somada para compor um escore final ou PSQI -Pittsburgh Scale Questionnaire Index, que varia de 0-21 pontos. Os escores mais altos indicam pior qualidade do sono. A escolha de tal questionário foi feita pelo fato do mesmo ser largamente utilizado, fácil de ser aplicado. Com nível de corte de 5 pontos, ele atinge uma sensibilidade de 89,6% e especificidade de 86,5 % diferenciando indivíduos saudáveis de pacientes com queixas de sono (“bom dormidor/mau dormidor”). Com o mesmo corte atinge-se uma sensibilidade para identificar insones de 84,4%, pacientes com hipersonia de 88% e depressivos por volta de 97%.

A análise da sonolência excessiva foi realizada pela escala de sonolência de Epworth, já validada para o português e que consistia em 8 ítems que mediam a propensão para o sono em várias situações cotidianas. Em cada item o paciente recebia uma nota que variava de 0 até 3 pontos, dependendo da gravidade do seu sintoma. A pontuação máxima é de 24 pontos e a mínima de 0. Para efeito de análise, uma pontuação de 11 ou mais foi considerada indicativo de sonolência excessiva (JOHNS,1991) (Apêndice-D).

### **3.6 Coleta de amostras**

Após aprovação no Comitê de Ética da FMT-AM e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletadas amostras de sangue com e sem anticoagulante para a realização de hemograma, transaminases, TAP, bilirrubinas, glicemia de jejum, uréia, creatinina, sorologias para hepatite A, B e D, HIV, Na, K, TSH e T4 livre na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM). Amostras de sangue foram enviadas ao HEMOAM para o estudo da resposta imune celular e de citocinas.

As Amostras foram armazenadas para pesquisas futuras, conforme Portaria nº. 0092/2005 da Fundação HEMOAM (Apêndice-H).

#### **3.6.1 Análise dos fenótipos celulares através da citometria de fluxo**

Amostras de 50 µL de sangue venoso coletada com EDTA foram incubadas com anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os marcadores de superfície celulares avaliados: anti-CD8<sup>+</sup> (code MHCD0801, lote 08090506, marca CALTAG) e anti-CD69<sup>+</sup> (code MHCD6901, lote 04120906, marca CALTAG) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), este último representa uma marcação para leucócitos ativados, anti-CD4<sup>+</sup> (code MHCD0404, lote 23031206, marca CALTAG) marcados com ficoeritrina (PE) e anti-CD3<sup>+</sup> (code MHCD0306, lote 60010708, marca CALTAG) marcados com terceira cor, foram colocados no fundo dos tubos. Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2 mL de solução de lise. Em seguida, lavadas com 2mL de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas por 7 minutos, a 1300 rotações por minuto. Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante por inversão e adicionou-se 300 µL de PBS a 1% de formaldeído. A leitura foi

realizada no laboratório de Citometria de Fluxo do HEMOAM, no citômetro de fluxo FACScalibur, com sistema de detecção de quatro cores (Becton Dickinson).

A identificação das populações celulares de interesse foi realizada utilizando-se o programa Cell-Quest. Primeiramente identificou-se a população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, utilizando gráficos “dot plot” onde a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos do seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), (FIG. 1A). Posteriormente a seleção da região de interesse, analisou-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células marcadas nessa região, através de histograma de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (FIG. 1B). Após a definição das regiões, o percentual de células positivas foi determinado utilizando-se um histograma simples de análise da região. Os resultados obtidos foram anexados na ficha de acompanhamento do paciente, padronizada para o estudo em causa.

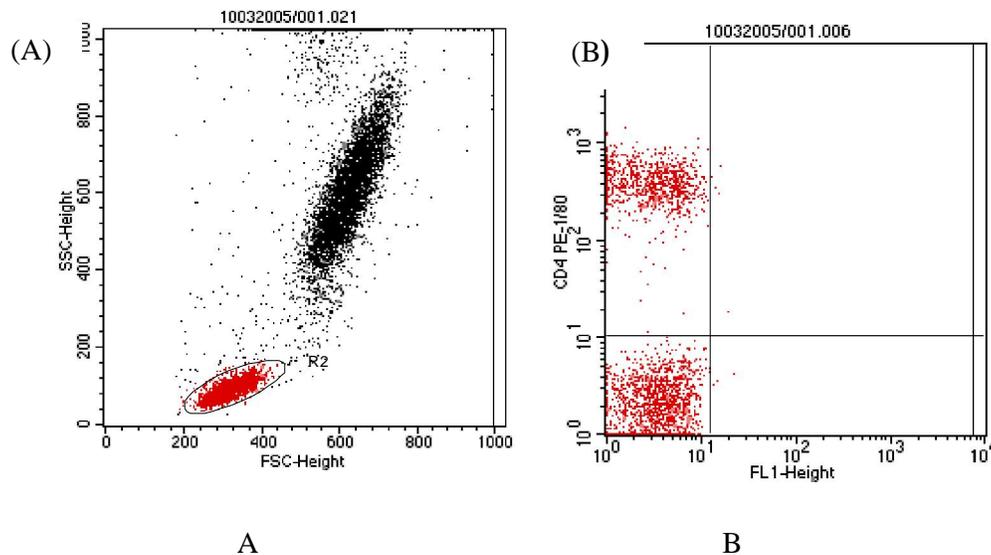


Figura 2- Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráficos Dot plot FSC x SSC são utilizados para seleção da população linfocitária – R2. (B) Histograma; FL1 x FL2 são utilizados para avaliar parâmetros de interesse em populações celulares específicas.

### **3.6.2 Quantificação de citocinas**

Para as dosagens das citocinas humanas foi utilizado o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) usando-se Kits Opteia™ Set Human (BD). De acordo com as especificações do fabricante foram analisadas as citocinas IL-4 (Lote Número 61570), IL-6 (Lote Número 55702), IL-8 (Lote Número 555244), IL-10 (Lote Número 555157), IL-12 (Lote Número: 61371) TNF- (Lote Número 56627), IFN- $\gamma$  (Lote Número 57328). A técnica foi desenvolvida na Fundação HEMOAM.

Inicialmente, a microplaca de 96 poços foi sensibilizada com 100  $\mu$ L por poço com Anticorpos de Captura (Anticorpo primário AC-1°) diluído em tampão de ligação (Carbonato de Sódio 0,1 M). A placa foi envolvida em papel laminado e incubada durante a noite, a 4°C. Após esse período, os poços foram aspirados e lavados 3 vezes com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem (PBS + 0,05% de Tween-20). Concluída a última lavagem, as placas foram aspiradas e invertidas em papel absorvente para remover qualquer tampão residual. Adicionou-se 200 $\mu$ L de diluente de ensaio (Solução Salina Tamponada de Fosfato - PBS + 10% de Soro Bovino Fetal - SBF) em cada poço, envolvido em papel laminado e incubado a temperatura ambiente, por 1 hora.

Durante essa incubação foram preparadas diluições seriadas de cada citocina, cujas concentrações seguiram as especificações do fabricante. As diluições foram realizadas em tubos tipo eppendorf utilizando-se um volume inicial de 600 $\mu$ L no primeiro tubo e, em outros 7 tubos, foram adicionados 300 $\mu$ L da solução diluente. Após acrescido o volume exigido de citocina no primeiro tubo, foram transferidos 300 $\mu$ L para o próximo tubo, agitando entre cada transferência, até obtermos uma curva de diluição seriada.

Após o término do período de incubação, as placas foram aspiradas e lavadas novamente por 3 vezes, com 300  $\mu$ L de tampão de lavagem e, em seguida, invertidas em

papel absorvente para remover qualquer tampão residual. Foram adicionados 100 µL da curva padrão, amostra e controle (PBS + 10% SBF) dentro dos poços apropriados, envolvidas em papel alumínio e incubados a temperatura ambiente, por 2 horas. Após as 2 horas, as placas foram aspiradas e lavadas em 5 ciclos de lavagens no total. Logo em seguida, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção associado à enzima (Anticorpo secundário + reagente SAV-HRP) para cada poço. Novamente, a placa foi envolvida em papel alumínio e incubada à temperatura ambiente, por 1 hora. As placas foram aspiradas e lavadas em 7 ciclos no total, deixando de molho por 30s em cada ciclo. Foram adicionados 100 µL de solução de substrato em cada poço, a placa foi envolvida em papel laminado e incubada à temperatura ambiente por 30 min. Para o bloqueio da reação foram acrescentados 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) em cada poço e realizada a leitura da absorbância a 450 nm em aparelho da marca ASYS (Microplate reader v.1.14) dentro de 30 min após a parada da reação.

Para a análise do perfil de citocinas, foi criado um grupo controle composto por 40 doadores da Fundação HEMOAM. Os valores de citocinas foram medidos em pg/mL.

### **3.6.3 Exame de líquido**

Foram coletadas amostras de líquido através de punção lombar, de acordo com as recomendações da Academia Brasileira de Neurologia (PUCCIONI-SOHLER et al., 2002) e após o consentimento dos pacientes. Aqueles que apresentavam plaquetopenia (plaquetas abaixo de 30.000), anticoagulados, com sinais de hipertensão intracraniana ou sinais neurológicos focais evidenciados ao exame físico eram contra-indicados para a realização do exame.

A avaliação do líquido consistiu da análise física com a observação da cor e do seu aspecto, da citologia e bioquímica, além da bacterioscopia. Para análise da citologia foram

utilizados 0,2 mL de líquido, colocados em uma câmara (câmara de Fucs-Rosenthal). As células e hemáceas foram contadas e o resultado dividiu-se por 3 para o resultado final. Para o exame cito-morfológico foram utilizados 3 a 5 mL do líquido. Este material foi centrifugado por 5-10 minutos à 2000 RPM. Em seguida, foi separado o sedimento do sobrenadante e colocado em lâminas para serem corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (HE), GRAM e Zieh-Nielsen e Nanquim. Após a coloração, as lâminas foram lidas em um microscópio óptico em aumento de 100 X em lente de imersão, possibilitando a diferenciação das células linfomonocitárias dos neutrófilos, bactérias, criptococos e micobactérias.

Para a análise da glicose foi utilizado o método enzimático calorimétrico. Após a centrifugação do líquido, foi separado o sobrenadante. Para a realização da glicose foram separados 40µL do líquido e levados ao banho maria (37°C) por cerca de 10 minutos com reagente. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 505nm. O resultado total foi obtido multiplicando-se o Fator X Absorbância e dividindo-se por 2 com resultado em mg/dl. Os valores de referência corresponderam a 2/3 da glicemia sanguínea.

A análise das proteínas foi realizada pelo Método Turbidimétrico com uso de Acido Sulfossalicílico (SSA) a 3%. Para esta análise foram utilizados 0,4 mL de líquido obtido do sobrenadante centrifugado. Foram adicionados 4,6 mL da solução de SSA a 3% em um tubo com líquido e 4,6 mL em outro tubo com água destilada (branco). Em seguida, foi colocado em repouso por cerca de 10 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro em 420 nm contra o branco. O resultado foi obtido multiplicando-se o Fator X absorbância do teste em mg %. Os valores de referência em adultos são: região lombar 10-40mg/dl; occipital 10-30 mg/dl; ventricular 10-25 mg/dl.

Estas análises foram realizadas no laboratório de Bacteriologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

### **3.7 Análise molecular do HCV**

Amostras de sangue e soro foram coletadas e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e analisadas na Fundação de Medicina Tropical - USP de São Paulo, com a colaboração do Professor Dr. José Eduardo Levi.

#### **3.7.1 Extração de RNA**

Para a extração de RNA-HCV, foram seguidas as instruções do fabricante de QIAmp<sup>®</sup> Viral RNA Kit (Quiagen): pipetou-se 560  $\mu\text{L}$  de solução buffer AVL já preparada, contendo “RNA carreador” dentro de microtubos (ependorfs) de 1,5 mL. Adicionou-se 140  $\mu\text{L}$  de soro no tubo de microcentrífuga com AVL/RNA carreador e os mesmos foram agitados por 15 s em agitador magnético. O material foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15s e centrifugado novamente para remover gotas da tampa. Adicionou-se 560  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) no tubo e agitados por 15 segundos. Colocou-se a coluna fornecida pelo Kit em um microtubo de 2 mL e em seguida, aplicou-se 630  $\mu\text{L}$  da solução de etanol. A amostra foi centrifugada a 8000 RPM por 1 s e posta em outro tubo de 2 mL limpo. Foram repetidas novamente, as etapas anteriores. Então a coluna foi aberta e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do buffer AW1 e centrifugada a 8000 RPM por 60 s. A coluna foi posta em outro tubo de 2 mL limpo, descartando-se o tubo contendo o filtrado. Após esta etapa, a coluna foi aberta e adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do buffer AWZ e centrifugado a 14000 RPM por 4 s. A coluna foi colocada em novo tubo de 1,5 mL e adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  do buffer AVE a  $37^{\circ}\text{C}$ . A coluna foi fechada e deixada em descanso por 60 s. Após esse tempo foi outra vez centrifugada a 8000 RPM por 60s e, finalmente, transferida para um tubo de 1,5 mL, limpo para a realização da síntese do DNA complementar (cDNA).

### 3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada através da reação de Transcrição Reversa (RT), utilizando-se reagentes da Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. O volume final da reação foi de 40,1µL nas seguintes condições: Tampão PCR 1X sem µg, 0,2mM de dNTP (2,5mM), 5mM de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,4 µL de DTT (0,1M), 2,5µM de primers randômico, 1 unidade de enzima inibidora de RNase, e 2,5 unidades de enzima Transcriptase Reversa do vírus da Leucemia Murina de Moloney (M-MLV).

As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos no termociclador conforme o quadro abaixo:

Quadro 1

Ciclos no termociclador

Temperatura	Minutos
65° C	5 minutos
22° C	10 minutos
37° C	30 minutos
95° C	5 minutos

### 3.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a etapa de síntese, o DNA complementar foi amplificado através da técnica de PCR, utilizando-se reagentes da Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA, nas seguintes condições: PCR buffer 1X, 0,2mM de dNTP, 4mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada Primer HC11 e HC18 (Tabela 1), 1,25 unidades de Taq DNA polimerase, 5mM de cDNA,

para uma reação com volume final de 50µL. O programa utilizado para a amplificação por PCR está abaixo, no quadro 2:

Quadro 2

Programa dos iniciadores

Etapa 1	Desnaturação inicial por 5 minutos a 95° C
Etapa 2	Desnaturação por 30 segundos a 94° C
Etapa 3	Hibridização por 30 segundos a 55° C
Etapa 4	Extensão por 1 minuto a 72° C
Etapa 5	Repetição das etapas 2 a 4 por 40 ciclos
Etapa 6	72° C por 7 minutos

O produto amplificado pelos primers HC11 e HC18 gerou um fragmento de 338pb da região 5'UTR do genoma do HCV.

Quadro 3.

Iniciador utilizado

PRIMER	SEQUÊNCIA 5' 3'	BASES
HC 18	<i>GGTGCACGGTCTACGAGACCT</i>	21
HC 11	GGCGACACTCCACCATAGATCACT	24

### 3.7.4 Purificação dos produtos amplificados

A purificação dos produtos amplificados foi feita com a utilização de colunas do kit Microcon Centrifugal Filter Devices Millipore YM-100, seguindo as seguintes etapas: colocou-se uma coluna Microcon-100 dentro de um microtubo de 1,5mL para cada produto de PCR; adicionou-se 300µL de água destilada e deionizada no topo de cada coluna, tornando-se

o cuidado para não tocar na membrana; colocou-se todo o volume do produto de PCR no centro da coluna sem tocá-la; centrifugou-se por 15 minutos a 550 g, à temperatura ambiente; em seguida inverteu-se a coluna em um outro microtubo de 1,5mL e adicionou-se 35µL de água destilada e deionizada no centro da coluna e centrifugando-se por 5 minutos a 650 g.

### 3.7.5 Quantificação dos produtos de PCR

Após a purificação, o produto amplificado foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo em tampão TAE (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para tanto, aplicou-se 5µL do produto amplificado e purificado juntamente com 5µL de Tampão 2X (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 4µL do marcador Low DNA Mass Ladder (Gibco).

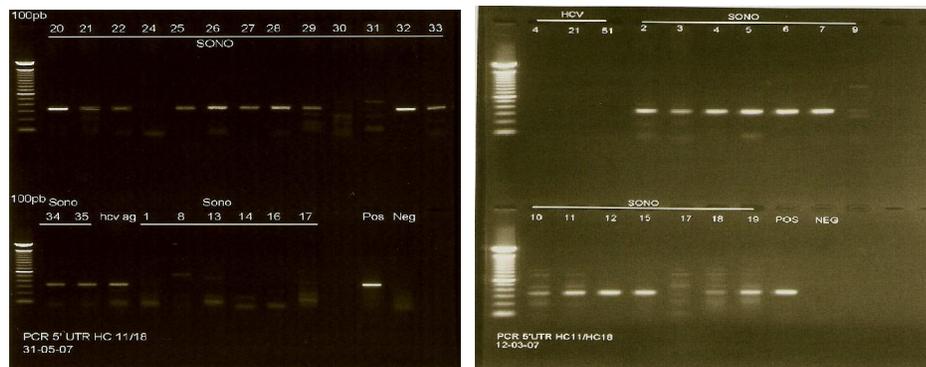


Figura 3-A garose com produtos de PCR

### 3.7.6 Sequenciamento dos produtos de PCR

Foi utilizada a técnica de sequenciamento por PCR, derivada da metodologia de Sanger et al. 1977.

As reações foram realizadas seguindo orientações do kit *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com volume final de 20µL nas seguintes concentrações: 4,4 µL de SaveM oney Buffer 5X, 2,0µL de Mix Big Dye, 3,2 pmol de primer HC11, 100ng de Template, H<sub>2</sub>O qsp 20µL.

As amostras foram submetidas a repetidos ciclos de variação conforme quadro abaixo:

Quadro 4

Ciclos no termociclador

Um ciclo	94°C por 2 minutos
25 ciclos	94°C por 20 segundos
Um ciclo	55°C por 45 segundos
Um ciclo	70°C por 1 minuto
15 ciclos	94°C por 25 segundos
Um ciclo	70°C por 2 minutos

### 3.7.7 Reação de Precipitação

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas com isopropanol para a retirada de dNTPs não incorporados. Foram adicionados 80µL de isopropanol 75% ao produto da reação de seqüenciamento. Em seguida, foram agitadas por 15 segundos, incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos e centrifugadas rapidamente por 20 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 160µL de etanol 80% ao precipitado, agitou-se por 15 segundos e centrifugou-se novamente com rapidez por 5 minutos. A seguir, aspirou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado a 45°C por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 4,0 µL de "binding buffer", reagente fornecido no kit *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). Posteriormente as amostras foram incubadas por 2 minutos a 95°C para desnaturação das fitas de DNA e, imediatamente após a incubação, foram colocadas em banho de gelo até o momento da aplicação no gel para o sequenciamento das amostras.

### **3.7.8 Análise de Sequências**

Foi realizada análise das seqüências obtidas utilizando-se comparação visual com seqüências dos tipos e subtipos virais do HCV 1, 2, 3, 4, 5 e 6, conforme SMMONDS et al., (2005). As seqüências foram analisadas, também através de comparação com seqüências depositadas no banco de dados HCV Los Alamos no site <http://hcv.lanl.gov>.

### **3.7.9 PCR Quantitativo**

A determinação da carga viral nas amostras foi feita seguindo as orientações do kit AMPLICOR HCV MONITOR<sup>®</sup> Test, version 2.0 (Roche) baseada em cinco processos principais: preparação das amostras, transcrição reversa do RNA alvo (síntese do cDNA alvo), amplificação por PCR, hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica.

## **3.8 Exames de imagem**

Todos os pacientes do estudo submeteram-se a uma ultra-sonografia abdominal na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM).

Para os exames de ressonância magnética de crânio os pacientes foram encaminhados a uma clínica conveniada ao SUS (Clínica Magscan). O laudo foi dado por um mesmo radiologista. O estudo consistiu de uma RM de Crânio com angioressonância de 1,5T da Marca Philips com protocolos: axial, sagital e coronal e 3D com seqüências FLAIR e Spin-Echo, T1 com e sem contraste.

### **3.9 Análise dos resultados.**

Os dados foram armazenados e analisados pelo software Epi-Info 3.4.1 de 2007 que é distribuído gratuitamente.

Os dados foram apresentados em gráficos e tabelas de frequências. Na análise das variáveis quantitativas calculou-se a média, mediana e desvio-padrão. Na comparação das médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA) ou teste de t-student quando se encontravam normalmente distribuídos. Quando rejeitada a hipótese de normalidade utilizou-se os testes não-paramétricos de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis. Na análise de duas variáveis quantitativas utilizou-se a correlação linear. O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

## 4 RESULTADOS

Durante o período do estudo foram encaminhados 56 pacientes provenientes do ambulatório de hepatites da FMT-AM. Destes, 23 pacientes foram excluídos por diversas razões: 7 pacientes apresentaram sinais clínicos e exames complementares compatíveis com doença hepática avançada (cirrose), 1 paciente foi excluído por apresentar diabetes *mellitus* na admissão, 2 pacientes não quiseram participar do estudo e 13 pacientes restantes não compareceram durante as fases sucessivas da pesquisa sendo portanto, excluídos. Com isso, sobraram 33 pacientes para análise dos dados.

### 4.1 Anamnese e Exame Neurológico

Dos 33 pacientes, 20 eram homens (60,6%) e 13 eram mulheres (39,3%). As idades dos pacientes variaram dos 20 anos até 88 anos. A idade média foi de 47,57 anos (DP+/- 14,76). A distribuição dos pacientes do trabalho é mostrada na Tabela 1.

Todos os pacientes apresentaram-se em bom estado geral, sem quaisquer sinais de doença hepática crônica, em bom estado nutricional. O peso médio foi de 67,60kg (DP+/- 11,18) e a altura média foi de 1,63m (DP+/- 0,08) e MC médio de 25,44 kg/cm<sup>2</sup>. 81% dos pacientes disseram não fazer uso de quaisquer substâncias alcoólicas, enquanto que 18% disseram consumi-las apenas nos finais de semana. Outros 18,2% pacientes disseram fazer uso no passado, de algum tipo de droga ilícita. A maconha foi a mais consumida (66,7%), seguida da cocaína e heroína, ambos com 18% cada um.

Tabela 1.

Frequência e distribuição dos Pacientes.

<b>Pacientes</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>P (kg)</b>	<b>Origem</b>
1.ARC	51	M	1,72	69	Particular
2.MAAO	49	F	1,56	63	HEMOAM
3.MPN	62	F	1,67	69	HEMOAM
4.FALP	47	M	1,6	86	UBS
5.ACIV	65	M	1,45	47	HEMOAM
6.VSC	54	M	1,75	65	UBS
7.ACA	56	F	1,6	70	HEMOAM
8.ROP	46	F	1,58	76	HEMOAM
9.FAC	60	M	1,55	50	UBS
10.MGSA	46	F	1,6	77	HEMOAM
11.AFS	58	M	1,68	70	UBS
12.RSP	29	M	1,7	61	HEMOAM
13.FFL	72	M	1,6	65	UBS
14.MMR	50	M	1,76	77	HEMOAM
15.FFS	44	M	1,62	98	HEMOAM
16.FPC	44	M	1,56	67	Particular
17.MGS	37	F	1,55	82	HEMOAM
18.MAC	88	F	1,6	52	HEMOAM
19.AMP	43	F	1,52	58	FMT-AM
20.JHP	58	M	1,64	66	UBS
21.VSS	40	F	1,6	55	HEMOAM
22.APL	52	M	1,82	72	HEMOAM
23.JAM	40	M	1,67	78	HEMOAM
24.SSS	20	F	1,52	57	HEMOAM
25.AFA	32	F	1,6	75	HEMOAM
26.WC	33	M	1,72	73	Particular
27.KNB	27	F	1,63	52	HEMOAM
28.RCF	64	M	1,76	78	UBS
29.MSF	26	F	1,6	53	HEMOAM
30.RSN	41	M	1,7	70	HEMOAM
31.RSS	52	M	1,7	60	HEMOAM
32.DCR	50	M	1,7	70	UBS
33.FFT	23	M	1,7	70	HEMOAM

UBS- Unidade Básica de Saúde.

Em relação a transfusões sanguíneas, 25,4% disseram ter realizado, no mínimo, uma transfusão no passado. O tempo das transfusões variou de 4 até 30 anos entre os pacientes.

Vinte pacientes (60%) relataram ter realizado, no mínimo, uma cirurgia prévia. O tempo variou de 2 até 30 anos.

Dos 33 pacientes examinados, em apenas um, 3%, foi observado, ao exame neurológico uma diminuição da sensibilidade superficial tátil em dermatômos de C5 e C6 bilateralmente com padrão em luva, no entanto, sem alteração dos reflexos tendinosos profundos ou da força muscular. Esse paciente foi encaminhado, posteriormente, para uma investigação com exame de eletroneuromiografia (ENMG), embora o objetivo do trabalho não fosse investigar o sistema nervoso periférico, que demonstrou tratar-se de polineuropatia sensitiva desmielinizante. Os resultados dos demais exames neste paciente foram normais. As avaliações foram de glicemia, hemograma, FAN, pesquisa de crioglobulinas, ANCA-p, ANAC-c, fator reumatóide, HIV, TSH, T4 livre, HBSAg. O paciente recebeu o diagnóstico de uma polineuropatia sensitiva desmielinizante, provavelmente secundária ao HCV e possuía o genótipo 2.

#### **4.2 Questionário clínico e o sono**

Foi aplicado um questionário clínico (Apêndice-B) baseados em sintomas, além de informações sobre o consumo de álcool, drogas e uso de tabaco. O questionário continha uma escala visual analógica graduada de 0 a 10 que o paciente inferia sobre a sua qualidade de vida e estado depressivo.

Dos 33 pacientes, 72,7% apresentaram fadiga, 54,5% artralhas, 45,5% dores musculares, 42,4% dificuldade de memorização, 39,4% sono lência e 33% insônia (Tabela 2). Quando somamos a queixa de insônia com a de sono lência, observamos que as queixas de sono chegam próximos as apresentadas pela fadiga com 72,4%.

Cinco pacientes (15%) se achavam deprimidos. Deste, apenas 1 paciente pontuou nota 10. Em relação à vida pessoal, 12,1% disseram ter uma vida excelente (nota 10), enquanto que 15% declararam ter uma vida ruim (nota de 5 a 6) e 63,8% de regular a boa (nota de 7 a 8).

Tabela 2

Manifestações apresentadas pelos pacientes do estudo.

<b>Sintomas (n = 33)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Fadiga	24	72,7
Dores nas juntas	18	54,5
Mialgia	15	45,5
Perda de memória	14	42,4
Sonolência	13	39,4
Dormência nas extremidades	13	39,4
Insônia	11	33,3
Dor de cabeça	9	27,3
Fraqueza nas extremidades	9	27,3
Depressão	5	15,2
Desatenção	4	12,1
Polinuropatia sensitiva	1	3,0

O questionário de Pittsburgh foi aplicado em todos os pacientes com o objetivo de avaliar melhor as queixas de sono. A pontuação variou de 1 até 15 pontos. Observamos que 54,5% dos pacientes apresentaram uma pontuação maior ou igual a 5 indicando uma qualidade de sono ruim. O valor médio foi de 6,21 pontos (Tabela 3 e Gráfico 1). Quando foi perguntado sobre a qualidade do sono, 81,8% responderam que variava de muito bom a razoavelmente bom e 18,2% de razoavelmente ruim a muito ruim. Outros 39,4% relataram que levantavam mais de 3 a 4 vezes à noite por semana e 30% dormiam de 3 a 5 horas de sono por noite. Ainda 27,3% apresentaram dores no corpo ao deitar, com frequência de 3 ou 4 vezes ou mais por semana. Nenhum dos pacientes relatou uso de algum hipnótico na entrevista.

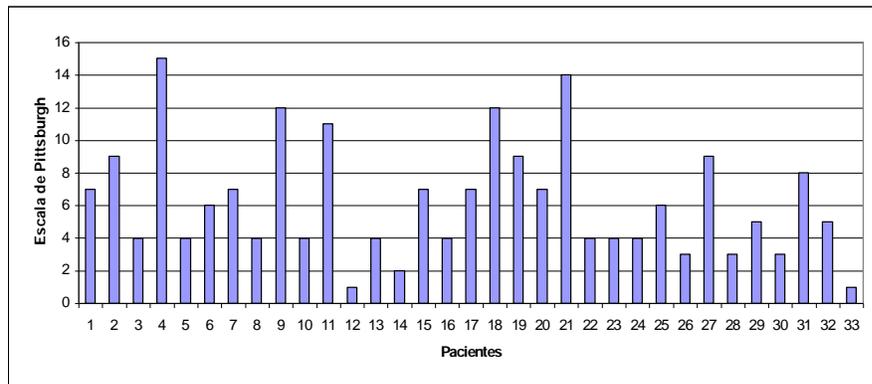


Gráfico 1 - Avaliação da escala de sono de Pittsburgh entre os 33 pacientes com Hepatite C.

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos, de acordo com a pontuação obtida no questionário de sono de Pittsburgh: maior ou igual a 5 pontos- grupo Sono-1 (maus dormidores) que foi composto por dezoito pacientes, e de um grupo com menos do que 5 pontos - Sono 2 (bons dormidores), composto por quinze pacientes. Esses pacientes foram analisados quanto ao perfil de citocinas, resposta imune celular para verificarmos se as alterações imunológicas poderiam estar interferindo nas alterações do sono apresentada por estes pacientes.

#### **4.3 Escala de sonolência de Epworth e de fadiga (FSS).**

Para melhor avaliação da sonolência em situações específicas do cotidiano, foi aplicada a escala de Epworth nesses pacientes. A pontuação variou de 1 até 16 pontos. A média foi de 7,9 pontos (Tabela 3). A média de corte foi considerada maior ou igual a 11 pontos, como indicativo de sonolência excessiva. Dentre os 33 pacientes avaliados 8 (24,3%) tiveram mais de 11 pontos, sendo indicativos de sonolência excessiva. Em nenhum havia história prévia de ronco, apnéias, cataplexia ou uso de quaisquer medicamentos que justificassem os sintomas.

Os pacientes foram também avaliados pela escala de severidade da fadiga (FSS-Krupp), com média de 3,16 pontos (Tabela 3).

Tabela 3.

Frequência dos pacientes, Escalas de Epworth, Pittsburgh Krupp, TGO e TGP.

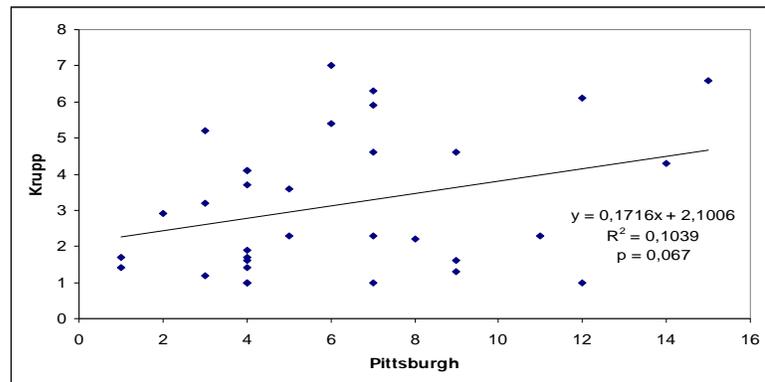
<b>Pacientes</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Epworth</b>	<b>Pittsburgh Krupp</b>	<b>TGO</b>	<b>TGP</b>	
1.ARC	51	M	12	7	4,6	100	209
2.MAAO	49	F	14	9	1,3	28	24
3.MPN	62	F	5	4	4,1	128	173
4.FALP	47	M	12	15	6,6	17	18
5.ACIV	65	M	8	4	3,7	79	109
6.VSC	54	M	11	6	5,4	45	39
7.ACA	56	F	1	7	5,9	69	169
8.ROP	46	F	6	4	1	34	42
9.FAC	60	M	5	12	6,1	165	295
10.MGSA	46	F	7	4	1,7	13	17
11.AFS	58	M	0	11	2,3	154	329
12.RSP	29	M	4	1	1,4	20	17
13.FFL	72	M	9	4	4,1	223	245
14.MMR	50	M	10	2	2,9	93	236
15.FFS	44	M	8	7	2,3	82	142
16.FPC	44	M	10	4	1,9	26	53
17.MGS	37	F	8	7	1	50	60
18.MAC	88	F	7	12	1	64	104
19.AMP	43	F	6	9	1,6	29	43
20.JHP	58	M	9	7	6,3	157	563
21.VSS	40	F	3	14	4,3	73	125
22.APL	52	M	16	4	1,4	91	173
23.JAM	40	M	6	4	1,6	39	115
24.SSS	20	F	3	4	1	24	37
25.AFA	32	F	15	6	7	22	32
26.WC	33	M	16	3	1,2	33	65
27.KNB	27	F	10	9	4,6	16	12
28.RCF	64	M	8	3	3,2	55	99
29.MSF	26	F	11	5	3,6	17	18
30.RSN	41	M	9	3	5,2	36	79
31.RSS	52	M	7	8	2,2	84	84
32.DCR	50	M	3	5	2,3	84	84
33.FFT	23	M	2	1	1,7	22	49
Média	47,57		7,9	6,21	3,16	65,81	116,93
DP	(14,76)		(4,14)	(3,56)	(1,9)	(51,47)	(116,34)

Nossos resultados demonstraram que 8 pacientes (24%) relataram que a fadiga era um dos 3 sintomas mais importantes na sua vida e 7 pacientes (21,2%) mencionaram que essa

mesma fadiga interferia plenamente em seus afazeres profissionais, pessoais e familiares. Do total dos pacientes com fadiga apenas 4 (16%) apresentavam-se deprimidos enquanto do total de deprimidos (5 pacientes) todos se queixavam de fadiga.

Quando foram associados os dados da escala de Krupp (FSS) com a qualidade de sono de Pittsburgh e a escala de sonolência de Epworth verificou-se uma tendência de correlação entre a gravidade da fadiga com a piora da qualidade de sono, mas estatisticamente não foram significantes ( $p=0,067$ ) e não apresentou correlação com a sonolência de Epworth ( $p=0,43$ ) (Gráfico 2-A e B).

(A)



(B)

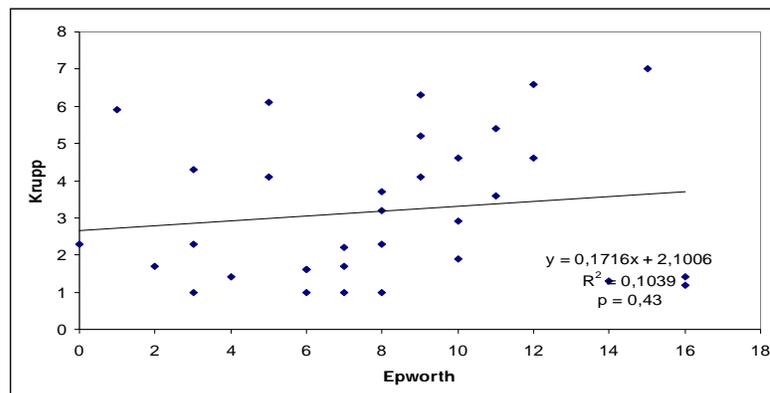
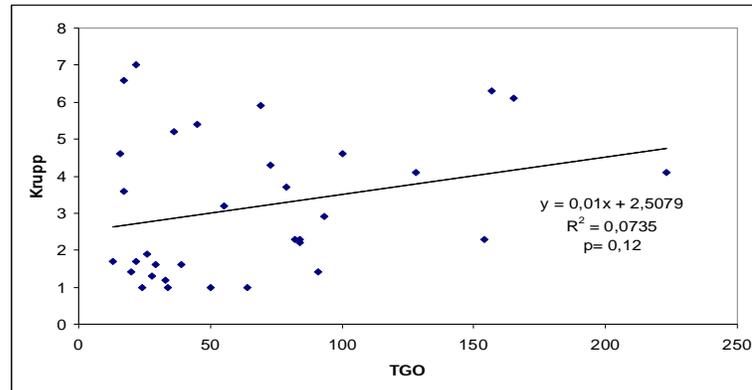


Gráfico 2-A -Correlação da Escala de fadiga com a de Pittsburgh nos 33 pacientes estudados  
B -Correlação da Escala de fadiga com a de Epworth nos 33 pacientes estudados.

Quando a fadiga foi comparada com o grau de atividade inflamatória hepática evidenciada pelos níveis de transaminases (TGO/TGP), observou-se uma leve correlação positiva com os níveis da TGP ( $p=0,057$ ). No entanto não foi observada correlação entre a fadiga e os níveis de TGO (Gráfico 3-A e B).

(A)



(B)

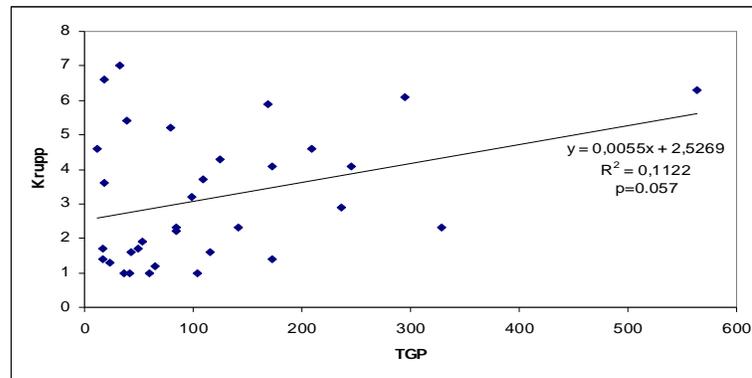


Gráfico 3-A - Correlação da Escala de fadiga nos 33 pacientes com a TGO .  
B - Correlação da Escala de fadiga nos 33 pacientes com a TGP .

#### 4.4 Análise do perfil de citocinas em pacientes com Hepatite C

Foram analisadas as citocinas IL-4, IL6, IL8, IL-10, IL-12, TNF- e IFN  $\gamma$  nas 33 amostras de soro de pacientes HCV positivos e em 40 indivíduos saudáveis, com o parâmetro de comparação.

De acordo com a tabela 4, podemos observar diferenças estatísticas entre os dois grupos (pacientes e controles) para IL-6 e IL-12 e IL-8 (Tabela 4). Nossos dados mostram que pacientes HCV positivos assintomáticos apresentaram aumento nos níveis dessas citocinas, quando comparadas com amostras controles. Por outro lado, não houve diferenças estatisticamente significantes para as citocinas IL-4, IL-10, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  entre os grupos avaliados.

Tabela 4.

Distribuição segundo a média das citocinas em pacientes HCV e controles saudáveis.

Citocinas	Pacientes (n=33)			Controle (n=40)			p *
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
IL-4	40,77	142,67	0	0,59	3,74	0	0,103
IL-6	12,37	38,91	0	0,13	0,62	0	<b>&lt;0,001</b>
IL-8	53,71	92,91	20	37,68	31,99	28,55	<b>0,049</b>
IL-10	0,662	1,713	0	3,36	10,87	0	0,085
IL-12	461,58	447,27	438,90	107,97	94,74	99,90	<b>&lt;0,001</b>
TNF-	0,96	2,78	0	0,99	5,42	0	0,480
IFN $\gamma$	7,55	12,08	0	20,64	69,13	0	0,654

p em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

\* Teste Não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para verificarmos a associação do perfil de citocinas com as alterações de sono entre os pacientes foi realizado um teste de correlação linear entre as citocinas IL-4, IL6, IL8, IL-10, IL-12, TNF- e IFN $\gamma$  e a pontuação obtida no questionário de Pittsburgh e escala de sono-lência de Epworth dos 33 pacientes avaliados. Os dados obtidos não demonstraram

correlação entre os níveis de citocinas, o questionário do sono de Pittsburgh e a escala de sono lência de Epworth (Tabela 5).

Tabela 5

Correlação das citocinas com o questionário de Pittsburg e escala de Epworth.

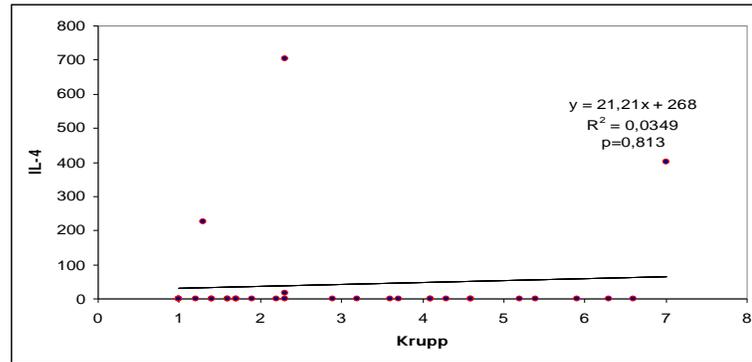
<b>Citocinas</b>	<b>Variáveis</b>		<b>F-test*</b>	<b>p *</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
IL-4	Pittsburgh	Epworth	0,02	0,980	0,00
IL-6	Pittsburgh	Epworth	0,22	0,802	0,01
IL-8	Pittsburgh	Epworth	0,05	0,949	0,00
IL-10	Pittsburgh	Epworth	1,12	0,339	0,07
IL-12	Pittsburgh	Epworth	0,93	0,405	0,06
TNF-	Pittsburgh	Epworth	0,40	0,673	0,03
IFN $\gamma$	Pittsburgh	Epworth	0,12	0,891	0,01

\* Teste de Fisher.

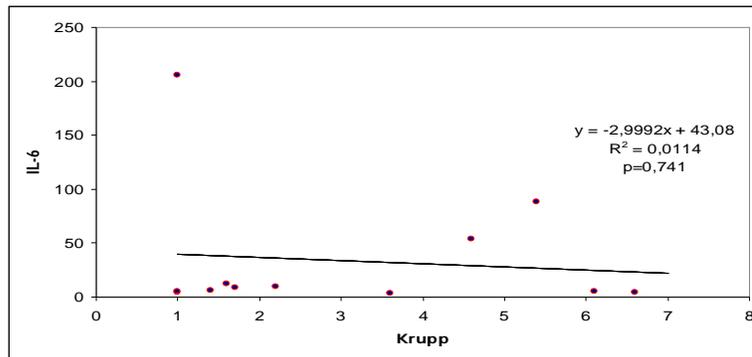
Quando analisamos o perfil de citocinas relacionando-as com a escala de fadiga (FSS), para verificamos alguma associação com o grau desta, observamos que não houve qualquer correlação estatística entre os seus níveis de fadiga e os valores da IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Gráficos 4-5).

As citocinas também foram relacionadas com os níveis das transaminases dos pacientes (TGO-AST e TGP-ALT). Os níveis de IL-10 mostraram correlação com a TGO ( $p=0,042$ ) e TGP ( $p=0,009$ ) enquanto os de IL-12 apenas com a TGP ( $p=0,039$ ). As demais citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  não tiveram correlação significativa com estes parâmetros bioquímicos (Tabela 6 e 7).

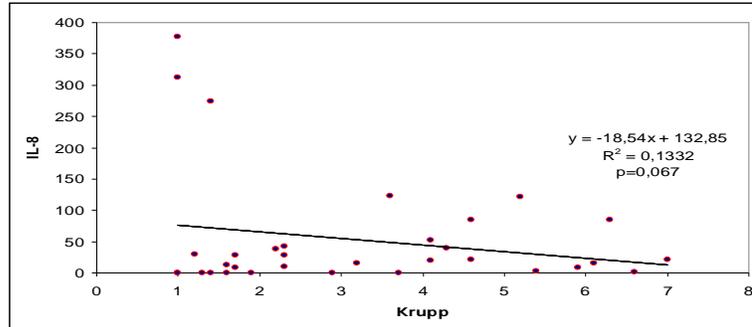
(A)



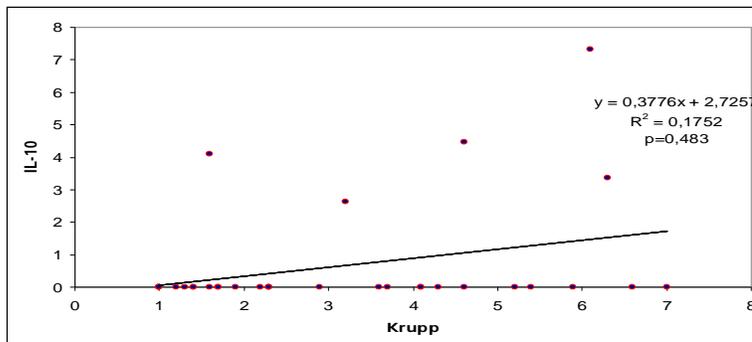
(B)



(C)

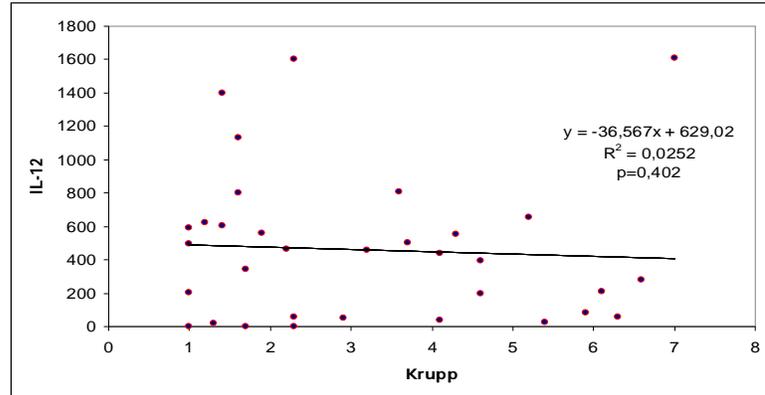


(D)

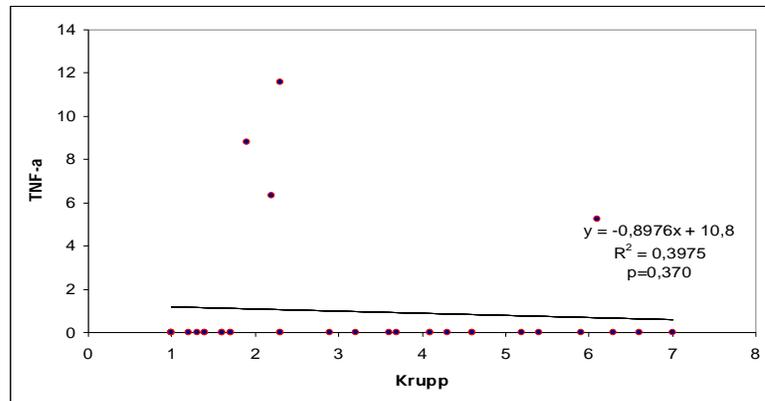


G r á f i c o 4- A Correlação da IL-4 com a escala de fadiga nos 33 pacientes  
B Correlação da IL-6 com a escala de fadiga nos 33 pacientes  
C Correlação da IL-8 com a escala de fadiga nos 33 pacientes  
D Correlação da IL-10 com a escala de fadiga nos 33 pacientes

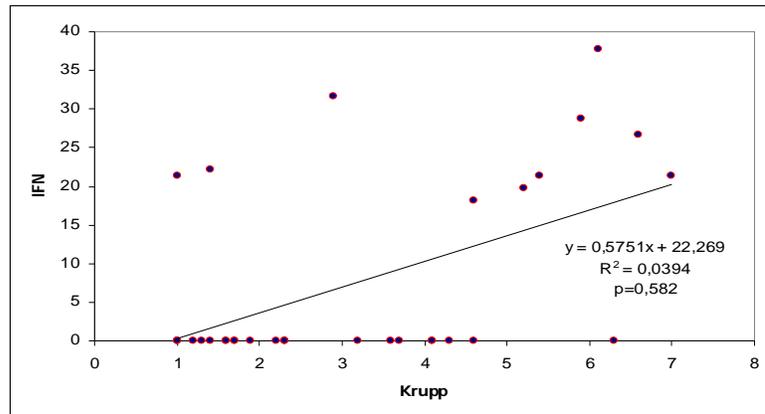
(A)



(B)



(C)



G r á f i c o 5-A Correlação da IL-12 com a escala de fadiga nos 33 pacientes  
B-Correlação do TNF  $\alpha$  com a escala de fadiga nos 33 pacientes  
C-Correlação do IFN  $\gamma$  com a escala de fadiga nos 33 pacientes

Tabela 6

Correlação das citocinas com TGO –AST .

<b>Citocinas</b>	<b>Variáveis</b>	<b>F-test*</b>	<b>p*</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
IL -4	TGO	0,08	0,778	0,003
IL -6	TGO	0,12	0,736	0,004
IL -8	TGO	0,04	0,847	0,001
IL -10	TGO	4,51	<b><i>0,042</i></b>	0,12
IL -12	TGO	4,00	0,054	0,11
TNF -	TGO	0	0,973	0
IFN $\gamma$	TGO	0,36	0,552	0,012

\*Teste de Fisher. p-valor em negrito itálico indica diferença estatística ao nível 5%

Tabela 7

Correlação das citocinas com TGP –ALT .

<b>Citocinas</b>	<b>Variáveis</b>	<b>F-test*</b>	<b>p*</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
IL -4	TGP	0,63	0,434	0,02
IL -6	TGP	0,37	0,548	0,012
IL -8	TGP	0	0,979	0
IL -10	TGP	7,82	<b><i>0,009</i></b>	0,20
IL -12	TGP	4,67	<b><i>0,039</i></b>	0,13
TNF -	TGP	0,12	0,727	0,004
IFN $\gamma$	TGP	0,01	0,905	0

\*Teste de Fisher. p-valor em negrito itálico indica diferença estatística ao nível 5%

Quando os 2 subgrupos: maus dormidores (Sono1) e os bons dormidores (Sono 2), foram comparadas quanto a fadiga, ao nível de citocinas e linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, observou-se que o grupo Sono 1 (maus dormidores) apresentaram mais fadiga do que os pacientes do grupo Sono 2 (p=0,048), tinha níveis de IL-4 (p=0,058) e IL-6 (p=0,071) elevados em relação ao grupo Sono 2 (maus dormidores), embora não atingissem significância estatística. As demais citocinas e os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8 não apresentaram diferenças relevantes entre os dois grupos (Tabela 8).

Tabela 8

Comparação entre os dois grupos Sono1 e Sono-2.

Variáveis	Sono 1 (n=18)			Sono 2 (n=15)			p*
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
Fadiga***	3,8	2,08	3,95	2,4	1,34	1,7	<b>0,048</b>
IL-4	74,75	188,75	0	0	0	0	0,058
IL-6	21,56	51,44	1,77	1,3	2,9	0	0,071
IL-8	46,92	74,40	21,27	61,86	113,48	15,07	0,45**
IL-10	1,06	2,18	0	0,17	0,67	0	0,18
IL-12	441,34	495,80	244,40	485,87	397,01	496,5	0,28**
TNF-	1,28	3,18	0	0,58	2,27	0	0,71**
IFN $\gamma$	8,56	13,03	0	6,33	11,14	0	0,52**
LT CD4 <sup>+</sup>	40,57	8,49	43,25	41,18	6,91	41,79	0,82
LT CD8 <sup>+</sup>	23,46	10,16	21,61	24,03	6,39	22,53	0,85

\* Teste de Mann-Whitney \*\*\* Escala de Fadiga FSS \*\* t-student

#### 4.5 Análise da citometria de fluxo nos pacientes HCV positivos

Como podemos observar na tabela 9, a análise por citometria de fluxo dos marcadores CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup> nas diferentes populações celulares demonstrou que houve aumento expressivo do número de LTCD8<sup>+</sup> nas amostras dos pacientes HCV positivos em relação aos controles, porém, não observamos diferenças significativas quanto ao número de LTCD4<sup>+</sup>.

Quando avaliamos a expressão da molécula CD69<sup>+</sup>, um dos marcadores de ativação celular, nas diferentes populações celulares, concluímos que houve aumento significativo da expressão em linfócitos, neutrófilos e eosinófilos das amostras de indivíduos HCV positivos em relação aos controles saudáveis. Não foi constatado aumento da expressão de CD69<sup>+</sup> em monócitos, nem tampouco diferença significativa nos glóbulos brancos entre os grupos de indivíduos infectados e controles (Tabela 9).

Tabela 9.

Análise dos resultados da citometria de fluxos entre pacientes e controles.

Variáveis	Pacientes (n=33)			Controle (n=40)			p*
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
LTCD4 <sup>+</sup>	40,84	7,70	42,36	43,33	8,15	42,7	0,18
LTCD8 <sup>+</sup>	23,73	8,53	22	19,17	6,4	19,1	<b><i>0,011</i></b>
LCD69 <sup>+</sup>	3,66	1,92	3,43	2,49	1,79	2,04	<b><i>0,0015</i></b>
MCD69 <sup>+</sup>	6,49	4,16	5,19	6,56	4,24	5,92	0,78
NCD69 <sup>+</sup>	1,72	1,64	1,05	1,020	0,84	0,82	<b><i>0,023</i></b>
ECD69 <sup>+</sup>	6,69	3,54	5,86	4,41	1,89	3,90	<b><i>0,0007</i></b>
Leucócitos	5480	1451	5800	5900	1357	5900	0,42

p - em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

\* Teste de Mann-Whitney; M - Monócito; N - Neutrófilo; E - Eosinófilo; L - Linfócitos.

#### 4.6 Distribuição genotípica do HCV na população de pacientes infectados

Dos 33 pacientes estudados, em apenas 22 foi possível realizar a genotipagem do HCV, como mostra o gráfico 6. O genótipo 1 foi o mais prevalente com 41%, seguido do genótipo 3 com 36% e do genótipo 2 com 23%. (Gráfico 6).

A carga viral variou do nível indetectável, ocorrida em 3 pacientes, até 41.586.888 cópias/mL presente em um paciente. A carga viral média foi de 4.764.044,68 cópias/mL.

A relação dos pacientes quanto ao ELISA, carga viral e genótipos é mostrado com detalhes, na tabela 10.

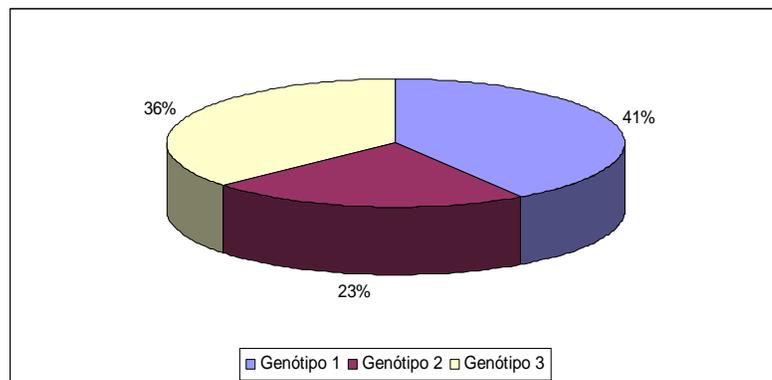


Gráfico 6- Genótipos do vírus da Hepatite C encontrados na população de estudo.

Quando correlacionamos a carga viral dos pacientes infectados em relação ao número de  $LT\ CD8^+$  e  $LT\ CD4^+$ , observamos que houve uma tendência de diminuição da carga viral com o aumento destas células, apesar não atingirem valores significantes (Gráfico 7).

Conforme o gráfico 8 a carga viral foi correlacionada com a queixa de fadiga nos pacientes, porém nenhuma correlação significativa foi feita entre elas ( $p=0,873$ ).

Quando a carga viral foi correlacionada com linfócitos  $CD69^+$  ( $p=0,001$ ), neutrófilos  $CD69^+$  ( $p=0,010$ ), monócitos  $CD69^+$  ( $p=0,002$ ), ocorreu uma correlação expressiva,

demonstrando uma queda da carga viral com a respectiva ativação destas células. Isto, porém não foi observado na população de eosinófilos CD69<sup>+</sup> (p=0,267) (Gráfico 8).

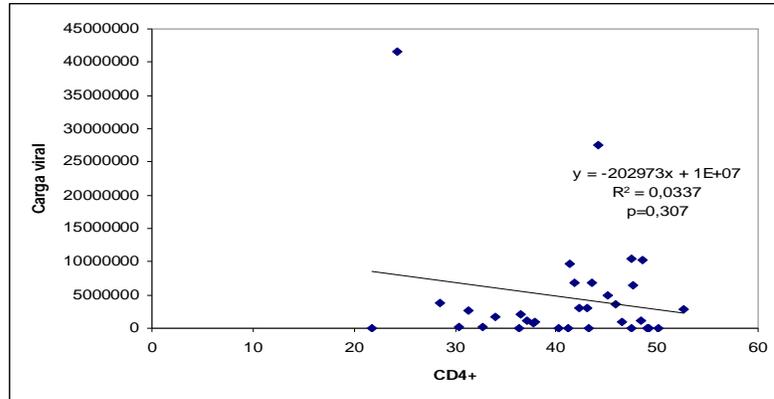
Tabela 10

Caracterização e distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C.

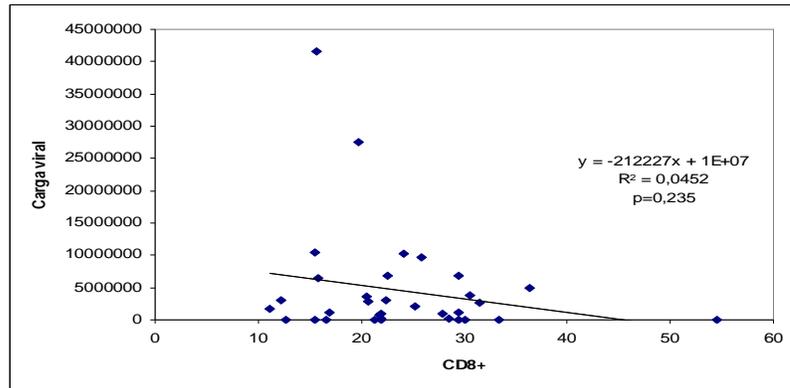
<b>Pacientes</b>	<b>Genótipo</b>	<b>ELISA</b>	<b>RIBA</b>	<b>Cópias/ml</b>	<b>PCR</b>
1 ARC	-	3,583	Reativo	1.663407	Pos
2 MAAO	3	3,679	Reativo	766.340	Pos
3 MPN	3	2,794	Reativo	4.867080	Pos
4 FALP	1	4,000	Reativo	27.576616	Pos
5 ACV	-	4,000	Ind	217	Neg
6 VSC	3	4,000	Reativo	10.184419	Pos
7 ACA	-	3,682	Reativo	323	Neg
8 ROP	3	4,000	Ind	6.884491	Pos
9 FAC	1	4,000	Reativo	6.361009	Pos
10 MGSA	-	1,275	Reativo	285	Neg
11 AFS	2	3,797	Reativo	9.670558	Pos
12 RSP	-	0,709	Ind	299	Neg
13 FFL	1	4,000	Reativo	10.385476	Pos
14 MMR	3	4,000	Reativo	6.837842	Pos
15 FFS	3	4,000	Reativo	3.014799	Pos
16 FPC	-	3,865	Reativo	352	Neg
17 MGS	-	4,001	Reativo	2.024527	-
18 MAC	2	4,000	Reativo	41.586888	Pos
19 AMP	1	4,001	Reativo	893300	Pos
20 JHP	1	4,000	Reativo	1.217613	Pos
21 VSS	2	4,000	Reativo	1.028126	Pos
22 APL	1	4,000	Reativo	2.961692	Pos
23 JAM	1	4,001	Reativo	3.717608	Pos
24 SSS	-	4,000	Positivo	Indetectável	Neg
25 AFA	2	4,000	Reativo	1.176366	Pos
26 WC	1	4,000	Reativo	2.752937	Pos
27 KNB	-	3,026	Ind	indetectável	Neg
28 RCF	2	4,000	Reativo	222396	Pos
29 MSF	-	4,001	Reativo	3.617512	Pos
30 RSN	3	4,001	Reativo	2.754000	Pos
31 RSS	1	4,000	Reativo	282952	Pos
32 DCF	3	4,000	Reativo	Indetectável	Pos
33 FFT	-	0,967	Ind	Indetectável	Neg

Pos= Positivo; Neg= Negativo; Ind= Indeterminado

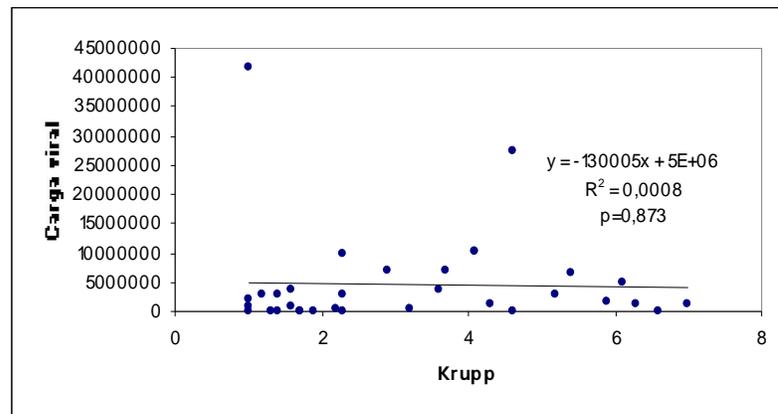
(A)



(B)

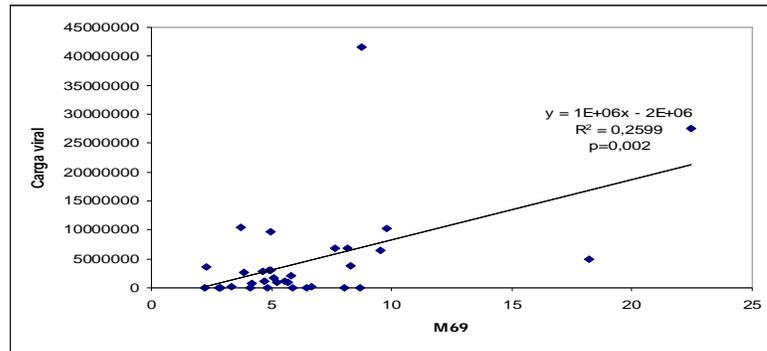


G ráfico7-A Relação da carga viral com L TCD4<sup>+</sup>  
B Relação da carga viral com LTCD8<sup>+</sup>

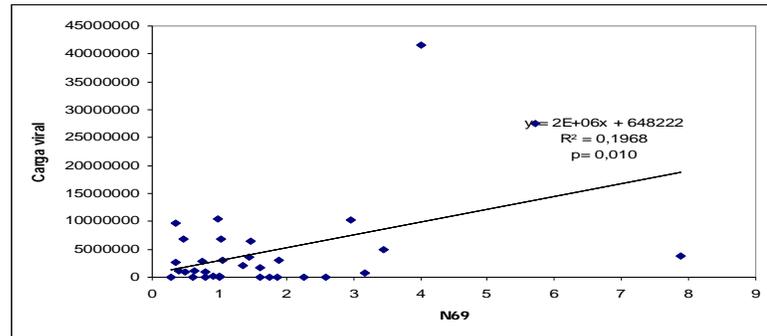


G ráfico 8-A ssociação da carga viral e fadiga nos pacientesHCV positivos

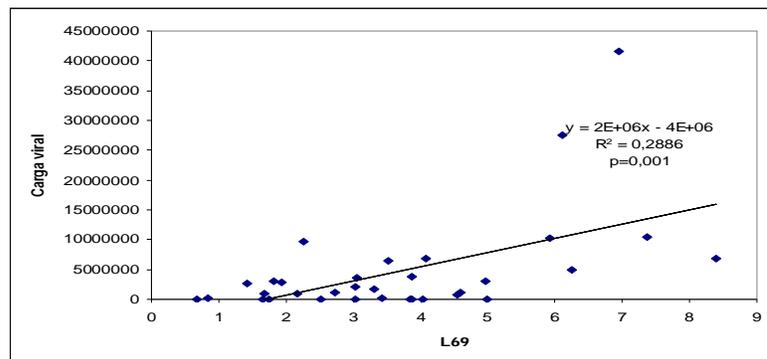
(A)



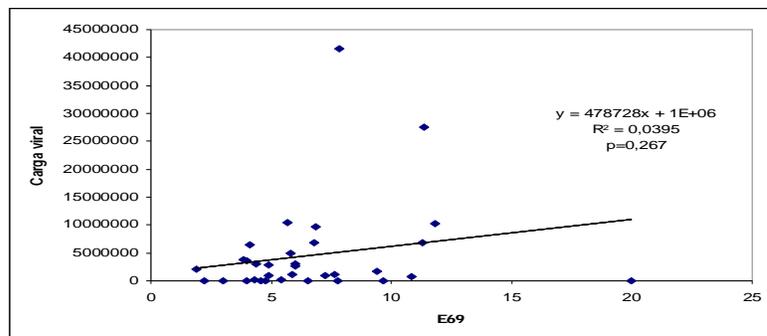
(B)



(C)



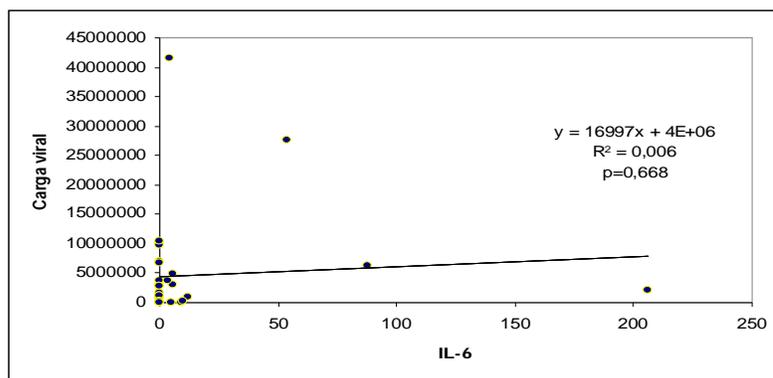
(D)



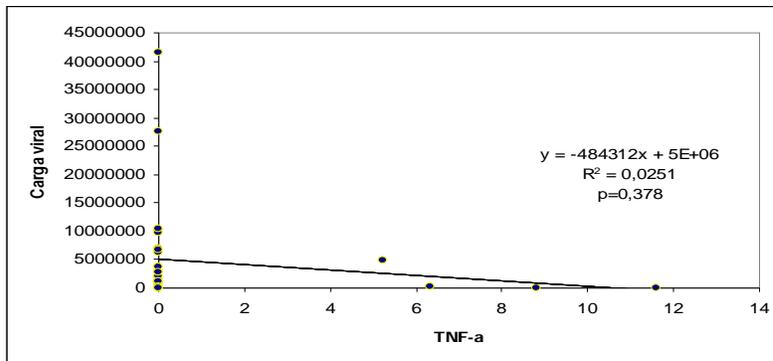
G ráfico 9. A -Relação da carga viral com M69<sup>+</sup> nos pacientes infectados  
B -Relação da carga viral com N69<sup>+</sup> nos pacientes infectados  
C -Relação da carga viral com L69<sup>+</sup> nos pacientes infectados  
D -Relação da carga viral com E69<sup>+</sup> nos pacientes infectados.

Para verificarmos o perfil de resposta imune em relação à carga viral, correlacionamos cada citocina avaliada com os níveis de carga viral. Como mostram os gráficos 10, 11 e 12 observamos um aumento da concentração das citocinas IL-8, IL-12,  $\text{NF-}\gamma$  associado a queda da carga viral, enquanto a IL-10 tende a uma associação inversa, no entanto nenhuma associação foi estatisticamente significativa.

(A)



(B)



(C)

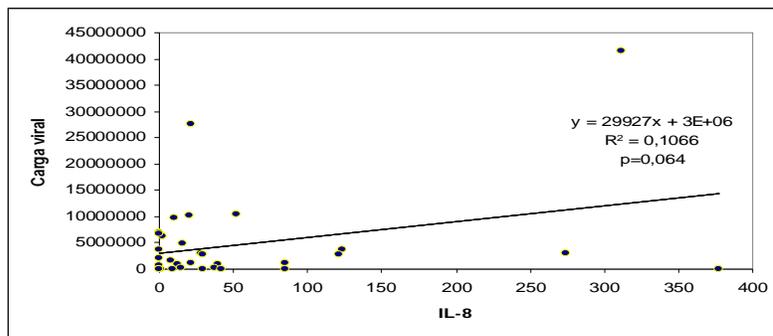
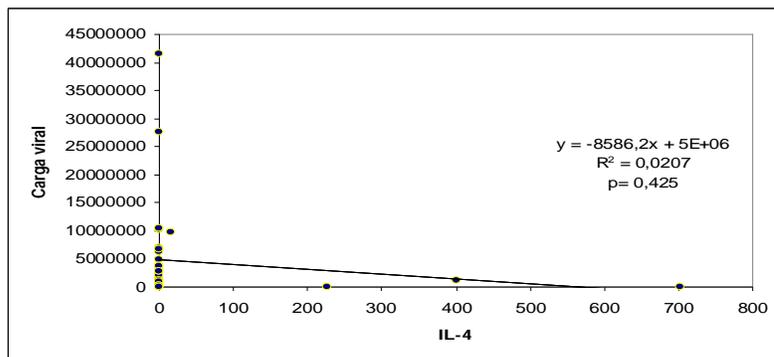
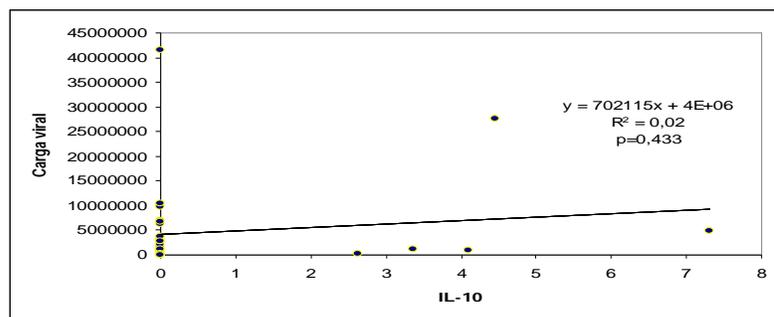


Gráfico 10- A Relação da carga viral com IL-6 nos pacientes infectados.  
B Relação da carga viral com TNF $\alpha$  nos pacientes infectados.  
C Relação da carga viral com IL-8 nos pacientes infectados.

(A)

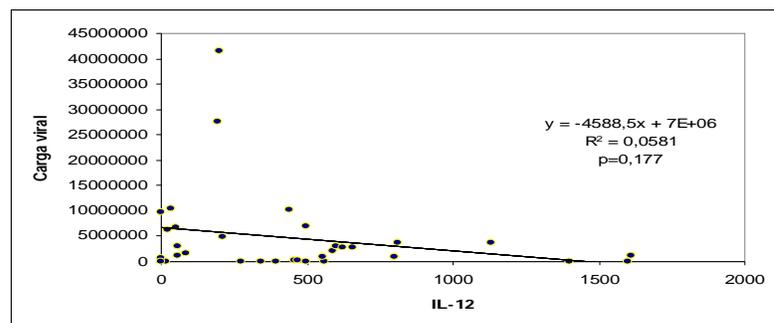


(B)

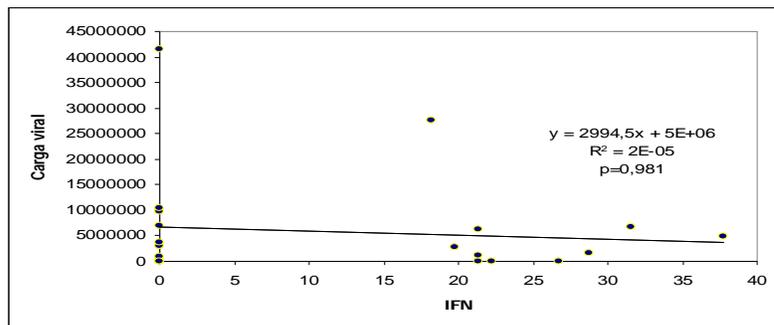


G ráfico 11-A Relação da carga viral com IL-4 nos pacientes infectados.  
B Relação da carga viral com IL-10 nos pacientes infectados.

(A)



(B)



G ráfico 12-A Relação da carga viral com IL-12 nos pacientes infectados  
B Relação da carga viral com IFN  $\gamma$  nos pacientes infectados

Os 3 genótipos encontrados foram comparados quanto ao perfil de citocinas e linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Foi observado não haver diferenças estatisticamente significantes entre os 3 genótipos quanto ao perfil de citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  e também para marcação estas células (Ver tabela 11). Todavia, foi observado um aumento médio de IL-6 ( $p=0,06$ ), IL-10 ( $p=0,63$ ) no genótipo 1 e menores níveis de IL-12 para o genótipo 1 em relação ao genótipo 2.

Tabela 11

Análise das citocinas entre os genótipos.

Variáveis	Genótipo 1			Genótipo 2			Genótipo 3			p*
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
IL-4	0	0	0	83,4	177,9	0	87,8	248,4	0	0,15
IL-6	18,9	31,04	6,01	0,85	1,91	0	0,71	2	0	0,06
IL-8	57,2	85,64	29,7	85,6	79,4	21,0	28,3	40,4	18,0	0,56
IL-10	1,32	2	0	0,52	1,17	0	0,91	2,58	0	0,63
IL-12	436,8	389,6	466	563,7	623,1	456	439,1	526,3	325,3	0,95
TNF $\alpha$	0,70	2,11	0	0	0	0	2,1	4,25	0	0,44
IFN $\gamma$	4,4	8,76	0	4,28	9,5	0	11,1	16,1	0	0,60
LTCD4	38,6	7,37	37,6	38,6	10,0	41,3	45,1	4,76	44,3	0,18
LTCD8	23,2	6,05	22	22,9	6,1	25,7	24,6	7,22	23,3	0,86

\* **Teste de Kruskal-Wallis**

Conforme a tabela 12, foi visto que os pacientes do genótipo 1 apresentaram maiores níveis médio de ALT e AST que os genótipo 2 e 3, embora não atingissem valores significantes.

Tabela 12

Transaminases e genótipos virais.

Variáveis	Genótipo 1			Genótipo 2			Genótipo 3			p- valor
	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	Média	DP	Mediana	
TGP/ALT	170,66	164	115	137,8	112	104	145	85	125,5	0,95
TGO/AST	89	65	84	73,6	48,9	64	87,62	43,59	83	0,68

\* **Teste de Kruskal-Wallis**

#### 4.7 Análise do líquido e da ressonância magnética cerebral dos pacientes HCV

Devido à voluntariedade dos pacientes em fazerem o exame de líquido, obtivemos apenas 3 amostras, no total. Em todos os pacientes a contagem citológica variou de 0 a 2 células. No diferencial citomorfológico, houve o predomínio de linfomonocitário nas lâminas analisadas. Em todas as amostras colhidas houve um discreto aumento da proteína raquia, variando de 42,8 a 50,8 mg. A glicorraquia variou de 57 a 153 mg/dl. Em um paciente a reação em cadeia de polimerase foi positiva para o HCV e em 2 duas amostras o resultado foi negativo. A paciente em questão queixava de intensa fadiga nota 4,2 e intensa insônia e depressão. No líquido, não foram realizadas as reações de sequenciamento de genotipagem para o HCV (Tabela 13).

Tabela 13

Análise do líquido dos pacientes com HCV e PCR.

Pacientes	Celulas	Proteína	Glicose	Gram	Genótipo*	Copias/ml	PCR
13.FFL	2	50,3	99	Ausente	1	indetectável	-
21.VSS	0	25	74	Ausente	2	5.262	+
22.APL	0	50,8	57	Ausente	1	indetectável	-

\* Genótipo sanguíneo



Figura 4-Gel de agarose corado com brometo de etídeo contendo amostras de líquido (21 e 22).A amostra 21 mostra a formação da banda após a corrida por eletroforese

Todos os 33 pacientes foram submetidos à RM de crânio e ângio-ressonância cerebral. Em nenhum deles havia sinais de lesão tumoral expansiva que impedisse a inclusão no estudo.

Em dois pacientes foram observadas alterações nas substâncias brancas periventriculares, caracterizadas como áreas de hipersinal nas seqüências Flair/T2 e hiposinal em T1 e sem impregnação pelo contraste.O primeiro paciente (VSC) tinha 54 anos possuía o genótipo 3 queixava-se de fadiga apenas ao exame. Pontuou 4,1 na escala de fadiga-FSS (média dos pacientes 3,16) e não apresentava queixas de sono, com 4 pontos na escala de Pittsburgh. O segundo (FFL), 74 anos, queixava-se de fadiga e artralgias ao exame, apresentou 4,1 na escala de Fadiga-FSS e também 4 pontos na escala de Pittsburgh. Em nenhum havia história de hipertensão arterial sistêmica (HAS) prévia e em ambos o exame neurológico era normal. Este último foi submetido à punção lombar com resultado demonstrado na tabela 13.

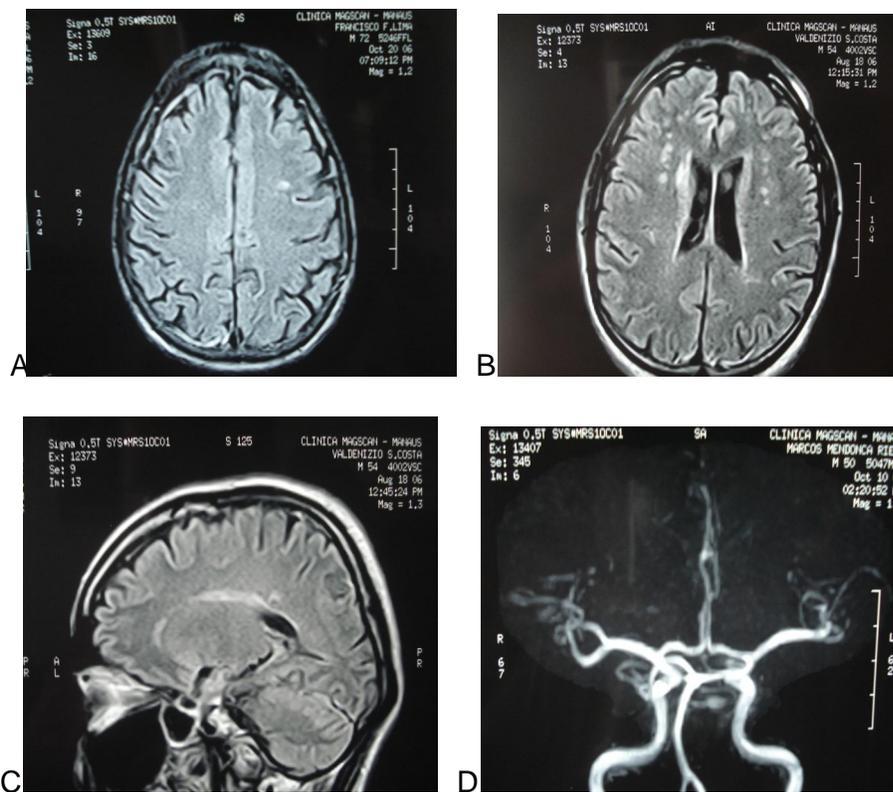


Figura 5. A -Paciente FFL com RM cerebral corte axial demonstrando lesão com hipersinal em substância branca na seqüência F lair.

B -Paciente VSC com RM cerebral corte axial demonstrando lesão com hipersinal em substância branca na seqüência F lair.

C -Paciente VSC com RM cerebral corte sagital demonstrando lesão com hipersinal em substância branca na seqüência F lair.

D - Angioressonância cerebral normal de um paciente.

## 5. DISCUSSÃO

A hepatite C é um importante problema de saúde pública com alto grau de cronificação e com profundo impacto sobre a qualidade de vida (ALTER et al., 1992; OMS, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre as manifestações extra-hepáticas, como a fadiga, a mialgia, os distúrbios do sono e a sua relação com a resposta imune e a secreção de citocinas Th1 e Th2.

Os pacientes da pesquisa eram adultos com média de idade de 47,57 anos, assintomáticos e sem sinais clínicos e ultra-sonográficos de doença hepática avançada. Tivemos o cuidado de excluir vários fatores confundíveis como o uso de drogas, alcoolismo, uso de medicamentos antidepressivos, anti-histamínicos, benzodiazepínicos, o uso de interferon e corticoide que poderiam também causar as manifestações aqui discutidas e alterar o padrão de secreção de algumas citocinas (VANNIER et al. 1993). Além, também de algumas doenças tais como o hipotireoidismo, a insuficiência renal crônica e alguns distúrbios do sono, como a apnéia do sono. Os pacientes não foram submetidos à biópsia hepática por dificuldade na realização ou aceitação por parte dos mesmos, apesar desse procedimento ser considerado como método padrão para se avaliar lesão no tecido hepático.

Nossos dados demonstraram uma frequência elevada de manifestações extra-hepáticas nestes pacientes, como a fadiga, com 72,7% dos casos, seguidos das artralgias (54,5%) e mialgias (45,5%) que foram semelhantes com os achados de outros autores (LEE et al. 1997; LANG et al. 2006). Outras queixas neurológicas como as parestesias nas extremidades (39%), sono lência (39,4%), insônia (33,3%), cefaléia (27,3%) e depressão (15,2%) também foram observadas. Nos pacientes examinados, apenas um apresentava-se com diminuição da

sensibilidade tátil que foi confirmada, posteriormente, com a eletroneuromiografia. Este paciente foi avaliado para algumas doenças reumatológicas como o lúpus, artrite reumatóide, Síndrome de Sjögren, crioglobulinas, além do HIV, e foram consideradas todas negativas. O paciente possuía o genótipo 2 do HCV e foi diagnosticado como uma polineuropatia desmielinizante secundária ao HCV. Há relatos, na literatura, de polineuropatia sensitivas associadas a pacientes com infecção pelo vírus da Hepatite C, com quadro tanto desmielinizante quanto axonal e com PCR para o vírus positivo no líquido, como relatado por Caudai et al. (1997). Em mais de 50% dos casos isso pode estar associado à crioglobulinas do tipo II e III (GEMIGNANI et al. 2005). No entanto, não observamos fatores relacionados ao quadro acima em nosso estudo. Não realizamos ENMG de todos os pacientes, pois não era o objetivo o estudo dos nervos periféricos. Mas, provavelmente alguns deles com queixas de parestesias, poderiam revelar formas subclínicas de polineuropatia e aumentar esta estatística.

Vários estudos mostram que a infecção pelo HCV acarreta a um impacto negativo na qualidade de vida e umas das principais causas são a fadiga e a depressão (GERSHON et al. 2000; GALLEGOS-OROZCO et al. 2003; KALLMAN et al. 2007).

Dentro dos nossos parâmetros de avaliação observamos que quinze por cento de nossos pacientes se sentiam deprimidos, no entanto, nenhum deles utilizava qualquer medicamento ou estava em tratamento psiquiátrico, sugerindo tratar-se de uma depressão leve. Essa constatação foi semelhante a de alguns trabalhos os quais relatam índices que variam de 17% até 58% entre os pacientes portadores de infecção crônica (GALLEHOS-OROZCO et al. 2003; LANG et al. 2006).

Mais da metade dos pacientes (54,5%) apresentaram uma qualidade de sono baixa pelo questionário de Pittsburgh (média de 6,21 pontos) e 24% uma sonolência excessiva, que incapacitava as suas atividades diárias. A maioria apresentava freqüentes dores no tu mas no corpo condizentes com o grau de fadiga e insônia caracterizadas pela dificuldade de iniciar ou

manter o sono e sonolência diurna. Em nenhum deles havia história de roncos frequentes, apnéias ou cataplexia que pudessem justificar tais sintomas. Sabbatini et al. 2005 avaliando a qualidade de sono em pacientes renais crônicos e transplantados renais sem infecção pelo HCV, observaram uma média de 8,52 e 6,46 na escala de Pittsburgh respectivamente, o que foi semelhante aos nossos dados.

A ausência de correlação significativa entre a escala de fadiga (FSS), de Epworth e o questionário de Pittsburgh não pode ser explicada somente pela fadiga, pois apenas 24% dos pacientes a relacionaram como grave, ou seja, a maioria tinha uma fadiga que variou de uma leve à moderada intensidade. Desta forma outros fatores podem estar envolvidos, contribuindo para uma qualidade ruim de sono entre os pacientes. Lang et al. (2006) relataram que os distúrbios do sono, juntamente com a fadiga e da depressão, foram considerados como uns dos sintomas mais incapacitantes, coincidindo com os sintomas relatados pelos nossos pacientes, dos quais, 54,5% apresentaram qualidade ruim de sono quando avaliados por aquela escala. Até o momento não existem relatos na literatura de análise de vários parâmetros da infecção pelo HCV, resposta imunológica, associados às manifestações neuropsiquiátricas, como observado em nosso trabalho.

A fadiga foi a manifestação mais frequente, ocorrendo em 72% dos casos semelhante a estudos prévios nos quais variou de 53% até 71% entre pacientes com Hepatite C (POYNARD et al. 2000; KALLMAN et al., 2007). Entre os pacientes do estudo podemos observar que a média foi de 3,16 pontos na escala de severidade de fadiga (FSS). Quando tais dados são comparados na literatura com os de indivíduos saudáveis (2,3 pontos) (KRUPP et al. 1989), o grau de severidade da fadiga pode ser considerado maior. No entanto, quando comparamos nossos dados com os de pacientes com outras doenças não relacionadas à hepatites, como, por exemplo, o lúpus eritematoso sistêmico (4,7 pontos) e esclerose múltipla (4,8 pontos) (KRUPP et al. 1989), observamos que nossos pacientes apresentaram grau menor

de fadiga. Dos pacientes que tinham fadiga, apenas quatro relataram ter depressão e dos pacientes que apresentaram depressão todos se sentiam com fadiga. Desta forma, é provável que a depressão colabore para o seu surgimento, mas não justifique plenamente a sua fisiopatologia.

Não houve nenhuma associação significativa entre o grau de fadiga, os níveis de AST/TGO ( $p=0,02$ ) e ALT/TGP ( $p=0,057$ ) e a carga viral ( $p=0,873$ ). Esse fato também foi registrado em alguns trabalhos anteriores que não mostram correlação entre o grau de atividade inflamatória hepática, carga viral e fadiga (GERSHON et al. 2000; POYNARD et al. 2002).

Existem algumas hipóteses neuroimunológicas que tentam explicar estas manifestações neuropsiquiátricas encontradas em pacientes com HCV. A primeira delas associa uma disfunção no eixo hipotalâmico-hipofisário provocada pela secreção de citocinas com conseqüente prejuízo na liberação de ACTH, que está também associado à fadiga e à depressão (DEMITRACK et al., 1991). Um outro mecanismo proposto é que as próprias citocinas presentes na resposta imune possam alterar a função neurotransmissora originando os sintomas neurológicos e psiquiátricos. É sabido, por exemplo, que muitas citocinas como IL-1,  $TNF\alpha$ , e IFN regulam o ritmo circadiano do sono em condições fisiológicas, e ao mesmo tempo, são responsáveis por alterações encontradas no mesmo durante alguns processos patológicos e infecciosos como sono lência e sono fragmentado (MOLDOFSKY et al., 1986; TOBLER et al., 1984; MANFRDI et al. 2003; YOSHIDA et al. 2004; REDWINE et al. 2000; SHEARER et al. 2001; OKUN et al., 2004). Por último, o HCV é um RNA vírus, da família *Flaviviridae*, na qual são encontrados alguns vírus neurotrópicos, como o vírus da Dengue, da Febre Amarela, da Encefalite Japonesa e com os pestivírus (KATO et al. 1990; CHOO et al., 1991; BUKH et al., 1992). Nos últimos anos, vários trabalhos têm associado algumas manifestações neurológicas à infecção pelo HCV, com a demonstração de seqüências

de RNA viral replicativo no tecido cerebral e líquor, aumentando a possibilidade de um envolvimento viral direto no SNC (BOLAY et al., 1996; LASKUS et al., 2002; VARGAS et al., 2002; FORTON et al., 2004).

Com o objetivo de avaliarmos diferentes fatores envolvidos na infecção pelo HCV e associáveis com manifestações extra-hepáticas, analisamos o perfil de resposta imunológica nestes pacientes. Nossos dados demonstraram que níveis de IL-6, IL-12 ( $p < 0,001$ ) e IL-8 ( $p = 0,049$ ) se apresentaram elevados quando comparados com controles saudáveis, mas não houve diferença significativa quando comparamos a IL-4, IL-10, IFN  $\gamma$  e TNF  $\alpha$ . A secreção elevada destas citocinas inflamatórias e do perfil Th1 já foram descritas na infecção pelo HCV (FAN et al. 1998; CHEN et al. 2007). Além disso, os pacientes apresentaram um aumento significativo de LTCD8<sup>+</sup> em arcação positiva para o lécula CD69<sup>+</sup>, um marcador de ativação celular, em linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, quando relacionados ao grupo de indivíduos controles. Esta observação nos permite sugerir que o aumento das citocinas observadas nestes pacientes, provavelmente induz uma diferenciação de LTCD8<sup>+</sup> e ativação de células que parecem participar na resposta contra o HCV e eliminação da carga viral.

Na infecção pelo vírus da Hepatite C, a resposta imune celular com ativação de LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup>, juntamente com a secreção de algumas citocinas é decisiva para a eliminação viral (FAN et al. 1998; FUKUDA e NAKANO, 2003). A secreção de IL-12 é responsável pela diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> "naive" em células Th1 que liberam IFN  $\gamma$  e TNF  $\alpha$  ativando os macrófagos e neutrófilos na eliminação de microorganismos intracelulares. O perfil de resposta imunológica observada em nossos resultados foi concomitante com a queda da carga viral nestes pacientes, sugerindo mais uma vez a participação desta resposta na resolução da infecção.

No entanto, é conhecido que em torno de 80% dos pacientes assintomáticos ou que desconhecem a infecção pelo HCV evoluem para a infecção crônica e destes em torno de 50%

desenvolver quadros graves de cirrose hepática ou hepatocarcinomas (KOZDL et al., 1986; KUO et al. 1989). Desta forma se questiona o que poderia estar acontecendo nestes indivíduos. Em nossos dados observamos que apesar de verificarmos aumento na concentração de IL-12, não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação à produção de IFN  $\gamma$  nestes pacientes. Este fato nos sugere que a resposta imune inicia com o perfil Th1, ativação de LTCD8<sup>+</sup>, mas provavelmente não se mantém sustentada na maioria dos pacientes devido a ausência ou baixos níveis de IFN  $\gamma$ , favorecendo a cronificação da infecção e levando ao desenvolvimento das lesões observadas em pacientes cirróticos.

Estudos têm associado a falta do sono, em modelos de privação de sono em animais e humanos, a uma queda da resposta imune celular e da liberação de algumas citocinas pelas células T (MOLDOFSKY et al. 1989; DINGES, et al., 1994; RWIN et al. 1996). No entanto, nenhuma associação foi feita entre os níveis de citocinas estudadas, o questionário de Pittsburgh, a escala de sono lência de Epworth e a escala de fadiga. Gershon et al. (2000) avaliando 78 pacientes HCV crônicos, não encontrou qualquer relação entre os níveis de IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  e o grau de fadiga nesses pacientes, concordando parcialmente com os nossos dados.

Quando foram comparados os subgrupos de "maus dormidores" e "bons dormidores", observamos que o grupo 1 ("maus dormidores") apresentou mais queixa de fadiga ( $p=0,048$ ) do que o grupo 2, mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as citocinas e o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Foram observados, apenas, níveis elevados de IL-4 e IL-6 no grupo de maus dormidores. Hong et al. (2006) relacionaram níveis elevados de IL-6 matutina com um marcado negativo de qualidade de sono em determinadas populações. Então é provável que a IL-6 possa ser um marcador de fadiga, também, nesta população. Os seus valores, apesar de não serem estatisticamente significantes podem ser explicados pelo padrão circadiano de secreção, com valores baixos diurnos e progressivos

com o início do sono (REDW NE et al. 2000). Por esse motivo, o ideal seria que fossem feitas várias coletas ao longo do dia, para o melhor entendimento da atuação dessas citocinas no sistema neuroendócrino.

Observamos, ainda, uma correlação entre o grau de atividade inflamatória hepática com os níveis de IL-10 e de TGP somente com a IL-12, contrariando a alguns trabalhos apresentados, que não haviam mostrado tal associação (FAN et al. 1998; GERSHON et al. 2000). Salientamos que esse fato pode estar relacionado com as lesões hepáticas desenvolvidas pela intensa resposta imune celular Th1, especialmente LTCD8<sup>+</sup> em nível hepático. Estudos têm correlacionado a ativação dessas células com aumento da progressão das lesões necroinflamatórias no leito hepático (NELSON et al., 1997; LOCASCIOULLI et al., 1995).

Os genótipos aqui encontrados demonstram que o tipo 1, 2 e 3 são os mais prevalentes. O tipo 1 foi o mais frequente com 41%, seguido do 3 com 36% e do 2 com 23%. Tais dados estão de acordo com Campioto et al., (2005) que obteve resultados semelhantes, embora com um número muito menor de amostras do nosso Estado.

O genótipo 1 é conhecido por apresentar a pior evolução clínica com maior tendência ao surgimento de hepatite crônica entre os outros genótipos e menor resposta ao tratamento com interferon (TONG et al., 1997; EASL, 1999). Foi visto que os pacientes com o genótipo 1 apresentaram níveis mais elevados de ALT e AST em relação aos outros genótipos, um perfil de secreção de citocinas com aumento de IL-10 e diminuição de IL-12, apesar de não ter alcançado relevância estatística, sugerindo que o aumento da IL-10 pode ser indutor de um pior prognóstico e pior evolução clínica com tendência à cronicidade, também de acordo com os dados descritos por Prati et al. 1996.

Neste estudo, todos os pacientes foram submetidos à Angio-RM e RM de crânio. Não foi observada nenhuma alteração sugestiva de vasculite ou encefalite em SNC, com o ocorrido

em alguns relatos de casos na literatura (HECKMANN et al. 1999; BOLAY et al. 1999; FUJITA et al. 1999; TEMBL et al. 1999; BUCCOLIERO et al. 2006). Isso se deu, possivelmente, porque tais manifestações são raras. Dados da literatura relatam que pacientes com HCV sem cirrose apresentam alterações na RM com espectroscopia, com aumento da relação colina/creatina e queda do aspartato na substância branca e gânglios da base, sugerindo uma alteração precoce nos metabólicos cerebrais, ocasionadas provavelmente, pelo próprio vírus (FORTON et al. 2001; FORTON et al., 2002; HILSABECK et al., 2002; MCANDREWS et al., 2005). Em dois dos nossos pacientes foram observadas alterações na substância branca compatíveis com micro-angiopatia secundária à idade. Estes dois pacientes tinham exame neurológico normal e relataram extrema fadiga.

Apenas três pacientes foram submetidos à análise de líquido e todos apresentavam discreta proteinorraquia com celularidade normal. Em apenas um, o PCR foi positivo para o HCV. O paciente em questão possuía o genótipo 2, tinha RM e exame neurológico normais. No entanto, queixava-se de extrema fadiga pontuando 4,2 (média do grupo foi 3,16) e de Pittsburgh de 14 (média do grupo foi 6,21) e depressão. Estes dados nos sugerem que o vírus pode ter alguma ação ao nível do SNC, mas a sua forma de penetração pela barreira hematoencefálica permanece desconhecida. Laskus et al., (2002), ao analisar o PCR para HCV no líquido, plasma e leucócitos do sangue periférico de pacientes com HCV positivos, encontrou a infecção pelo mesmo genótipo e também por genótipos diferentes, nesses três compartimentos, concluindo que um dos possíveis mecanismos de neuroinvasão ocorra pelo tráfego de leucócitos infectados, como ocorre em algumas outras infecções virais, termo definido por estes pesquisadores como cavalo-de-tróia (LASKUS et al. 2005).

De modo geral os dados por nós avaliados neste trabalho, nos permitem concluir que as alterações imunológicas encontradas nos pacientes com hepatite C desempenham papel fundamental na resolução da infecção ou cronificação e evolução clínica da doença. As



## 6. CONCLUSÕES

- 6.1** As manifestações extra-hepáticas como a fadiga, distúrbios do sono e a depressão estão presentes em pacientes HCV.
- 6.2** Os distúrbios do sono, entre eles a insônia e sono lência excessiva, estão presentes com frequência e não devem ser subjugados pelo importante impacto sobre a qualidade de sono em pacientes HCV positivos.
- 6.3** Os pacientes HCV positivos, com queixas de sono, apresentam mais fadiga e níveis aumentados de IL-4 e IL-6, podendo corresponder como um marcador de sono ruim nos mesmos.
- 6.4** Os pacientes HCV positivos apresentam uma ativação de LTCD8<sup>+</sup> e marcação da molécula CD69<sup>+</sup>, sugerindo ativação de leucócitos periféricos mais do que nos indivíduos saudáveis.
- 6.5** Observou-se que os pacientes HCV positivos apresentam níveis aumentados significativamente de IL-6, IL-12 e IL-8 mais do que indivíduos saudáveis.
- 6.6** O genótipo 1 foi o mais frequente, seguido do genótipo 3 e do genótipo 2 em nossa população de estudo.
- 6.7** Pacientes com genótipo 1 tiveram níveis mais elevados de citocina de IL-10, além de maiores níveis de transaminases, que os outros genótipos, embora não atingisse valores estatisticamente significantes.
- 6.8** A través da técnica de PCR o vírus da Hepatite C pode ser encontrado no LCR de pacientes infectados. No entanto, é necessário estudos sobre a forma como o HCV atinge o SNC e a sua ação sobre a população neuronal.

**6.9** Uma das possíveis explicações para tais manifestações neuro-psiquiátricas seria uma ação conjunta do vírus sobre o SNC e a resposta imune, com a secreção de algumas citocinas como IL-4 e IL-6 sendo uma das possíveis causas das queixas de sono nos pacientes.

## BIBLIOGRAFIA

### 1. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A K.; LICHTMAN A H. Citocinas. In:\_\_\_\_. **Imunologia Celular e Molecular** 5 ed USA Elsevier,2005.
- ALAM N.;MCGINTY D.;BASHIR,T.;KUMAR S.; MERILL.;OPPM R;SZYMUSIAK R. Interleukin-1b modulates state-dependent discharge activity of preoptic area and basal forebrain neurons:role in sleep regulation **Eur J Neurosci** .v.20 p.207-216,2004.
- ALONSO C.QU D.;LAMEL N,JP.;SAN JOSÉ SDe.;VITVITSKI L.;LI,J.;BERBY F.;LAMBERT V.;CORTEY, M L.;TRÉPO,C. Serological responses to different genotypes of hepatitis C virus in France **J Clin Microbiol** .v.32,n.1 p.211-212,1994.
- ALTER M J.;GERETY R J.;SMALLWOOD L A.;SAMPLNER R E.;TABOR E.;DENHARDT F.;FROSNER G.;MATANOSKIG M Sporadic Non-A, Non-B hepatitis:frequency and epidemiology in a urban U S. population **J Infect Dis** .v.143,n.6 p.886-892,1982.
- ALTER M J.;COLEMAN P.J.;ALEXANDER W J.;KRAMER E.;MILLER JK.;MANDEL E.;HADLER S C.;MARGOLISH S. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and Non-A, Non-B hepatitis **JAMA** .v.262,n.9 p.1201-1205,1989
- ALTER, M J.; HADLER S C.; JUDSON F N. MARESA. ALEXANDER A. HU P.Y. MILLER JK. FIELD S H A. BRADLEY D W. MARGOLISH S. Risk factors for acute Non-A, Non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection **JAMA** .v.264,n.17 p.2231-2235,1990.
- ALTER, M. J.;MARGOLISH. S. KRAWCZYNSKI K. JUDSON F. N.MARESA.; ALEXANDER J.;HU P.Y. MILLER JK. GERBER M A. SAMPLNER R E.;MEEKSE L. BEACH M J. The Natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **N Engl J Med** .v.327,n.27 p.1899-1905.1992.
- AMMENDOLA A.;SAMPALO S.;AMBROSONE L.;AMMENDOLA E.;CICCONE G.;MIGLIARESI S.; ORDIG Peripheral neuropathy in hepatitis-related mixed cryoglobulinemia: electrophysiologic follow-up study **Muscle Nerve** .v.31 p.382-385 2005.
- AMORIM R M S.;OLIVEIRA C P.;WYANT P S.;CERQUEIRA D M.;CAMARA G N L.;FLORES L S.;MARTINS R M B.;MARTINS C R F. Hepatitis C virus genotypes in blood donors from the Federal District Central Brazil **Mem Inst Oswaldo Cruz** .v.99,n.8 p.895-897 2004.
- BAN C.; FATMIA.; ZOUL M F.; ZARSKI,JEAN PIERRE.;TREPO,C.;NCHAUSPE G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis infection **Gastroenterology** .v.120 p.512-524 2001.

BERNSTEIN D., KLEINMAN L., BARKER C.M., REVICKI D.A., GREEN J. Relationship of health-related quality of life to treatment adherence and sustained responses in chronic hepatitis C patients **Hepatology** .v.35 p.704-708,2002.

BLINDENBACHER A., DUONG F.H.T., HUNZIKER L., STUTVOET S.T.D., WANG X., TERRACIANO L.; MORADPOUR D., BLUM H.E., ALONZI T., TRIPODIM.; MONICAN L.A., HENM H. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon signaling in the liver of transgenic mice **Gastroenterology** .v.124 p.1465-1475,2003

BODE J.G., LUDWIG S., EHRHARDT C., ALBRECHT U., EHRHARDT C., SCHAPER F.; HEINRICH P.C., HAUSSINGER D. IFN- $\alpha$  antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling -3 **FASEB** .v.17 p.488-490,2003.

BOLAY H., SOYLEMEZOGLU F., NURLU G., TUNCER S., KUBILAY V. PCR detected hepatitis C virus genome in the brain of a case with progressive encephalomyelitis with rigidity **Clinical Neurology and Neurosurgery** .v.98 p.305-308,1996.

BUCCOLIERO R., GAMBELLIS., SCURELLIS., MALANDRINIA., PALMERIS.; DE SANTOS M., STROMILLO M.L., DE STEFANO N., SPERDUTO S., MUSUMECISA., FEDERICO A. Leukoencephalopathy as a rare complication of hepatitis C infection **Neurol Sci** .v.27 p.360-363,2006.

BUKH, J., PURCELL R.H., MILLER R.H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus **Proc Natl Acad Sci** .v.89 p.4942-4946,1992.

BUKH, J., PURCELL R.H., MILLER R.H. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide **Proc Natl Acad Sci** .v.90 p.8234-8238,1993.

BUYSSE D.J., REYNOLDS C.F., MONK, T.H., BERMAN S.R., KUPFER D.J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: A new instrument for psychiatric practice and research **Psychiatry Research** .v.28 p.193-213,1988.

CACOUB P., LUNEL-FABIAN I.F., MUSSER L., PERRIN M., FRANGEUL L., LEGER JM., HURAUX JEAN MARIE; PIETTE, JEAN-CHARLES; GODEAU P. Mixed crioglobulinemia and hepatitis C virus **Am J Med** .v.96, p.124-132.1994.

CACOUB P., CRISTOPHER., ROSENTHAL E., COHEN P., LOURY J.; LOUSTAUD-RATTI V.; YAMAMOTO A.M.; CAMPROUX A.C.; HAUSFATER P.; MUSSET L.; VEYSSIER P., RAGUING., PIETTE J.C. Extrahepatic Manifestations associated with hepatitis C virus infection A prospective multicenter study of 321 patients **Medicine** .v.79, n.1, p.47-56,2000.

CAMPOTTO S., PINHO JR R., CARRILHO F.J., DASILVA L.C., SOUTO F.J.D., SIPNELLI V., PEREIRA L.M.M.B., COELHO H.S.M., SILVA A.O., FONSECA J.C., ROSA H., LACET C.M.C.; BERBARDINI, A. P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil **Braz J Med Biol Res** .v.38 p.41-49,2005.

CARROZZO M ,QUADRIR ,LATORRE P ,PENTENERO M ,PAGAN N S ,BERTOLUSSO G ,GANDOLFO S ,NEGRO F Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa **J Hepatol** .v.37 p.364-369 2002.

CAUDA IC ,MA MONE D ,ALM IP ,ANNUNZIATA P ,BASTIANONI I ,BOGGIANO C ,A ,GUAZZIG C ,PADULA M ,VALENSI PE .The potencial role of hepatitis C virus in the pathogenesis of the neurological syndrome in chronic hepatitis C **Gut** .v.42 p.411-412,1997.

CHA , T A ,BEALLE ,RVINE B ,KOLBERG J ,CHIEN D ,KUO G ,URDEA M SA t least five related , but distinct , hepatitis C viral genotypes exist **Proc Natl Acad Sci** .v.89 p.7144-7148,1992.

CHEN ,TZY -YEN H SIEH ,Y H -SHOU WU ,TRIANG -TIAU ; YANG SHUN -FA WU ,CHIA -JUN ,TSAY G J ,CHOU HUI -LING .Impact of serum level and genes polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection **Translation Research** .v.150 p.116-121 2007.

CHOO QUI -L M ; AMY , G K W E N E R A J . O V E R B Y L C . B R A D L E Y D W . H O U G H T O N M . Isolation of c-DNA clone derived from a blood-borne non-A , non-B viral hepatitis genome **Science** .v.244 p.359-361 ,1989.

CHOO Q L ,RICHMAN KH ,HAN JH ,BERGER K ,LEE C ,DONG C ,GALLEGOS C ,COIT D ,MEDINA -SELBY A , BARR P J , W E N E R A J , B R A D L E Y D W , K U O G , H O U G H T O N M . Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. **Proc Natl Acad Sci** .v.88 p.2451-2455,1991.

COLLE ,I ,V L I E R B E R G H E H V , T R O I S I R , R I D D E R K D E , B E N O I T D , H E M P T N N E B , D E , V O S M D E . Campylobacter-associated Guillan-Barré syndrome after orthotopic liver transplantation for hepatitis C cirrhosis: a case report **Hepatology Res** .v.24 p.205-211 2002.

COOPER S ,ERICKSON A ,ADAMSE ,KANSOPON J ,WENER A J ,CHIEN D ,Y ,HOUGHTON M ,PARHAM P ,WALKER CM Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus **Immunity** .v.10 p.439-339.1999.

COX A L ,MOSBRUGER T ,LAUER GM ,PARDOLL D ,THOMAS D L ,RAY SC Comprehensive analyses of CD8 T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C **Hepatology** .v.42 p.104-112,2005.

DARKO D F ,MCCUTCHAN JA ,KRIPKE D F ,GILLIN JC ,GOLSHAN S .Fatigue , sleep disturbance , disability and indices of progression of HIV infection **Am J Psychiatry** .v.149 n.4 p.514-520,1992.

DARKO D F ,MILLER JC ,GALLEN C ,WHITE J ,KOZDL J ,BROWN S J ,HAYDUK R , ATKINSON JH ,ASSMUS J ,MUNNELL D T ,NAITOH P ,MCCUTCHAN JA ,MITLER , M M . Sleep electroencephalogram delta-frequency amplitude , night plasma levels of tumor necrosis factor alpha , and human immunodeficiency virus infection **Proc Natl Acad Sci** .v.92 p.12080-12084,1995.

DEMITRACK , M A ,DALE JK ,STRAUSSE . Evidence for impaired activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome **J Clin Endocrinol Metab** .v.73 p.1224-1234,1991.

DE, A. KRUEGER, JM. SMASKO SM. Tumor necrosis factor  $\alpha$  increases cytosolic calcium responses to AMPA and KCL in primary cultures of rat hippocampal neurons **Brain Research** .v.981 p.133-142,2003.

DINGES D.F., DOUGLAS, S.D., ZAUNGG, L., CAMPBELL, D.E., MCCANN, JM., WHITEHOUSE, W.G., ORNE, E.C., KAPOOR, S.C., CAZA, E., ORNE, M.T. Leukocytosis and natural killer cell function parallel neurobehavioral fatigue induced by 64 hours of sleep deprivation **J Clin Invest** .v.93 p.1930-1939,1994.

EASL INTERNATIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON HEPATITIS C Consensus Statement **J Hepatol** .v.30 p.956-961,1999.

ECONOMONO, C.V. Sleep as a problem of localization **J Nerv Ment Dis** .v.71, n.3 p.249-259,1930.

FAN, X.G., LIU, W.E., LI, C.Z., WANG, Z.C., LUO, L.X., TAN, D.M., HU, G.L., ZHANG, Z.C. circulating Th1 and Th2 cytokines in patients with hepatitis C virus infection **Mediators of inflammation** .v.7 p.295-297,1998.

FARCI, P., STRAZZERA, R., ALTER, H.J., FARCI, S., DE GIOANNIS, D., COIANA, A.; PEDDIS, G.; USAI, F.; SERRA, G.; CHESSA, L.; DIAZ, G.; BALESTRERIA, A.; PURCELL, R.H. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predicted therapeutic outcome **Proc Natl Acad Sci** .v.99, n.5 p.3081-3086,2002.

FARCI, P.; SHIMODA, A., COIANA, A., DIAZ, G., PEDDIS, G., MELPOLDER, J.C., STRAZZERA, A., CHIEN, D.Y.; MUNOZ, S.J.; BALESTRERIA, A., PURCELL, R.H., ALTER, H.J. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies **Science** .v.288 p.339-344,2000.

FERENCI, P.; LOCKWOOD, A., MULLEN, K., TARTER, R., WEISSENBORN, K., BLENN, T. Hepatic Encephalopathy-Definition, Nomenclature, Diagnosis, and Quantification: Final Report of the Working party at 11<sup>th</sup> WORLD CONGRESS OF GASTROENTEROLOGY, VIENNA, 1998 **Hepatology** .v.35 p.716-721,2002.

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

FILLIPPINI, D., COLOMBO, F., JANNI, S., CORNEO, R., CANESIB, M. Manifestazioni neurologiche centrali in corso di crioglobulinemia HCV correlate: revisione della letteratura e caso clinico **Reumatismo** .v.54, n.2, p.150-155,2002.

FINE, L.G. Genetic diversity of hepatitis C virus: implications for pathogenesis, treatment, and prevention **Lancet** .v.345 p.562-566,1995

FOCACCIA, R., SOUZA, F.V. DE Hepatite C. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo Atheneu, 2000.

FORTON D M .; ALLSOP JM .; MA N J .; FOSTER G R .; THOMASH C .; TAYLOR-ROBINSON S D Evidence for a cerebral effect of the hepatitis C virus **Lancet** .v.358.p.38-39 2001 .

FORTON D M .; THOMASH C .; MURPHY C A .; ALLSOP JM .; FOSTER G R .; MA N J .; WENESKA .; TAYLOR-ROBINSON S D Hepatitis C and cognitive impairment in cohort of patients with mild liver disease **Hepatology** .v.35.p.433-439 2002 .

FORTON D M .; KARAYIANNIS P .; MAHMUD N .; TAYLOR-ROBINSON S D .; THOMASH C . Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver and serum variants **J Virol** .v.78.p.10 p.5170-5183 2004 .

FOY E .; SUMPTER R .; LOO YUEH M NG .; JOHNSON C L .; WANG C .; FISH P M .; YONEYAMA M .; FUJITA T .; LEMOM SM .; GALEM J . Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic-acid-inducible gene-1 signaling. **Proc Natl Acad Sci** .v.102.p.2986-2991 2005 .

FUKUDA Y .; NAKANO I . Inmunopatogênese. In FOCAC I A R **Tratado de Hepatites Virais** . São Paulo Atheneu 2003 .

FUJITA H .; CHUGANJI Y .; YAGNUMA M .; MOMOIM .; TANAKA T . Acute encephalitis and hepatitis C virus infection Case report: Acute encephalitis immediately prior to acute onset of hepatitis C virus infection **J Gastro Hepatol** .v.14.p.1129-1131,1999 .

GALLEGOS- OROZCO JF .; FUENTES A N .; ARGUETA JG .; PÉREZ-PRUMA C .; HINOJOSA-BECERRIL C .; SXTOS-ALONSO M S .; CEUZ-CASTELLANOS S .; GUTIERREZ-REYES G .; OLIVEIRA MARTINEZ M A .; GUTIERREZ-RUIZ M C .; KERSHENOBICH D . Health-related quality of life and depression in patients with chronic hepatitis C **Arch Med Res** .v.32.p.124-129 2003 .

GEMIGNANIF .; BRINDANIF .; ALFIERIS .; GUBERTI T .; ALLEGRI I .; FERRARIC .; MARBINIA Clinical spectrum of cryoglobulinemic neuropathy **J Neurol Neurosurg Psychiatry** .v.76.p.1410-1414 2005 .

GERSHON A S .; MARGULIES M .; GORCZYNSKI R M .; HEATHCOTE E J . Serum cytokine values and fatigue in chronic hepatitis infection **J Viral Hepat** .v.7.p.397-402 2000 .

G NABREDA M G P .; YOSHIDA C F T .; NIEL C Genomic characterization of Brazilian hepatitis C virus genotypes 1a and 1b **Braz J Med Biol Res** .v.30.p.339-345,1997 .

GRAKOU I A .; SHOUKRIN H .; WOOLLARD D J .; HAN J H .; HANSON H L .; GHRAYEB J .; MURTHY K K .; RICE C M .; WALKER C M . HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help **Science** .v.302.p.659-662 .

GUMBER S C .; CHOPRA S . Hepatitis C : a multifaceted disease **Ann Intern Med** .v.123 , p.615-620, 1995 .

HAN J H .; SHYAMALA V .; RICHMAN K H .; BRAUER M J .; RVNEB .; URDEA M S .; TEKAMP-OLSON P .; KUO G .; CHOO Q L .; HOUGHTON M Characterization of the terminal

regions of hepatitis C viral RNA :Identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end **Proc Natl Acad Sci** .v.88 p.1711-1715,1991 .

HECKMANN JG .KAYSER C . HEUSS D . MANGER B . BLUM H E . NEUNDORFER B . Neurological manifestations of chronic hepatitis C. **J Neurol** .v.246 p.486-491,1999 .

HILSABECK R C .PERRY W .HASSANE N ,T Neuropsychological impairment in patients with chronic hepatitis C **Hepatology** .v.35 p.440-446 2002 .

HONG S .MILLS P J .LOREDO JS .ADLER K A .DMSDALE JE .The association between interleukin-6, sleep and demographic characteristics. **Brain Behavior and Immunity** .v.19 p.165-172 2005 .

MERIL L .MANCIAM .OPPM R B lockade of 5-hydroxytryptamine (serotonin)-2 receptors alters interleukin-1 induced changes in rat sleep **Neuroscience** .v.92 n.2 p.745-749,1999 .

RWIN M .MCCLINTICK J .COSTLOW C .FORTNER M .WHITE J .GILLIN JC Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans **FASEB** .v.10 p.643-653,1996 .

KALLMAN J .ONEIL M M .LARME B .BOPARAL N .CALABRESE L .YOUNOSSIZ M Fatigue and health-related quality of life (HRQL) in chronic hepatitis c virus infection **Dis Dis Sc** i.v.52 p.2531-2539,2007 .

KANDEL ER .SCWARTZ JH .ESSEL TM .Sleep and Dreaming. In **Principles of Neural Science** .4 ed. USA McGraw Hill,2000 .

KATON H .HIKATA M .OTSUYAMA Y .NAKAGAWA M .OHKOSHI S .SUGIMURA T .SHIMOTOHNO K Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A , non-B hepatitis **Proc Natl Acad Sci** .v.87 p.9524-9528,1990 .

KHOURIM .ELDUARTE L S .RIBEIRO R B .SILVA L F F DA ; CAMARGO L M A ; SANTOS V A DOS ; BURATTINIM N .; CORBETT C E PN Seroprevalence of Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus in Monte Negro in the Brazilian western Amazon Region **Clinics** .v.60 n.1 p.29-36 2005 .

KIETERSAUER S . REITER C .; EISENBURG J .; DEPOLDER H M .; RIEBER E P .; RIETHMULLER G .; GRUBER R . Depletion of CD8 T lymphocytes by murine monoclonal CD8 antibodies and restored specific T cell proliferation in vivo in a patients with chronic hepatitis C **J Immunol** .v.159 p.4064-4071,1997 .

KNOSHITA T .MIYAKE K .OKAMOTO H .MISHIRO S .Imported hepatitis C virus genotypes in Japanese hemophiliacs **J Infect Dis** .v.168 p.249.1993 .

KLETER G E M .DOORN L J V .BROUWER T .SCHALM SW .HEIJINKRA A .QUINT W G V Sequence Analysis of the 5' untranslated region in isolates of a least four genotypes of hepatitis C virus in the Netherlands. **J Clin Microbiol** .v.32 n.2 p.306-310,1994 .

KOZDŁ D E ,HOLLAND P V ,ALLING D W ,MELPOLDER J C ,SOLOMON R E ,PURCELL R H ,HUDSON L M ,SHOUP F J ,KRAKAUER H ,ALTER H J Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A , non-B hepatitis agents in donated blood **Ann Intern Med** .v.104 p.488-495,1986.

KRUPP , L B .; LAROCCA N G .; MURRAY NASH J .; STEINBERG A D . The Fatigue severity scale Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus **Arch Neurol** .v.46 p.1121-1123, 1989.

KUO G ,CHOO Q L . ALTER H J . GITNICK G L . REDEKER A G .; PURCELL R H . MYAMURA T . DIENSTAG J L . ALTER J .; STEVENS C E .; TEGTMER G E . BONNO F . COLOMBO M . LEE W S .; KUO C .; BERGER K .; SHUSTER JR . OVERBY L R . BRADLEY D W . ;HOUGHTON M An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A , non-B hepatitis **Science** .v.244 p.362-364,1989.

JOHNSON M W A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale **Sleep** .v.14 p.540-545,1991.

LANG C A .CONRAD S .GARRETT L .BATTISTUTTA D .COOKSLEY G E .DUNNE M . P.MACDONALD G A Symptom prevalence and clustering of symptoms in people living with chronic hepatitis C infection **J Pain Symptom Manage** .v.31 p.335-344 2006.

LAPORTE J .BA N C .MAUREL P .; NCHAUSPE G .AGUT H .CAHOUR A Differential distribution and internal translation efficiency of hepatitis C virus quasispecies present in dendritic and liver cells **Blood** .v.101 n.1 p.52-57 2003.

LASKUS T .RADKOWSKIM .PIASEK A .NOWICKIM .HORBAN A .CIANCARA J .RAKELA J Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfected with human immunodeficiency virus type 1 evidence of active replication in monocytes/macrophages and lymphocytes **J Infect Dis** .v.181 p.442448 2000.

LASKUS T .RADKOWSKIM .BEDNARSKA A .WILKINSON J .ADAR D .NOWICKIM .NIKOLOPOULOU G B .VARGASH .RAKELA J . Detection and analysis of hepatitis C virus sequences in cerebrospinal fluid **J Virol** .v.76 n.19 p.10064-10068 2002.

LASKUS T .RADKOWSKIM .ADAR D M .WILKINSON J .SCHECK A C .RAKELA J . Emerging evidence of hepatitis C virus neuroinvasion **AIDS** .v.19 p.140-144 2005.

LEE D H .;JAMAL H .REGENSTEIN F G .PERRILLO R P Morbidity of chronic hepatitis C as seen in a tertiary care medical center **Dig Dis Sci** .v.42 n.1 p.186-191,1997.

LERATH H .RUMIN S .HABERSETZER F .BERBY F .TRABAUD M A .TREPOC .; NCHAUSPE G . In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influences of viral load, viral genotype, and cell phenotype **Blood** ,v.91 n.10,1998.

LIK . FOY E . FERREON J C . NAKAMURA M . FERREON A C M . ;KEDAM . RAY S C . GALEM J . LEMOM S M . Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF **Proc Natl Acad Sci** .v.102 n.8 p.2992-2997 2005

LOCASC IULL IA .BAC IGALUPO A .VANL NT M T .CAVALLETTO D .FONT ISSO P .;  
TESTA M .MASERA G .SHULMAN H M .PORTMANN B .ALBERT IA Hepatitis C virus  
infection and liver failure in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation.  
**Bone Marrow Transplant** .v.16 p.407-411,1995.

MACOMISH F .YAPPL.; DOW B C. FOLLETT A C. SEED C. KELLER A J.  
COBAN T J. KRUSIUS T. KOLHO E. NAUKKAR NEN R .L N C .LA IÇ .LEONG S .;  
MEDGYESIG A .; HÉJASM . KYOKAWA H . FUKADA K .CUYPERS T .;  
SAEED A A .AL RASHEED A M .; L N M .; SMMONDS P . Geographical distributions of  
hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J Clin  
Microbiol** .v.32 n.4 p.884-892,1994.

MAGGIF .G DRG IM .FORNA IÇ .MORRICA A .VATTERON IM L .PISTELLO M .SCI  
LIANO G .NUCCOR NIA .BEND NELL IM Detection and quasispecies analysis of  
hepatitis C virus in the cerebrospinal fluid of infected patients **J Neurovirol** .v.5 p.319-  
323,1999.

MANFR DIA .BRAMBILLA D .BIANCHIA .MARDTT IM .OPPM R .;MERIL .  
Interleukin-1b enhances non-rapid eye movement sleep when microinjected into the dorsal  
raphe nucleus and inhibits serotonergic neurons in vitro **Eur J Neurosci** .v.18 p.1041-  
1049 2003.

MCANDREWS M P . FAREN ICK K . CARLEN P . DAMYANOV ICH A . MRKONJIC M .  
;JONES S .;HEATHCOTE E J . Prevalence and significance of neurocognitive dysfunction in  
hepatitis C in the absence of correlated risk factors **Hepatology** .v.41 p.801-808 2005.

MOLDOFSKI H .LUEFA .EISEN J .KEYSTONE E .GORCZYNSKI R M . The relationship  
of interleukin-1 and immune functions to sleep in humans **Psychosom Med** .v.48 n.5 p.309-  
318,1986.

MOLDOFSKY H .; LUEFA . DAV DSON JR . GORCZYNSKI R . Effects of sleep  
deprivation on human immune functions **FASEB** .v.3 p.1972-1977,1989.

MORSCA G . BERNARD IM T . NOVAT IR . FOPPA C U . CASTAGNA A .  
LAZZAR N A Detection of hepatitis C virus genomic sequences in the cerebrospinal fluid of  
HIV -infected patients. **J Med Virol** .v.53 p.252-254,1997.

NELSON , D R . MAROUSIS C G .; DAVIS G L . RICE C M . WONG J .HOUGHTON M ;  
LAU JY . The roles of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis  
**CJ Immunol** .v.158 p.1473-1481,1997.

NEMN IR .; SANVITO L . QUATTR NIA . SANTUCC D G . CAMERLINGO M .;  
CANAL N . Peripheral neuropathy in hepatitis C virus infection with and without  
cryoglobulinemia **J Neurol Neurosurg Psychiatry** ,v.74 p.1267-1271 2003.

NORMAN S E .; CHEDIAK A D .; KIEL M .; COHN M A Sleep disturbances in HIV -infected  
homosexual men **AIDS** .v.4 p.775-781,1990.

NORMAN S.E.; CHEDIAK A.D.; FREEMAN C.; KELM.; MENDEZ A.; DUNCAN R.; SMONEAU J.; NOLAN B. Sleep disturbances in men with asymptomatic Human Immunodeficiency (HIV) Infection **Sleep** .v.15 n.2 p.150-155,1992.

OKUN M.L.; GIESE S.L.N.L.M.; IGNOT E.; COUSSONS-READ M.E. Exploring the cytokine and endocrine involvement in narcolepsy **Brain Behav Immun** .v.18 p.326-332,2004.

OLMEIRA M.A.; BASTOS F.I.; SABINO R.R.; PAETZOLD J.; SCHREIER E.; PAULIG.; YOSHIDA C.F.T. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Braz J Med Biol Res** .v.32 p.279-282,1999.

OPPM. Cytokines and sleep: the first hundred years **Brain Behav Immun** .v.18 p.295-297,2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Hepatite C Disponível em <  
[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/viral\\_cancers/en/index2.html#disease%20burden](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html#disease%20burden) /> Acesso em : 9 setembro.2007 .

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Hepatite C Disponível em <  
<http://www.who.int/docstore/wer/pdf/1999/wer7449.pdf> /> Acesso em : 18 setembro.2007.

OHTO H.; SOUSUKE T.; NOBUHIKO S.; NOBUTAKA S.; KUNHIKO H.; CHIEKO I.; MAKOTO K.; NRO J.; CHIKARA E.; AKIRAM.; HIROAKI O.; SHUNJIM. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. **N Engl J Med** .v.330 n.11 p.744-750,1994.

PAPPENHEIMER JR.; KOSKIG.; FENCIV.; KARNOVSKY M.L.; KRUEGER J. Extraction of sleep-promoting factor S from cerebrospinal fluid and from brains of sleep-deprived animals **J Neurophysiol** .v.38 p.1299-1311,1975.

PAULA V.S.; ARRUDA M.E.; VITRAL C.L.; GASPARI M.C. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the western region of the Brazilian Amazon Basin **Mem Inst Oswaldo Cruz** .v.96 n.8 p.1123-1128,2001.

PAWLOTSKY JEAN MICHEL.; ROUDOT-THORAVAL F.; SMMONDS P.; MELLOR J.; YAHIA M.B.; ANDRE C.; VOISIN MARIE-CATHERINE.; NTRATOR L.; ZAFRANIELE SERGEL.; DUVAL J.; DHUMEAUX D. Extrahepatic immunologic manifestations in chronic hepatitis C and hepatitis C virus serotypes. **Ann Intern Med** .v.122 p.169-173,1995.

PISTELLO M.; MAGGIF.; VATTERON I.L.; CECCONI N.; PANICUCCI F.; BRESCIG P.; GAMBARDELLA L.; TADDEI M.; BONDA A.; TUONIM.; BENDNELLIM. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Italy **J Clin Microbiol** .v.32 n.1 p.232-234,1994.

POYNARD T.; CACOUB P.; PIETTE JC.; MOUSSALLI J. Fatigue in patients with chronic hepatitis C **J Viral Hepat** .v.9 p.295-303,2002.

PRICE R.W.; SDTIS J.; ROSENBLUM M. The AIDS dementia complex: some current questions **Ann Neurol** .v.23, s.27-33,1988.

PRATID.; CAPELLIC. ZANELLA A. MOZZIF. BOSONIP. PAPPALLETTERA M.  
ZANUSO F. VIANELLO L. LOCATELLIE. DE FAZIO C. RONCHIG.; DELL  
N INNO E. COLOMBO M. Influence of different hepatitis virus genotypes on the course of  
asymptomatic hepatitis C virus infection **Gastroenterology** .v.110 p.178-283,1996.

PUCCONI- SOHLER M. MACHADO L.R. CANUTO R. TAKAYANAGUIOM.;  
ALMEIDA SM. LVRAMENTO JA. Coleta do Líquido cefalorraquidiano. Termo de  
Consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa. Recomendações do  
departamento científico de LCR da Academia Brasileira de Neurologia. **Arq  
Neuropsiquiatr** .v.60 p 681-684 2002.

RADKOWSKIM. KUBICKA J. KISIEK E. CLANCIARA J. NOWICKIM. RAKELA J.  
LASKUS,T. Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus GB virus C  
replication in bonemarrow in human subjects **Blood** .v.95 n.12 p.3986-3989 2000.

RADKOWSKIM. WILKINSON J. NOWICKIM. ADAR D. VARGASH.; NGUIC. RAK  
ELA J. LASKUS,T Search for hepatitis C virus negative-strand RNA sequences and analysis  
of viral sequences in the central nervous system: Evidence of replication..  
**J Virol** .v.76 n.2.p.600-608 2002.

RAMOS-CASALS M. LOUSTAUD RATTIV.; DE VITTA S. ZEHER M. BOSCH JOSE-  
ANGEL.; TOUSSROTE.; MEDINA F. ROSAS J. ANAYA JUAN MANUEL. FONT J.  
Sjogren Syndrome associated with hepatitis C virus A multicenter analysis of 137 cases.  
**Medicine** .v.84 n.2 p.81-89 2005.

RAVAGGI, A. ZONARO A. MARINMG. PUOTIM. ALBERTINIA. CARIANIE.  
Distribution of viral genotypes in Italy determined by hepatitis c virus typing by DNA  
immunoassay **J Clin Microbiol** .v.32 n.9 p.2280-2284,1994.

RECHTSCHAFFEN A. BERGMANN BM. EVERSON CA. KUSH DA CA. GILLILAN  
DM A Sleep deprivation in the Rat X Integration and discussion of the  
findings **Sleep** .v.12 n.1 p.68-87,1989.

REDWINE L. HAUGER RL. GILLIN C Effects of sleep and sleep deprivation on  
interleukin-6 growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans **J Clin Endocrinol  
Metab** .v.85 p.3597-3603 2000.

ROMERO PEREZ M. SANCHEZ QUJANO A. LISSEN E. Transmission of hepatitis C  
virus **Ann Inter Med** .v.113 n.5 p.411-412,1990.

SANGER F. NICKLEN S. COULSON A R. DNA sequencing with chain-terminating  
inhibitors **Proc Natl Acad Sci** .v.74 p.5463-5467,1977.

SABBATINIM. CRISO A. PISANIA. GALLO R. CIANCARUSO B. FUIANO G. FEDER  
ICO S. ANDREUCCI, V E Sleep quality in renal transplant patients: a never investigated  
problem **Nephrol Dial Transplant** .v.20 p.194-198 2005.

SHEARER W. T. REUBEN JM. MULLINGTON JM. PRICE N J. LEE BB. SMITH O. SZ  
UBA M P. VAN DONGEN H P A. DINGES D F Soluble TNF- $\alpha$  receptor 1 and IL-6 plasma

levels in humans subjected to the sleep deprivation model of spaceflight **J Allergy Clin Immunol** .v.107 p.165-170,2001 .

SMMONDS P., HOLMES E. C., CHA, T. A., CHAN, S. W., MCOMISH F.; RVNE B., BEALL E., YAPPL.; KOLBERG, J., URDEA M. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region **J Gen Virol** .v.74 p.2391-2399,1993.

SMMONDS P., HOLMES E. C., CHA, T. A., CHAN, S. W., MCOMISH F.; RVNE B., BEALL, E., YAPPL., KOLBERG, J., URDEA M. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region **Hepatology** .v.19 p.1321-1324,1994.

SMMONDS P., BUKH, J., COMBET C., DELEAGE G., ENOMOTO N., FEINSTONE S., HALFON P.; NCHAUSPE G., KUKEN C., MAERTENSG., MIZOKAMI M., MURPHY D. G., OKAMOTO H., PAWLOTSKY, JEAN MICHEL., PENN F., SABLON E., SHIN, T., STUYVER L., THIEL HEINZ-JURGEN; VIAZOV S., WEINER A. J.; WIDELL A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes **Hepatology** 42 p.962-973,2005.

SOUTO F. J. D., FONTES C. J. F., GASPARRAM C. Prevalence of hepatitis B and C virus markers among malaria-exposed gold miners in Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz** .v.96 p.1-5,2001 .

SOUTO F. J. D., FONTES C. J. F., MARTELLI C. M. T., TURCHIM D., MARTINS R. M. B., ANDRADE A. L. S. S. D.; Hepatitis C virus prevalence among an immigrant community to the southern Amazon, Brazil **Mem Inst Oswaldo Cruz** .v.94 p.6 p.719-723,1999.

SU, A. L., PEZACKI, J. P., WODICKA, L., BRIDEAU A. D., SUPEKOVA, L., THIMMEL, W. IELAND S., PURCELL R. H., SCHULTZ P. Z., CHISARI F. V. Genomic analysis of the host responses to hepatitis C virus infection **Proc Natl Acad Sci** .v.99 p.15669-15674,2002.

SUZUKI, T., AZAKI, H.; MURAKAMI, K.; SHOJI, I.; WAKITA, T. Molecular biology of hepatitis C virus **J Gastroenterol** .v.42 p.411-423,2007.

TAKADA, N.; TAKASE S.; TAKADA A., DATE, T. HCV genotypes in different countries **Lancet**.v.339 p.808,1992.

TAKADA N., TAKASE S., TAKADA A., DATE, T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries **J Hepatol** .v.17 p.277-283,1991.

TAKAKI A., WIESEM., MAERTENSG., DEPLA E., SEIFERT U., LIEBETRAU A., MILLER, J. L., MANNSP., REHERMANN M. B. Cellular immune responses persist and humoral responses decreases two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C **Nat Med**. v.6 p.5 p.578-582,2000.

TEMBLE, J. L., FERRER, J. M., SEVILLA M. T., LAGO A., MAYORDOMO F., VILCHEZ, J. J. Neurologic complications associated with hepatitis C virus infection **Neurology** .v.53 p.861-864,1999.

THE INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF SLEEP DISORDERS, REVISED.  
**Diagnostic and Coding Manual** Rochester American Sleep Disorders Association, 1997.

THIMMER, D.; OLDACH, D.; CHANG, KYONG M. I.; STEIGER, C.; RAY, S. C.; CHISARIF, V.  
Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection **J Exp Med** .v.194, n.10 p.1395-1406, 2001.

TOBLER, I.; BORBELY, A. A.; SCHWYZER, M.; FONTANA, A. Interleukin-1 derived from astrocytes enhances slow wave activity in sleep EEG of the rat. **Eur J Pharmacol** .v.104 p.191-192, 1984.

TONG, M. J.; REDDY, R.; LEE, W. M.; POCKROS, P. J.; HOEFS, J. C.; KEEFE, E. B.; HOLLINGER, F. B.; HATHCOTE, E. J.; WHITE, H.; FOUST, R. T.; JENSEN, D. M.; KRAWITZ, E. L.; FROMM, H.; BLACK, M.; BLATT, L. M.; KLEIN, M.; LUBNA, J. Treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon: A multicenter, randomized, controlled trial **Hepatology** .v.26 p.747-754, 1997.

VON ECONOMO, C. Sleep as a problem of localization **J Nerv Ment Dis** .v.71 p.249-259, 1930.

VARGAS, H. E.; LASKUS, T.; RADKOWSKI, M.; WILKINSON, J.; BALAN, V.; DOUGLAS, D. D.; HARRISON, M. E.; MULLIGAN, D. C.; OLDEN, K.; ADAIR, D.; RAKELA, J. Detection of hepatitis C virus sequences in brain tissue obtained in recurrent hepatitis C after liver transplantation **Liver Transpl** .v.8, n.11 p.1014-1019, 2002.

VANNIER, E.; D'NARELLO, C. A. Histamine enhances interleukin IL-1-induced IL-6 gene expression and protein and protein synthesis via H2 receptor in peripheral blood mononuclear cells **J Biol Chem** .v.269 p.9952-9956, 1993.

VOGLER, I. H.; NISHIYA, A.; MORIMOTO, H. K.; REICHE, E. M. V.; BORTOLIEIRO, A. L.; MATSUO, T.; SABINO, E. C.; VAZ, A. J. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002 **Rev Inst Med Trop S Paulo** .v.46, n.6 p.303-308, 2004.

WEINER, A. J.; GEYSEN, H. M.; CHRISTOPHERSON, C.; HALL, J. E.; MASON, T. J.; SARACCO, G.; BONINO, F.; CRAWFORD, K.; MARION, C. D.; CRAWFORD, K. A.; BRUNETTO, M.; BARR, P. J.; MIYAMURA, T.; MCHUTCHINSON, J.; HOUGHTON, M. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections **Proc Natl Acad Sci** .v.89 p.3468-3472, 1992.

YOSHIDA, H.; PETERFIZ, G.; GARCIA-GARCIA, F.; KIKPATRICK, R.; YASUDA, T.; KRUEGER, J. M. State-specific asymmetries in EEG slow wave activity induced by local application of TNF $\alpha$  **Brain Research** .v.1009, p.129-136, 2004.

ZEPPEL, N. H.; SIEGEL, J. M.; TOBLER, I. Mammalian Sleep. In: KRYGER, M. H.; ROTH, T.; DEMENT, W. C. **Principles and Practice of Sleep Medicine** 4 ed USA: Elsevier Saunders, 2005.

ZHANG, Y. Y.; LOK, A. S. F.; CHAN, D. T. M.; W. DELL, A. Greater diversity of hepatitis c virus genotypes found in Hong-Kong than mainland China. **J Clin Microbiol** .v.33, n.11 p.2931-2934, 1995.

## **2. Obras Consultadas**

KRYGER M H.,ROTH,T.,DEMENTW C.Principles and **Practice of Sleep Medicine** 4.  
ed USA Elsevier Saunders,2005.

## APÊNDICE A – Escala de Qualidade do Sono de Pittsburgh

Nome: \_\_\_\_\_  
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Idade: \_\_\_\_\_.

### Instruções:

As seguintes questões relacionam-se aos seus hábitos usuais de sono durante o mês passado semente. Suas respostas devem ser as mais verdadeiras possíveis e representar a maioria dos dias e noites do mês passado. Por favor, responda todas as questões abaixo:

1. Durante o mês passado, qual foi o horário que você foi para a cama à noite?  
Horário usual de deitar: \_\_\_\_\_.
2. Durante o mês passado, quanto tempo (em minutos) você demorou para começar a dormir à noite?  
Número de minutos: \_\_\_\_\_.
3. Durante o mês passado, qual foi o horário habitual que você levantou pela manhã?  
Horário usual de levantar: \_\_\_\_\_.
4. Durante o mês passado, quantas horas você dormiu à noite? (Isto pode ser diferente do número de horas que você ficou na cama.).  
Horário de sono por noite: \_\_\_\_\_.

Para cada uma das questões restantes, marque a melhor resposta. Por favor, responda todas as questões.

5. Durante o mês passado, com frequência você teve problemas de sono porque você.....

- (a) Não conseguiu dormir em 30 minutos.  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.
- (b) Levantou no meio da noite ou no início da manhã  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.
- (c) Levantou para usar o banheiro  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.
- (d) Não pode respirar confortavelmente.  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.
- (e) Tossiu ou roncou alto  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

(f) Sentiu muito frio.  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

(g) Sentiu muito calor.  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

(h) Teve sonhos ruins.  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

(i) Teve dor  
( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

(j) Outra razão, por favor, descreva: \_\_\_\_\_

Com que frequência no mês passado você teve problema de sono por causa disto?

( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

6. Durante o mês passado, como você poderia pontuar a qualidade do seu sono.

- ( ) Muito bom.
- ( ) Razoavelmente bom.
- ( ) Razoavelmente ruim.
- ( ) Muito ruim.

7. Durante o mês passado, com que frequência você tomou medicações para dormir?  
(medicações controladas).

( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

8. Durante o mês passado, com que frequência você teve dificuldade de permanecer acordado enquanto dirigia, se alimentava ou durante um compromisso social?

( ) Nenhuma vez no mês passado ( ) Menos de 1 vez por semana  
( ) 1 a 2 vezes por semana ( ) 3 ou mais vezes por semana.

9. Durante o mês passado, que problemas você teve para que conseguisse prosseguir mantendo entusiasmo para realizar algo?

- ( ) Nenhum problema
- ( ) Problemas leves
- ( ) Problemas moderados
- ( ) Um grande problema.

10. Você tem um parceiro de quarto ou de cama?

- ( ) Nenhum parceiro de quarto.
- ( ) Parceiro em outro quarto.
- ( ) Parceiro no mesmo quarto, mas não na mesma cama.

Parceiro na mesma cama.

Se você tem um parceiro de cama ou quarto, pergunte a ele/ela com que frequência no mês passado você teve....

a. Ronco alto

- Nenhum a vez no mês passado  Menos de 1 vez por semana  
 1 a 2 vezes por semana  3 ou mais vezes por semana.

b. Pausas longas entre as respirações enquanto dormia

- Nenhum a vez no mês passado  Menos de 1 vez por semana  
 1 a 2 vezes por semana  3 ou mais vezes por semana.

c. Formigamentos na perna ou braços enquanto dormia

- Nenhum a vez no mês passado  Menos de 1 vez por semana  
 1 a 2 vezes por semana  3 ou mais vezes por semana.

d. Episódio de confusão e desorientação durante o sono

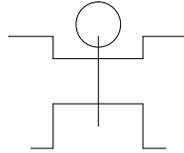
- Nenhum a vez no mês passado  Menos de 1 vez por semana  
 1 a 2 vezes por semana  3 ou mais vezes por semana.

f. Outros incômodos durante o sono, por favor, descreva: \_\_\_\_\_

- Nenhum a vez no mês passado  Menos de 1 vez por semana  
 1 a 2 vezes por semana  3 ou mais vezes por semana.



Reflexos Tendinosos



Reflexos Superficiais:

Sensibilidade superficial:

Sensibilidade profunda:

Nervos cranianos:

Sinais Meníngio-radulares:

Coordenação:

Marcha:

Hipótese Clínica:

Marque um X apenas nas perguntas abaixo.

2. Você tem alguma das doenças ou sintomas abaixo:

( ) Diabetes ( ) Hipertensão ( ) AIDS ou HIV + ( ) Insuficiência renal

( ) AVC (Derrame). Se sim, qual o tipo: ( ) Isquêmico ( ) Hemorrágico

( ) Hepatite? qual o tipo?: \_\_\_\_\_

3. ( ) Recebe(eu) alguma vez tratamento psiquiátrico?. Se sim, informe qual e durante quanto tempo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

4. ( ) Recebe(eu) alguma vez tratamento para alguma doença neurológica?. Se sim, informe qual e durante quanto tempo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5. ( ) Câncer. Se sim, qual o tipo? e qual o tratamento usado?: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

6. ( ) Outras doenças não citadas: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7. Você sente algum destas queixas abaixo?. Marque um X.

Queixas	Sim	Não
Febre	( )	( )
Fadiga	( )	( )
Dores nas juntas	( )	( )
Dores no corpo	( )	( )
Dor de Cabeça	( )	( )
Perda de memória	( )	( )
Dificuldade para dormir	( )	( )
Sonolência durante o dia	( )	( )
Fraqueza nos braços ou pernas	( )	( )
Desatenção	( )	( )
Dormência nos braços ou pernas	( )	( )

8. Você está recebendo algum destas medicações listadas abaixo?

( ) Corticóide ( ) Quimioterápicos ( ) Interferon ( ) Ribavirina

( ) Medicamentos para dormir. Se sim, qual(is)?: \_\_\_\_\_

( ) Antidepressivos. Se sim, qual(is)?.: \_\_\_\_\_

9. Você ingere álcool?.

( ) Não

( ) Sim. Se sim, qual o tipo de bebida? e quantos copos/dia?: \_\_\_\_\_

( ) Ex-usuário. Parou há quanto tempo?: \_\_\_\_\_.

10. Você Fuma?

( ) Não

( ) Sim. Se sim, há quantos anos fuma? e quantos cigarros/dia? \_\_\_\_\_

( ) Ex-tabagista parado há \_\_\_\_ anos

11. Você usa ou já usou alguma vez algum tipo de droga ilícita?.

( ) Não

( ) Sim. Se sim, qual? e quando? \_\_\_\_\_

12. Você já recebeu alguma transfusão e sangue alguma vez?.

( ) Não

( ) Sim. Se sim, quando?: \_\_\_\_\_

13. Você já fez alguma cirurgia?.

( ) Não

( ) Sim. Se sim, o que e quando?: \_\_\_\_\_

14. Você se acha deprimido?

( ) Não

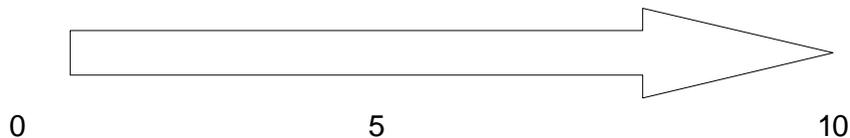
( ) Sim. Se sim, de uma nota de 0 a 10, sendo 10 muito deprimido e 0 sem depressão: \_\_ nota.

15. Você se acha ansioso (nervoso)?.

( ) Não

( ) Sim. Se sim, de uma nota de 0 a 10, sendo 10 muito ansioso e 0 sem ansiedade: \_\_ nota.

15. Como está a qualidade da sua vida? Dê uma nota, sendo 10 vida excelente e 0 vida péssima: \_\_ nota.



## APÊNDICE C- Escala de Fadiga de Krupp

Pacientes são instruídos para escolher um número de 1 a 7 que indique o seu grau de concordância com cada afirmativa, onde 1 indica: discorda totalmente e 7 indica: concorda totalmente.

- a) Minha motivação é baixa quando estou fatigado: \_\_\_\_\_
- b) Exercícios me causam fadiga: \_\_\_\_\_
- c) Eu fico fatigado facilmente: \_\_\_\_\_
- d) Fadiga interfere com o meu funcionamento físico: \_\_\_\_\_
- e) Fadiga me causa problemas frequentemente: \_\_\_\_\_
- f) Minha fadiga não me deixa ter um funcionamento físico mantido: \_\_\_\_\_
- g) Fadiga interfere na realização de certas obrigações ou deveres e responsabilidades: \_\_\_\_\_
- h) Fadiga está entre meus 3 sintomas mais incapacitantes ou importantes: \_\_\_\_\_
- i) Fadiga interfere com meu trabalho, minha vida social e familiar: \_\_\_\_\_.

## APÊNDICE D – Escala de Sono lência de Epworth

Situações	Pontos
1.Sentar e Ler	_____.
2.A ssistir TV	_____.
3.Sentado em um lugar público (teatro, encontro)	_____.
4.Como passageiro em um carro em movimento	_____.
5.Descansando após o almoço, quando possível.	_____.
6.Sentado e conversando com alguém	_____.
7.Sentado após o almoço sem ingerir álcool.	_____.
8.Em um carro, parado por alguns minutos no congestionamento.	_____.

0 = Nenhuma chance de cochilar.

1 = Leve chance de cochilar.

2= Moderada chance de cochilar.

3= Alta chance de cochilar.

**APÊNDICE E- Exames realizados**

Exames	Data			
Hg				
Hto		Diferencial		
Leucograma				
Plaquetas				
ALT/TGO				
AST/TGP				
LCR				
Células				
Proteínas				
Glicose				
Cloreto				
HCV				
ELISA			<i>Western-blot</i>	
Genótipo				

**Citometria de Fluxo**

Data	AC	% céls	MIF	Mediana

ELIZA - Citocinas

Data	Citocina	Conc	Média	Mediana	DP

**USG abdominal:**

---

---

**RM de**

**crânio:** \_\_\_\_\_

---

## APÊNDICE F – **Termo de consentimento livre e esclarecido**

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO DO ESTUDO:** A avaliação da resposta imune humoral e celular em pacientes com hepatite C com alterações do sono.

**JUSTIFICATIVA OBJETIVOS:** Este estudo irá contribuir com informações sobre a resposta imune subtipos de HCV envolvidos em pacientes com hepatite do Estado do Amazonas, promovendo a caracterização, genotipagem e sequenciamento do mesmo.

**PROCEDIMENTOS:** Para este estudo será coletada amostra de 20 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus, a confirmação do diagnóstico da infecção. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus e outros na Fundação Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) e clínicas conveniadas. Será realizada uma ultrassonografia abdominal que é um exame indolor aos pacientes onde se utiliza um aparelho sobre o abdômen que serve para a verificação de sinais de doença hepática e será realizado no Hospital Tropical. O teste do HIV não será utilizado para estudo e somente como rotina do hospital. Em alguns pacientes haverá a necessidade da realização da Ressonância de Crânio que é um exame indolor, utilizado para o estudo das lesões no sistema nervoso. O exame tem o inconveniente de ser prolongado e duro em média. Em alguns casos haverá a necessidade da utilização de uma substância (contraste) na veia, para melhor visualizar algumas lesões ao exame. Ele será realizado em um clínica conveniada ao SUS. A coleta do líquido será realizada por punção com uma agulha apropriada na região das costas com anestesia local e a coleta da saliva por um esfregaço oral.

**RISCOS E DESCONFORTOS:** Para as amostras sanguíneas e líquido haverá o desconforto da picada da agulha. Em 10% dos pacientes após a coleta do líquido poderá haver dor de cabeça passageira, dor local e dormência transitória nas pernas. A ocorrência de lesão neurológica com a punção lombar é raríssima. A coleta de saliva, a Polissonografia, a Ultrassonografia e a Ressonância de Crânio, não acarretarão nenhum risco a você.

**BENEFÍCIOS:** A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento e na prevenção do HCV.

**ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL:** Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito ao HCV, podendo entrar em contato com a Dra. Adriana Malheiro e Dr

Carlos Mauricio Almeida (Tel: 92-655-0111/ 92-656-0113/ 092.91522001). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do FMT-AM.

**VOLUNTARIEDADE:** A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no FMT-AM.

**CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO:** Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar identidade dos participantes.

**FORMAS DE RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:** Para eventuais ressarcimentos e danos da pesquisa a equipe envolvida na pesquisa da Fundação de Medicina Tropical e Hemom se propõem a atender os participantes.

**USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO:** O material biológico coletado (sangue periférico, líquido e saliva) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores.

- Autorizo quem minhas amostras possam ser armazenadas para posteriores estudos
- Não autorizo quem minhas amostras possam ser armazenadas para posteriores estudos

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

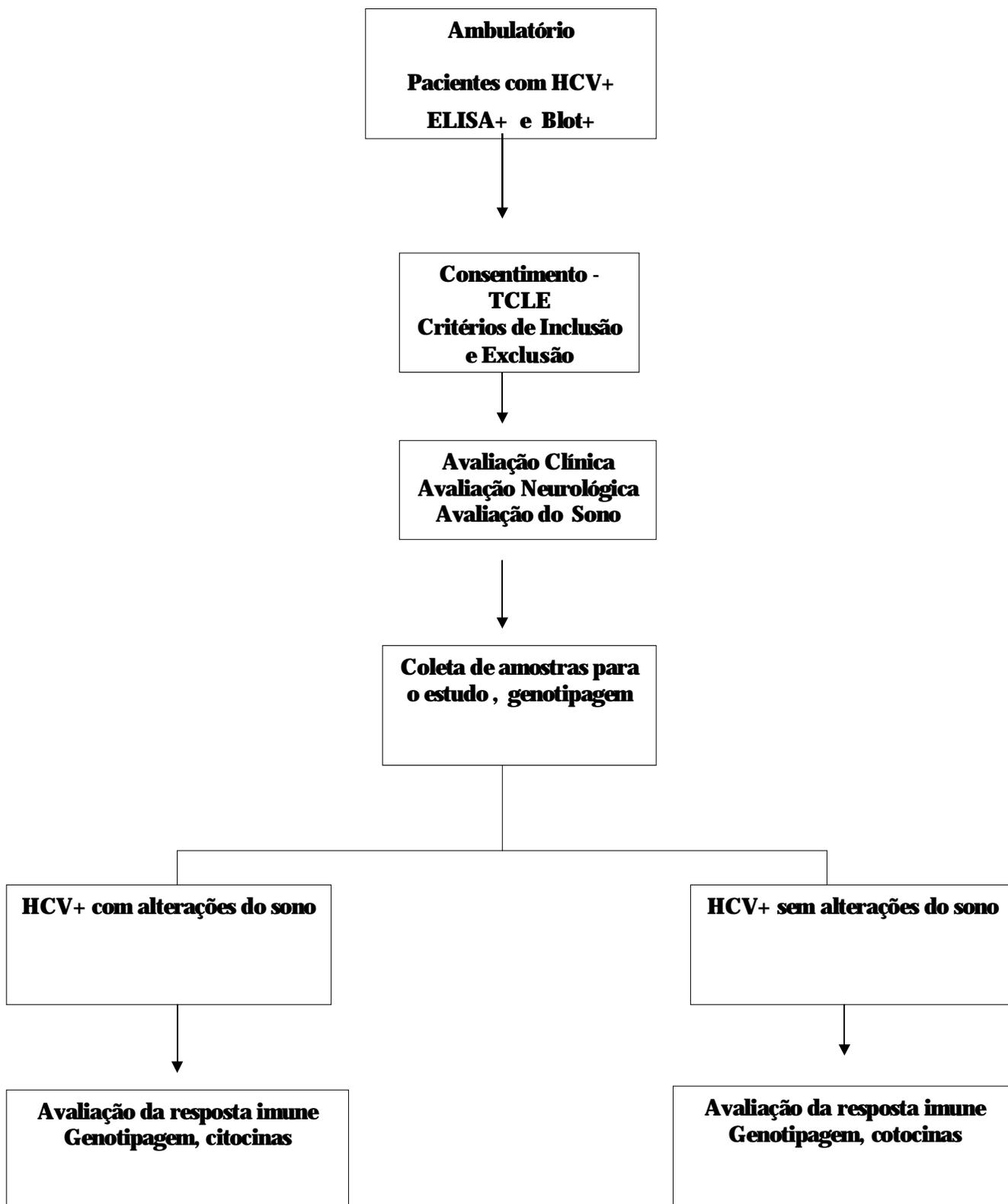
\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do pesquisador)

Manaus, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

(Impressão dactiloscópica)

## APÊNDICE G - Fluxograma do estudo



## APÊNDICE H- **Formulário de guarda de material biológico humano para pesquisa**

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM

FORMULÁRIO DE GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO PARA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA : Avaliação da resposta imune humoral e celular em pacientes com hepatite C com alterações do sono.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL : Carlos Maurício Oliveira de Almeida

INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL : Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

PERÍODO DE EXECUÇÃO DO PROJETO : abril/2006 a agosto/2006

OBJETIVOS DA PESQUISA : 1. Avaliação da resposta imune celular e humoral em pacientes com hepatite C associado à alterações comportamentais do sono; 2. Avaliar o perfil da resposta imune humoral e celular em pacientes com HCV; 3. Avaliar o perfil de produção de citocinas TH1/TH2 no sono dos pacientes com infecção pelo HCV; 4. Avaliar a presença de alterações neurológicas entre os pacientes com HCV do estudo; 5. Associar a resposta imune com as alterações no sono em pacientes HCV; 6. Avaliar os genótipos virais e carga viral nos pacientes com HCV; 7. Relacionar resposta imune, genótipo viral a alterações do sono nos pacientes com HCV.

JUSTIFICATIVA DO ARMAZENAMENTO : As amostras serão armazenadas na Fundação HEMOAM, porque a orientadora do projeto, apesar de ter vínculo conjunto com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, permanece alocada no HEMOAM, portanto terá maior controle sobre as amostras. A FHEMOAM apresenta uma portaria que regulamenta o armazenamento das amostras para estudos posteriores.

TIPOS DE TESTES A SEREM REALIZADOS COM AS AMOSTRAS : Testes moleculares de caracterização dos agentes infecciosos envolvidos na infecção.

NÚMERO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS A SEREM ARMAZENADAS : Em média 2 alíquotas de cada uma das 120 amostras envolvidas no atual estudo.

FORMA DE ARMAZENAGEM : As amostras serão alíquotadas em tubos de criopreservação tipo Prep Tube BD® e armazenadas em freezer -70°C.

SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO A SER UTILIZADO : Codificação utilizada pelo hemocentro para identificação dos doadores de sangue. Trata-se de um sistema que não identifica o indivíduo, mas permite recuperação dos dados de identificação dos mesmos através de consulta ao sistema, caso seja necessário.

LOCAL PRECISO DA ARMAZENAGEM : Freezer -70°C localizado no laboratório de sorologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM

TERMO DE COMPROMISSO : Comprometo-me em usar metodologia de identificação que assegure o sigilo e garanta o respeito a confidencialidade dos indivíduos envolvidos na pesquisa, mas que garanta a recuperação de informações dos indivíduos visando possível necessidade de fornecimento de informações de seu interesse ou para obtenção de consentimento específico para uso em novo projeto de pesquisa. E ainda cumprir com os preceitos das Resoluções CNS 196/96 e CNS 347/2005

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL :

MANAUS, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_