

UFAL

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA**

**Genotipagem de HCV (vírus da hepatite C)
em portadores do anticorpo anti-HCV,
através de RT-PCR/RFLPs**

Rosa Maria Silva Gonzaga

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57.072-970 - Maceió - AL

Rosa Maria Silva Gonzaga

**Genotipagem de HCV (vírus da hepatite C)
em portadores do anticorpo anti-HCV,
através de RT-PCR/RFLPs**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Química e Biotecnologia do Departamento de
Química do Centro de Ciências Exatas e
Naturais da Universidade Federal de Alagoas,
como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria Wanderlei Silva

Maceió – Alagoas – Brasil

Setembro de 2004

N= 2004. 04. 035-08

FAPEAL
Recebido em <i>27/09/05</i>
<i>[Assinatura]</i>
Liz Paulo Responsável Protocolo

Agradecimentos

À Deus por mais uma oportunidade para fazer o que tem que ser feito.

À Professora Dra. Denise Maria Wanderlei-Silva, pelos ensinamentos, pelo apoio, pelo incentivo, por acreditar na realização deste trabalho e pelo exemplo de incansável busca por conhecimentos.

Ao Professor Dr. Cícero Eduardo Ramalho-Neto pelo incentivo, pela experiência e pelos ensinamentos durante minha formação acadêmica.

Ao Dr. Arthur Paiva e ao Dr. Renée Oliveira pelo apoio técnico.

À Dra. Eliana Santa Rita e a todos que trabalham no Hospital Universitário Dr. Alberto Antunes por terem tornado possível a realização deste trabalho através do envio de material biológico.

À Professora Dra. Ana Maria Queijeiro López pelo incentivo e pela força durante o meu curso.

À Professora Dra. Ana Cristina Brito pela atenção e força.

Aos meus pais Luiz (*in memoriam*) e Maria, e às minhas irmãs, por compreenderem minha ausência e pelo orgulho que sentem por mim.

Aos colegas do GEMPRO, Janice, André, Daniela, Edvânia, Jessé, Melka, Velber, Marília, Juliana, Celso e Genovês pela ótima convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e o CNPq pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Aos meus pais Luiz (*in memoriam*) e Maria. Às minhas irmãs Maria do Ó (*in memoriam*), Aparecida, Fátima e Ana Rosa por apoiarem todas as minhas decisões e compreenderem a minha ausência.

“Quem rouba meus pertences... Nada rouba... Pois meus bens materiais... Ganhos com meu suor não são tão valiosos, mas agora escravizam a outros... Mas aquele que rouba o meu bom nome, um bem tão precioso, rouba aquilo que não lhe enriquece e verdadeiramente me empobrece...”

W. Shakerspeare

Aos meus verdadeiros amigos Jarbas Carvalho e Marília Góis pela compreensão... por saberem distinguir o que verdadeiramente importa nesta vida... A eles todo o meu respeito e afeição...

Dedico.

Mensagem!

Tempo de provação... horas de resistência.

Terás tido lutas ou estarás dentro delas, qual ocorre a tantos outros companheiros.

Observas problemas em muitos lares, acidentes de efeitos amargos, moléstias obscuras, experiências estranhas e desajustes psicológicos.

Não te deixes abater e caminha para diante.

Resiste aos movimentos que tendam a desfibrar-te a coragem e mantém-te em tua tarefa.

Recorda que tudo se altera para o bem.

Obstáculos são, por si, movimentos de renovação e progresso.

O que possa parecer fracasso ou desencanto é preparação de um mundo novo. Não se retrocede.

Sem problemas, não há lições e, sem lições, a evolução não sairia da estaca zero.

Não há corações transviados e sim companheiros em transformação.

Hoje será sempre o dia de se realizar o melhor.

Ninguém nasceu para a tristeza ou desânimo.

Não conseguimos modificar os outros, mas ser-nos-á sempre possível renovar-nos.

Nunca é tarde para que alguém seja feliz.

Emmanuel.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Apêndices	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. Introdução	01
2. Revisão da Literatura	03
2.1 Hepatite C	03
2.2 Biologia do Vírus da Hepatite C	04
2.3 Epidemiologia	07
2.4 Aspectos Biológicos e Clínicos-epidemiológicos do HCV	10
2.5 Patogênese	11
2.6 Diagnóstico	12
2.6.1 Diagnóstico Sorológico	13
2.6.2 Diagnóstico Molecular	14
2.7 RT-PCR e RFLPs Aplicados ao Diagnóstico Viral	14
2.7.1 RT-PCR	15
2.7.2 PCR aninhada	16
2.7.3 Genotipagem por RFLPs	16
2.8 Tratamento	17
3. Objetivos	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4. Casuística e Métodos	21
4.1 Aspectos Éticos	21

4.2 População em Estudo	21
4.3 Participantes	21
4.3.1 Critérios de Inclusão	22
4.3.2 Critérios de Exclusão	22
4.4 Obtenção das Amostras Clínicas	22
4.5 Isolamento de RNA Total	22
4.6 Transcrição Reversa	23
4.7 Visualização e Fotodocumentação em Eletroforese em	24
Gel de Agarose do cDNA Amplificado	
4.8 PCR Aninhada	25
4.9 RFLP/PCR da 5'NCR	25
4.9.1 Genotipagem	25
4.9.2 Subtipagem	26
4.10 Eletroforese dos produtos de digestão enzimática	27
4.11 Coloração por Nitrato de prata	28
4.12 Preservação dos géis e registro fotográfico digital	28
5. Resultados e Discussão	30
5.1 Casuísta	32
5.2 Isolamento de RNA viral	34
5.3 RT-PCR	36
5.4 PCR Aninhada	37
5.5 Genotipagem do HCV	38
5.6 Subtipagem do HCV	41
6. Conclusões	49
7. Perspectivas	50
7.1 Sequenciamento Automático de HCV	50

7.2 Diagnóstico Eletrônico das Seqüências de HCV	50
7.3 Análise filogenética dos genótipos de HCV	50
8. Referências Bibliográficas	52
9. Apêndices	64

Lista de Figuras

- Figura 1.** HCV mostrando proteínas do envelope, do capsídeo e o RNA viral. 04
- Figura 2.** Esquema da estrutura genômica do HCV mostrando as proteínas estruturais e não estruturais. 05
- Figura 3.** Distribuição de genótipos de HCV em diferentes regiões do Brasil de acordo com Busek & Oliveira (2003). 08
- Figura 4.** Distribuição das amostras processadas de plasma sangüíneo de 104 pacientes anti-HCV (n=104). 30
- Figura 5.** Algoritmo dos resultados das 104 amostras verificadas neste estudo, considerando-se: número de amostras HCV-RNA negativas; e número de amostras HCV-RNA positivas. 31
- Figura 6.** Percentual de distribuição por sexo de pacientes anti-HCV positivos com HCV-RNA detectável (n = 76). 32
- Figura 7.** Perfil eletroforético de três amostras HCV-RNA positivas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos da PCR aninhada do vírus da hepatite C. M=marcador 100pb; 1 a 3=HCV positivo (banda de aproximadamente 260pb). 38
- Figura 8.** Distribuição da freqüência de genótipos do HCV após digestão dupla com as endonucleases de restrição *HaeIII-RsaI* e *Hinfl-BstOI* entre os casos HCV-RNA positivos (n=76). 39

Figura 9. Padrões de restrição dos produtos da amplificação RT-PCR da região 5'UTR do HCV obtidos após digestão dupla com endonucleases de restrição *BstI/Hinfl*. Eletroforese em gel MetaPhor 4% com tampão de corrida TAE 1X. M=marcador 100pb; 1 e 2=genótipo 1 (bandas de aproximadamente 94, 63, 53 e 41 pb); e 3 a 8=genótipo 3 (bandas de aproximadamente 140, 57 3 53pb); 9=controle negativo. 40

Figura 10. Distribuição da frequência de subtipos do genótipo 1 em amostras de HCV-RNA positivos após digestão simples com a endonuclease de restrição *BstUI* (n=62). 41

Figura 11. Distribuição da frequência de subtipos do genótipo 3 em amostras de HCV-RNA positivas após digestão simples com a enzimas de restrição *ScrFI* (n=13). 42

Figura 12. Padrões de restrição dos produtos da amplificação RT-PCR da região 5'NCR do HCV de diferentes indivíduos obtidos após digestão simples com endonucleases de restrição *ScrFI* (1-6) e *BstI* (7-10) . Eletroforese em gel MetaPhor 4% com tampão de corrida TAE 1X. M=Marcador de 100pb. 43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição do número, percentual por faixas e média de pacientes anti-HCV com HCV-RNA detectáveis segundo a faixa etária (n = 76). 33

Lista de Abreviaturas

AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ALTs	Alanina amino transferases
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
APS	Persulfato de amônio
cDNA	DNA complementar
5'NCR	5' região não-codificadora
DNA	Ácido dextroribonucleico
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da Hepatite C
HCV-RNA	Ácido ribonucleico do vírus da hepatite C
HU	Hospital Universitário
IFN	Interferon
ISDR	Região determinante da sensibilidade ao Interferon
IRES	Sítio de entrada ribossomal interno
LiPA	Ensaio em sonda
MLV-RT	Transcriptase reversa do vírus da leucemia moloney murine
NAT	Teste de ácidos nucleicos
ORF	Região aberta de leitura
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de

	Restrição
RIBA	Ensaio Imunoblote Recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUS	Serviço Único de Saúde
<i>Taq</i> DNA	DNA polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	EDTA tamponado em Tris-borato
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletilenediamina
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UV	Luz ultravioleta
GEMPRO	Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica
KCl	Cloreto de potássio

Lista de Apêndice

Apêndice 01. Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa da UFAL.	64
Apêndice 02. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	65
Apêndice 03. Questionário aplicado os pacientes estudados.	66

Resumo

A prevalência dos genótipos do vírus da hepatite C (HCV) tem sido determinada em diversas regiões geográficas do Brasil, principalmente nas regiões Sudeste e Sul. Não existe informação sobre os genótipos do vírus circulantes no Estado de Alagoas, Nordeste do Brasil. A partir de padrões eletroforéticos gerados por RT-PCR e RFLPs, foi traçado um perfil genético (genotipagem e subtipagem) preliminar da população do vírus da hepatite C no Hospital Dia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e do Laboratório Central de Alagoas (LACEN). Neste trabalho foram avaliados 104 pacientes anti-HCV, durante o período entre março de 2003 a abril de 2004, após consentimento informado. Níveis detectáveis de HCV-RNA foram observados em 73,1% (76/104) das amostras de soro avaliadas por RT-PCR. A genotipagem foi efetuada a partir dos produtos da região 5'NCR gerados pela RT-PCR através de digestões duplas com endonucleases de restrição *HaeIII-RsaI* e *HinfI-BstOI*, seguida por clivagem com *BstUI* ou *ScrFI*. O genótipo 1 foi o mais predominante, com prevalência de 81,6%, contra 17,1% do genótipo 3. O subtipo 1b apresentou maior prevalência, 83,8% (52/76), seguido por 11,3% (7/76) para 1a e 3a. Subtipos relacionados com três (4,8%) indivíduos infectados com o genótipo 1, e seis (7,9%) infectados com o genótipo 3 não puderam ser determinados. Coinfecção (1a/3a) foi detectada em uma (1,3%) das amostras. A distribuição geral dos tipos de HCV em Alagoas são congruentes com dados preliminares já reportados em Estados do Nordeste (Bahia), Norte e Sudeste, onde determinou-se uma prevalência maior dos genótipos 1 e 3. Entretanto, em Alagoas, há uma maior prevalência do subtipo 1b, além da ausência, até o momento, do tipo 2, já detectado no Brasil.

Abstract

The prevalence of Hepatitis C (HCV) genotypes has been determined in several geographical regions of Brazil, mostly in the southern and southeastern regions. There is no information about the genotypes of the virus circulating in the State of Alagoas, northeastern Brazil. We evaluated 104 anti-HCV seropositive patients from the Hospital Dia of Hospital Universitário of Universidade Federal of Alagoas (UFAL) and Laboratório Central of Alagoas (LACEN) from 2003 to 2004. Detectable HCV-RNA was present in 73.1% (76/104) of the serum samples by RT-PCR. The analysis of the genotypes was performed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products from the 5'UTR region with genotype-specific primers and also by using restriction endonuclease double digestion of PCR amplified sequences using endonucleases *HaeIII-RsaI* and *HinfI-BstOI*, followed by cleavage with *BstUI* and *ScrFI*. Genotype 1 was the most predominant, with prevalence of 60.6%, against 13.5% of the genotype 3. Subtype 1b showed higher prevalence, 68.4% (52/76), followed by 9.2% (7/76) for both 1a and 3a. Subtypes related to three (3.9%) individuals infected with genotype 1, and six (7.9%) infected with genotype 3 could not be further determined. Coinfection (1a/3a) was detected in one (1.3%) of the samples. A higher frequency (53.8%) of the subtype 1b was observed in older patients (above age 55). The general distribution of HCV types in Alagoas is similar to that found in the northern, northeastern and southeastern regions with a higher prevalence of genotypes 1 and 3. However, our results differ from those previously reported from northeastern region (Bahia) specially for those data related to higher prevalence of subtype 1b and absence of genotype 2.

1. Introdução

A infecção causada pelo vírus da hepatite C (HCV) está altamente associada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC), devido a fatores como: grau de dano hepático, idade e genótipos. A hepatite C é a infecção mais comum em todo o mundo, com um número seis vezes maior de contaminados em relação aos portadores do HIV e por isso é considerada uma doença de grande impacto mundial. Segundo a OMS, aproximadamente 200 milhões de pessoas estão infectadas pelo HCV, sendo grande parte assintomática, desconhecendo que é portadora do vírus (WEILAND *et al.*, 1999).

O diagnóstico preciso e a genotipagem do vírus é de grande importância, dado que, infecções por genótipos diferentes do HCV resultam em respostas diferentes ao tratamento com interferon peguilado (LAYDEN & LAYDEN, 2002).

Apesar do HCV ser um agente de baixa infectividade e replicação lenta, 50% a 80% dos pacientes que apresentam a forma aguda de hepatite evoluem para uma infecção persistente e assintomática, e após 10 anos terão uma hepatite crônica ativa, progredindo para cirrose hepática após sete anos. Em média, indivíduos que apresentam quadro definido de cirrotização desenvolvem, em 13 anos, um quadro de hepatocarcinoma (OLIVEIRA *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 1995).

Existem evidências de que o subtipo 1b do HCV é o mais agressivo e está mais intimamente relacionado com o amplo espectro de doenças crônicas do fígado em estágio avançado, especialmente cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (ZEIN, 2000). Estudos realizados na Europa mostram características importantes da infecção pelo subtipo 1b do vírus, como a sua associação direta com a idade dos pacientes e a longa duração da infecção crônica. Em pacientes que apresentam doença hepática

por longo período, incluindo carcinoma hepatocelular, o subtipo 1b foi o mais prevalente (PARANÁ *et al.*, 2000). Indivíduos infectados com o subtipo 1b tendem a responder menos ao interferon peguilado do que aqueles infectados com outros genótipos de HCV. A sensibilidade ao INF pelo subtipo 1b está correlacionada com mutações dentro de uma discreta região da proteína viral não-estrutural 5A (NS5A), expressando a região determinante da sensibilidade ao Interferon (ISDR) (LAYDEN & LAYDEN, 2002).

Considerando a ausência de dados referentes à prevalência dos genótipos e subtipos do HCV circulantes em Alagoas, e a necessidade da determinação para o estabelecimento do esquema terapêutico a ser utilizado no tratamento da doença, foram utilizados, neste trabalho, métodos biomoleculares baseados na análise de ácidos nucléicos, como RT-PCR, PCR aninhada e RFLPs, para identificar os genótipos circulantes que auxiliarão aos programas de controle epidemiológicos em nosso do Estado. Portanto, o objetivo principal deste trabalho é o de avaliar a eficiência e especificidade da diagnose molecular do vírus através de RT-PCR e RFLPs em amostras anti-HCV positivas procedentes do Hospital Dia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e do Laboratório Central de Alagoas (LACEN).

2. Revisão da Literatura

2.1 Hepatite C

Os vírus da hepatite C agem como verdadeiros parasitas intracelulares que desenvolveram um sofisticado mecanismo de replicação e de propagação ao longo de milhões de anos de co-habitação com seus hospedeiros. Eles se adaptaram e modificaram a sua estratégia biológica, desenvolvendo uma impressionante capacidade de mutação, o que garantiu a sua sobrevivência no planeta até os dias atuais (CONTE, 2000; OSELLA *et al.*, 2001).

A hepatite C é transmitida principalmente pelo sangue e seus derivados, e foi disseminada rapidamente através de transfusões de sangue nas décadas de 1970 e 1980, quando ainda não era obrigatório o teste sorológico anti-HCV (FELIPPE-JUNIOR, 2003).

A evolução da Hepatite C é caracterizada por fases de acentuada viremia intercaladas por períodos de relativa quietude, sendo típico a baixa incidência das fases agudas e a alta incidência de progressão para a cronicidade. A hepatite C pode progredir nas seguintes fases: exposição ao vírus, incubação, período pré-ictérico, período ictérico e convalescença (WEILAND *et al.*, 1999).

O isolamento de HCV de diversas regiões do planeta mostrou que o vírus é altamente heterogêneo. São reconhecidos 6 genótipos distintos denominados de 1 a 6 com aproximadamente 100 subtipos (a, b, c, etc). Os genótipos 1 a 3 são encontrados em todos os continentes (cosmopolitas), os 4 e 5 são típicos da África e o 6 foi verificado na Ásia. Estas diferenças de genótipos e subtipos fazem com que varie a susceptibilidade do vírus à terapia antiviral (VITRAL *et al.*, 1999; PARANÁ *et al.*, 2000).

2.2 Biologia do Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C foi identificado no final da década de 80, sendo reconhecido como um membro da família Flaviviridae. Seu genoma consiste de uma hélice simples de RNA de polaridade positiva com cerca de 9,5 Kb (Figura 2)(OLIVEIRA *et al.*, 1999; PARANÁ *et al.*, 2000; MORADPOUR *et al.*, 2001).

O genoma do HCV possui uma única região aberta de leitura (ORF) que codifica a síntese de uma macroproteína com 3.011 aminoácidos. O desdobramento dessa proteína resulta em 10 proteínas menores, com função estrutural ou regulatória (CHOO *et al.*, 1989; STRAUSS, 2001).

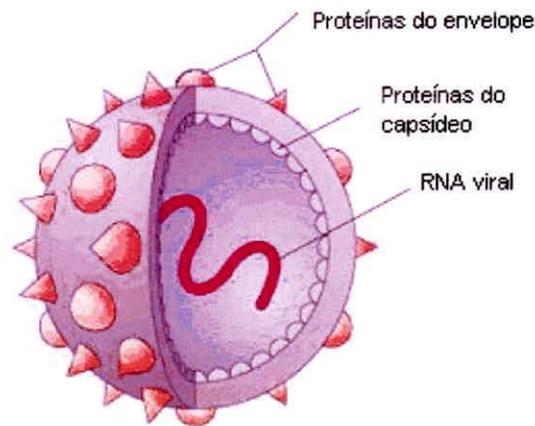


Figura 1. HCV mostrando proteínas do envelope, do capsídeo e o RNA viral (STRAUSS, 2001).

Vários genes estruturais e não-estruturais foram identificados entre as regiões terminais não codificadoras (NCR), 5' e 3', do genoma do vírus HCV (DAVIS *et al.*, 1999; FANG *et al.*, 2001). A região estrutural do nucleocapsídeo viral e as regiões do envelope E1 e E2 correspondem aos genes estruturais que codificam, respectivamente, as glicoproteínas do núcleo e do envelope do HCV, enquanto os genes não-estruturais – NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B – codificam outras proteínas e as enzimas

necessárias para a replicação viral (Figura 3) (CHOO *et al.*, 1989; MURASHIMA *et al.*, 1999).

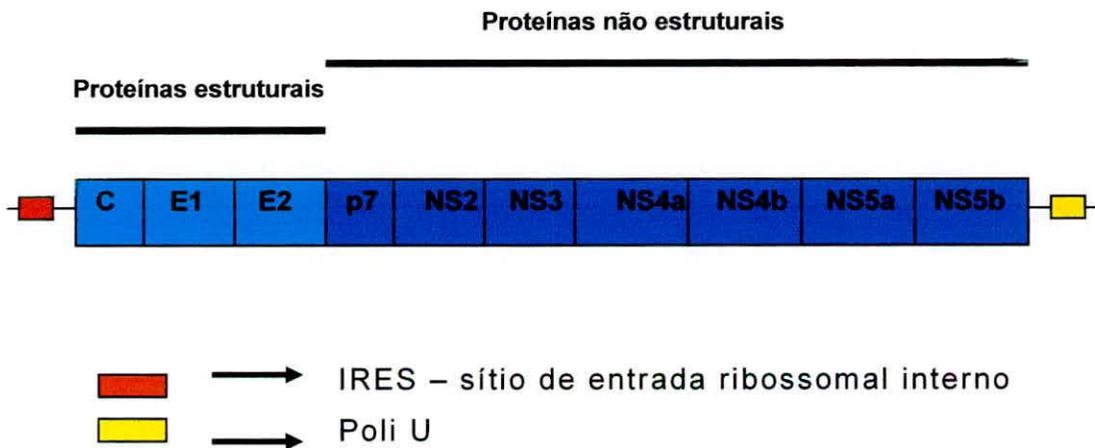


Figura 2. Esquema da estrutura genômica do HCV mostrando as proteínas estruturais e não estruturais.

Embora as regiões terminais 5' e 3' sejam altamente conservadas, alguma heterogeneidade foi observada em outras regiões do genoma do HCV, que são responsáveis pelas diferentes cepas ou genótipos do vírus já descritos (SIMMONDS *et al.*, 1994; DAVIS *et al.*, 1999; FANG *et al.*, 2001). Até o momento, foram identificados seis genótipos mais importantes do HCV produzindo informação que auxilia nas estratégias terapêuticas. Por exemplo, o genótipo 1 foi associado com doença mais agressiva, carga viral maior e resistência ao tratamento, ou seja, índices de resposta mais baixos (McHUTCHISON *et al.*, 1998; POYNARD *et al.*, 1998; DAVIS *et al.*, 1999; WEILAND *et al.*, 1999). Portanto, a história natural, o diagnóstico e o manejo da infecção pelo HCV são afetados pelo genótipo viral.

As proteínas estruturais codificadas pela região N-terminal incluem a proteína central seguida por duas proteínas do envelope glicosiladas codificadas pelos genes E1 e E2. A proteína

codificada pelo gene E2 do envelope apresenta duas regiões hipervariáveis, e1 e e2. A proteína e2 contém também o sítio de ligação para uma proteína de membrana dos linfócitos B (CD81), provavelmente o receptor viral específico do HCV (PILERI *et al.*, 1998). A proteína p7, também codificada pela região E2 e processada por um precursor E2-P7, já foi descrita, porém sua função é desconhecida (SUZIKI *et al.*, 1999; BARCELLOS *et al.*, 2002).

A região não estrutural (NS) codifica seis proteínas: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. A NS3 é responsável por três atividades enzimáticas: serina-proteinase, helicase e nucleotídeo-trifosfatase-dependente de ATP. Uma segunda protease é codificada pela NS2 e seqüência N-terminal da NS3. A NS4A forma um complexo heterodinâmico com a NS3, agindo como um ativador necessário para a atividade proteinase da NS3. Sobre o NS5B, é provável que codifiquem a RNA polimerase, pois apresenta códons para aminoácidos conservados em várias polimerases. As funções da NS2 e NS4B ainda não são bem estabelecidas. A purificação de NS3 recombinante e NS5 permitiram a demonstração da atividade de serina-proteinase e de helicase do NS3, bem como a atividade polimerase do NS5. Isso abrirá novas possibilidades para o desenvolvimento de drogas capazes de inibir o processamento de poliproteínas do HCV e a replicação de RNA do HCV (SUZIKI *et al.*, 1999; MORADPOUR *et al.*, 2001; STRAUSS, 2001; BARCELLOS *et al.*, 2002).

A região 5' não-codificadora (NCR) é altamente conservada entre HCV's isolados. Isso mostra estruturas secundárias com várias ramificações e voltas. Existe uma boa evidência para a presença neste domínio de um sítio de entrada ribossomal interno (IRES), permitindo uma tradução cap-independente do RNA viral. Os estudos atuais estão ajudando a mapear mais precisamente as seqüências IRES, e identificar a proteína celular que se liga a 5'

NCR e também regula a tradução do genoma do HCV (MURASHIMA *et al.*, 1999; MORADPOUR *et al.*, 2001; STRAUSS, 2001; BARCELLOS *et al.*, 2002).

De acordo com SHIMAZAKI (2002), a tradução da poliproteína do HCV é mediada por um IRES localizado dentro da região da proteína viral não estrutural 5A (NS5A).

2.3 Epidemiologia

A Hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo HCV, sendo responsável por, pelo menos, 90% das hepatites não-A e não-B pós-transfusionais. O agente causal infecta principalmente as células do fígado podendo levar ao desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular e é considerada uma doença que demora a se manifestar. A hepatite C pode não apresentar sintomas, tanto na sua fase aguda, quanto na crônica, e após a contaminação, 85% das pessoas desenvolvem a doença crônica, cerca de 20 a 30% evoluem para cirrose e 1 a 4% risco de desenvolver HCC (STRAUSS, 2000; BDOUR, 2002).

A hepatite C crônica é considerada como uma das grandes preocupações de saúde pública mundial. Estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo inteiro estejam infectadas com o vírus, incluindo quatro milhões de pessoas nos Estados Unidos (WEILAND *et al.*, 1999; SARBAH *et al.*, 2000). Uma vez que a infecção pelo HCV é a principal causa de doença hepática crônica e de transplante de fígado nos Estados Unidos e Europa Ocidental, o foco de atenção para o controle e/ou a erradicação do HCV vem aumentando progressivamente. Países como Egito, Arábia Saudita, Filipinas, Papua e Nova Guiné são os que apresentam maior número de casos, incluindo doadores voluntários de sangue (média de 0,4% a 1,0%). No geral, a prevalência varia de menos de 1% da população, na Europa e Estados Unidos, a 10% em regiões da África e Ásia (PARANÁ *et al.*, 2000; BDOUR, 2002).

Não se sabe ao certo a prevalência da infecção pelo HCV no Brasil. Mas, estima-se que um em cada 40 brasileiros são portadores HCV. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o Brasil tem cerca de quatro milhões de portadores. Em estudo transversal realizado em bancos de sangue, a prevalência de doadores com anti-HCV positivo foi de 1,23%. Porém, existem regiões no País, como o Acre, aonde a prevalência chega a 10% dos doadores de sangue.

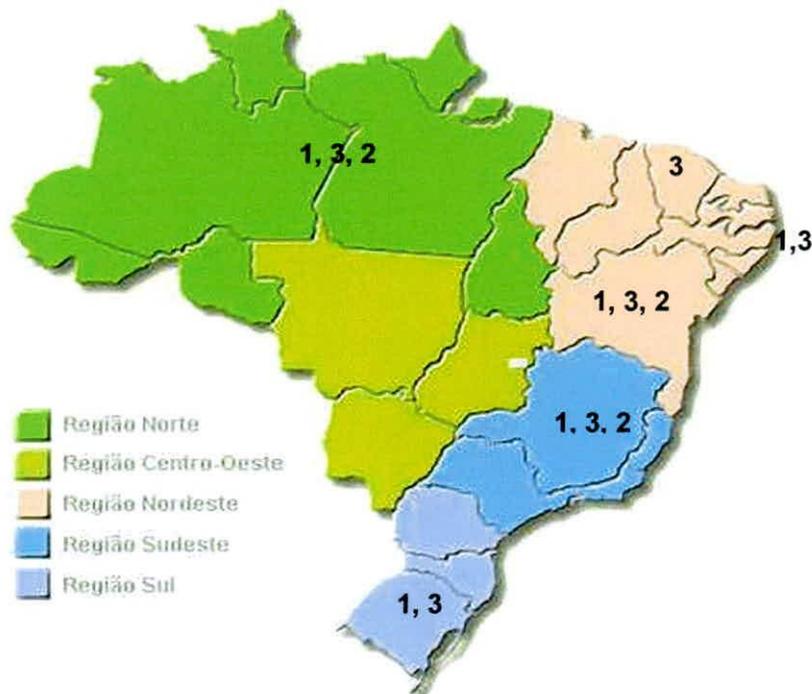


Figura 3. Distribuição de genótipos de HCV em diferentes regiões do Brasil de acordo com Busek & Oliveira (2003).

A distribuição genotípica do HCV no mundo sofre variação com a área geográfica, sendo que os genótipos tipo 1, 2 e 3 são predominantemente encontrados na Europa, Japão (KREKULOVA *et al.*, 2001), Estados Unidos (ALTER *et al.*, 1999; KREKULOVA *et al.*, 2001), sendo o genótipo 1b o mais prevalente no ocidente do mundo (PARANÁ *et al.*, 2000). O genótipo 4 é mais frequente no centro-norte, leste e sul do continente africano (McOMISH *et al.*,

1994; PARANÁ *et al.*, 2000; KREKULOVA *et al.*, 2001); genótipo 6 em Hong Kong (SIMMONDS *et al.*, 1993 KREKULOVA *et al.*, 2001) e genótipo 7, 8 e 9 no Vietnã (BDOUR, 2002). O mapa de BUSEK & OLIVEIRA (2003) mostra os genótipos encontrados no Brasil (Figura 3). Com relação ao Estado de Alagoas, os genótipos circulantes são descritos neste estudo.

Apesar do HCV ter sido clonado em 1988, apenas em 1991 nos EUA e 1993 no Brasil, através da Portaria n° 1376 do Ministério da Saúde do Brasil, os testes laboratoriais para identificar este vírus, tornaram-se obrigatórios em doadores de sangue. Desta forma, o HCV infectou e infecta milhares de pessoas que necessitaram ou estão expostos ao sangue e seus produtos derivados, dependendo da utilização de triagem sorológica para HCV disponível em cada país. Somente em Portaria N° 1.461 de 22 de dezembro de 1999 o Ministério da Saúde colocou a hepatite pelo HCV na lista nacional de doenças de notificação compulsória em registro individual.

A incidência de doadores anti-HCV em regiões do Estado do Paraná, mostraram em Curitiba a taxa de 0,66%, 0,57% em Campo Mourão, 0,52% em Francisco Beltrão, 0,54% em Apucarana, 0,47% em Guarapuava e 0,45% em Cascavel (VALENTE, 2002).

No Estado de Alagoas estima-se que existam cerca de 4 mil casos confirmados de portadores do HCV, dos quais 3500 estão em tratamento de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hepatite Viral Crônica Tipo C (HCV). Somente no primeiro semestre de 2004 foram notificados 44 novos casos de portadores do HCV, enquanto que durante todo o ano de 2003 foram notificados 34 casos (SINAN, 2004).

BRANDÃO (2001) demonstrou que 75,0% das infecções pelo HCV ocorrem por via parenteral. Nos hemofílicos, a prevalência da hepatite pelo vírus tipo C no Brasil é de 87,3%, enquanto que nos pacientes hemodialisados verificam-se percentuais que variam de 19,0% a 47,2%. Em usuários de drogas intravenosas que

compartilham seringas, o índice de contaminação pode chegar a mais de 80,0% (YEN *et al.*, 2003).

Grupos de riscos para hepatite C incluem indivíduos que receberam transfusão sanguínea (6,0%) e foram submetidos à hemodiálise (1,0%) antes de 1994, os usuários de drogas que compartilharam seringas (42,0%) (COCHRANE *et al.*, 2002), agulhas e aqueles com tatuagens ou *piercings*. A transmissão por sexo é muito baixa (6,0%) e contato do portador com a família (3,0%), objetos e leite materno contaminados, profissionais da área de saúde (2,0%) (BREVIDELLI & CIANCIARULLO, 2001). Portanto, instrumentos odontológicos, de barbeiros e de manicures devem ser corretamente esterilizados (PARANÁ *et al.*, 2000).

2.4 Aspectos Biológicos e Clínicos-epidemiológicos do HCV

Na Hepatite C não é desenvolvida imunidade natural, isto quer dizer que, se uma pessoa teve hepatite C e negativou o vírus, ela pode ser reinfetada, devido a diferentes genótipos do vírus, consequência da alta taxa de mutação do seu ácido nucléico (COLOMBO, 1999).

A maioria das pessoas que se infectam pelo HCV apresentam viremia crônica associada a graus variáveis de processo inflamatório e fibrose. Estudos demonstram que 50% ou mais dos hepatócitos de indivíduos infectados albergam o vírus. A presença de linfócitos no parênquima hepático tem sido interpretada como evidência de dano imunomediado. A erradicação do vírus está associada ao aparecimento de forte resposta celular mediada por células T citotóxicas e células T auxiliaadoras. (COOPER *et al.*, 1999; LECHNER *et al.*, 2000; TAKAKI *et al.*, 2000). O aparecimento de células T citotóxicas parece crítico, visto que a perda dessas células tem sido associada ao ressurgimento da viremia (GERLACH *et al.*, 1999).

2.5 Patogênese

As características do genoma do HCV se distinguem por uma intensa atividade genética com um grande potencial de mutação. Esta grande flexibilidade genotípica proporciona ao vírus um sofisticado mecanismo para se livrar das defesas do hospedeiro. Contudo, por ser um vírus tipicamente de RNA, o HCV não integra seu genoma ao cromossomo do hospedeiro (BARCELLOS *et al.*, 2002).

In vivo, o vírus da hepatite C é um retrovírus e seu principal mecanismo de sobrevivência consiste em injetar o seu material genético na célula do hospedeiro e, com o auxílio da enzima transcriptase reversa ocorre a produção de moléculas de cDNA - DNA complementares ao seu material genético, que é formado por RNA, fazendo com que a maquinaria da célula do hospedeiro reconheça o material (DNA) e não o destrua (ZEIN, 2000; STRAUSS, 2001; MORADPOUR *et al.*, 2001; LAYDEN & LAYDEN, 2002).

No mecanismo de replicação do RNA do HCV, a célula hospedeira é o hepatócito, entretanto o vírus também pode infectar a medula óssea, os rins, os macrófagos, os linfócitos e os granulócitos. Uma vez dentro da célula, o vírus rompe o seu envelope e se liga ao ribossomo celular que sintetiza a polimerase para a síntese de um filamento intermediário de RNA negativo, o qual dirige a síntese para novos genomas positivos de RNA. Os nucleocapsídeos recém formados adquirem novos envelopes protéicos do retículo endoplasmático da célula infectada. Os vírus são liberados na circulação geral e linfática e infectam novas células do hospedeiro. Os vírus formados atingem o número de 10 bilhões ao dia. A sobrevivência média dos vírus é de somente poucas horas (STRAUSS, 2001; LAYDEN & LAYDEN, 2002).

Variações frequentes dos genes virais parecem ter uma importante função no mecanismo de escape do HCV no sistema

imune do hospedeiro. É comum um vírus mutante da hepatite C escapar ao reconhecimento pelas células T citotóxicas, sugerindo que o HCV possa burlar não só a imunidade humoral, mas também, a imunidade celular (CONTE, 2000).

Estudos mostraram que o HCV associa-se com lipoproteínas na circulação, no intuito de proteção de anticorpos circulantes e outros mecanismos imunes. A associação do HCV com lipídios também promove a entrada do vírus com facilidade no fígado, pois lipídios são captados pelos hepatócitos, fazendo parte do metabolismo hepático (STRAUSS, 2001; LAYDEN & LAYDEN, 2002).

Estima-se que o HCV sofra quase 1000 mutações por ano dentro do próprio hospedeiro. Dentro de um determinado indivíduo infectado, as partículas do HCV não se comportam como uma população homogênea, na verdade elas funcionam como um conjunto de variantes genéticas conhecidas com *quasispecies*. Isto acontece devido à grande quantidade de erros de replicação inerentes à função das enzimas polimerases. É aqui que reside uma das mais importantes armas do HCV, pois a contínua geração de uma diversidade tão grande de genomas dificulta a atuação do sistema imune do hospedeiro. Quando o sistema imune encontra um caminho e destrói o inimigo, este já está se transformando e gerando partículas diferentes que o sistema de defesa não mais reconhece (CONTE, 2000; STRAUSS, 2001; LAYDEN & LAYDEN, 2002).

2.6 Diagnóstico

Os testes para detecção da infecção pelo HCV podem ser divididos basicamente em três tipos: histológico, sorológico e molecular. A biópsia hepática é utilizada para caracterizar histologicamente a lesão hepática existente. Também são realizados exames complementares como ultrassonografia e endoscopia (PALTANIN *et al.*, 2002).

2.6.1 Diagnóstico Sorológico

As técnicas utilizadas para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HCV são baseadas na detecção de anticorpos contra o vírus. Estas técnicas apresentam excelentes resultados e são menos dispendiosas, sendo de escolha para toda e qualquer triagem inicial. Porém detectam a resposta do hospedeiro contra o vírus, e não o próprio vírus diretamente (ZEIN, 2000; BRANDÃO *et al.*, 2001; TOYO *et al.*, 2001).

ELISA é um método que utiliza proteínas virais produzidas em cultura celular ou através de tecnologia molecular recombinante. Esta técnica é amplamente utilizada como teste inicial para detecção de anticorpos contra o vírus, devido à sua facilidade de automação e custo relativamente baixo. Apresenta atualmente altas sensibilidade e especificidade (MORADPOUR *et al.*, 2001; TOYO *et al.*, 2001).

Em função da prevalência de infecção pelo vírus C, estimada em 3%, o diagnóstico da hepatite C requer um teste bastante sensível. Os testes comercializados para detecção do anti-HCV são os ELISA, que apresentam vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo. As três gerações de ELISA desenvolvidas até o momento utilizam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos para a captação do anti-HCV (BRANDÃO *et al.*, 2001; MORADPOUR *et al.*, 2001).

Resultados obtidos nos métodos de triagem podem ser confirmados pelo RIBA II ou RIBA III. O método RIBA tem o inconveniente de apresentar cerca de 10% a 20% de resultados inconclusivos ou indeterminados (SÁEZ-ALQUÉZAR *et al.*, 1996; BRANDÃO *et al.*, 2001; MORADPOUR *et al.*, 2001).

2.6.2 Diagnóstico Molecular

Testes moleculares detectam diretamente o vírus. Atualmente, estão sendo aplicados em situações específicas, tais como: exames sorológicos indeterminados ou duvidosos, acompanhamento laboratorial de pacientes, mensuração da carga viral para controle de tratamento (LEWIN, 2000). Outra situação que requer o uso da PCR qualitativa é a de pacientes com hepatite pelo HCV, candidatos a tratamento com interferon isolado ou associado com a administração de ribavirina (BRANDÃO *et al.*, 2001; MORADPOUR *et al.*, 2001).

Por fim, o teste é também preconizado para hepatite aguda no período de janela imunológica, quando o RNA do HCV pode ser detectado uma semana após a exposição (BRANDÃO *et al.*, 2001; MORADPOUR *et al.*, 2001).

Podem ser qualitativos, onde se detecta a presença ou ausência de material nucléico de um microrganismo ou de determinada mutação ou seqüências gênicas, e quantitativos, onde o número de microrganismos (partículas virais ou genômicas) é quantificado em volume definido da amostra biológica. Adicionalmente, apresentam menor sensibilidade em relação aos métodos qualitativos (LEWIN, 2000).

2.7 RT-PCR e RFLPs Aplicados ao Diagnóstico Viral

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é um método preciso, rápido e largamente empregado na amplificação *in vitro* de regiões específicas de ácidos nucleicos, o pareamento de oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias ou previamente conhecidas. A síntese da nova fita de DNA é obtida através interação entre oligonucleotídeos (iniciadores da reação), desoxiribonucleotídeos (componentes da estrutura do DNA), DNA molde e uma enzima DNA polimerase termoestável (FURIONE *et al.*, 1999). Esta técnica tem sido adotada como uma abordagem

alternativa para a análise de variabilidade genômica, construção de mapas genéticos e produção de sondas genéticas para diferentes organismos (WELSH & McCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990 e BARRY *et al.*, 1990; FURIONE *et al.*, 1999).

2.7.1 RT-PCR

A RT-PCR ocorre em duas etapas: transcrição reversa e amplificação. Sua principal diferença está no fato de a reação não partir de um molde de DNA, mas de uma fita molde de RNA, que após uma reação catalisada por uma transcriptase reversa é convertido em cDNA. Na primeira, ocorre a transcrição reversa com a formação de uma fita de cDNA e na segunda, a amplificação do cDNA (ASLANZADEH *et al.*, 2000; MORADPOUR *et al.*, 2001).

A RT-PCR é uma técnica laboriosa e de grande sensibilidade, utilizada para a síntese de uma fita dupla de cDNA, a partir de uma fita simples de RNA e que requer cuidados extremos para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos (BRANDÃO *et al.*, 2001). Ela é bastante utilizada para determinar a presença ou ausência de vírus RNA em casos de suspeita clínica de HCV com sorologia inconclusiva, sendo também, realizada em indivíduos com infecção crônica que serão submetidos à tratamento quimioterápico ou cirúrgico (STRAUSS, 2000). A RT-PCR pode contribuir com grande eficiência para auxiliar o diagnóstico de infecções agudas antes mesmo do aparecimento de anticorpos (anti-HCV) (FREEMAN *et al.*, 1999; FURIONE *et al.*, 1999). O limite teórico de detecção, por PCR, em condições ótimas, é de aproximadamente 1.000 cópias do genoma/mL, mas existem variações da técnica, e uma das mais sensíveis é capaz de detectar até 100 cópias do genoma/mL de soro (DAVIS *et al.*, 1999; BELD *et al.*, 2000).

2.7.2 PCR aninhada

A PCR aninhada é utilizada para melhorar a especificidade e a eficiência da reação. O segmento genômico é amplificado, primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo seqüências localizadas fora dela, e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real seqüência-alvo (RUSTER *et al.*, 1996; FURIONE *et al.*, 1999; ALMEIRA *et al.*, 2001).

Nesta técnica, realizam-se dois ensaios consecutivos de PCR. No primeiro, um segmento de DNA é amplificado com um par de oligonucleotídeos, empregando-se cerca de 15 a 30 ciclos de amplificação. Uma alíquota do produto amplificado é então submetida à nova amplificação usando-se novo par de iniciadores, localizados internamente em relação à posição do par de oligonucleotídeos inicialmente utilizados. A segunda amplificação, com oligonucleotídeos diferentes, determina a especificidade da reação. Essa técnica apresenta sensibilidade ainda superior à do PCR e é recomendada quando a concentração de material nucléico é extremamente reduzida. Como esperado, os riscos de contaminação são ainda maiores do que os mencionados com a técnica do PCR (RUSTER *et al.*, 1996; ALMEIRA *et al.*, 2001). A PCR aninhada, aliada à genotipagem por RFLP pode contribuir com grande eficiência para o diagnóstico precoce de infecções agudas antes mesmo do aparecimento de anticorpos. Além de auxiliar na conduta do tratamento tendo como objetivos principais interromper a replicação viral, diminuir os sintomas e a progressão da infecção viral. Como consequência direta, pode ocorrer a diminuição de custos para a Saúde Pública com eventuais complicações da doença.

2.7.3 Genotipagem por RFLPs

Variabilidade genética pode ainda ser identificada por um número diferente de técnicas, dentre elas, RFLPs. O princípio da

técnica está associado a eventuais diferenças existentes entre genomas, que podem ser visualizadas claramente quando o DNA dos organismos é tratado com endonucleases de restrição. Como resultado, fragmentos de DNA de diferentes tamanhos (DNA polimórfico) são gerados, se ocorrer variação nas seqüências nucleotídicas, uma vez que a endonuclease cliva o DNA em diferentes sítios de restrição, e ainda, de genótipos mutantes ou variantes ainda não descritos (RUSTER *et al.*, 1996) e genotipagem (FURIONE *et al.*, 1999).

A metodologia baseia-se na amplificação de um segmento da região não codificadora da extremidade 5' do vírus pela técnica de RT-PCR aninhada. O produto de aproximadamente 260 pares de base é submetido a RFLP que emprega enzimas de restrição que gera fragmentos com padrões eletroforéticos que permite a identificação através padrões já estabelecidos. Existem outros métodos disponíveis no mercado para a genotipagem, sendo o mais conhecido, o LiPA que é uma hibridização reversa do produto de amplificação a oligonucleotídeos sintéticos baseados nos dados de seqüência de diferentes isolados do HCV. Todavia, em casos mais complexos e em pacientes com infecção por mais de um subtipo de HCV, os dois testes não apresentam uma solução definitiva (FURIONE *et al.*, 1999; FREEMAN *et al.*, 1999).

2.8 Tratamento

O tratamento da infecção causada pelo HCV tem como objetivos principais interromper a replicação viral, diminuir os sintomas e a progressão da infecção viral (OSELLA *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstraram que pacientes com carga viral no soro abaixo de 1 milhão de cópias virais por mL têm maiores chances de responder ao tratamento (OSELLA *et al.*, 2001; MORADPOUR *et al.*, 2001).

A principal estratégia para o tratamento da hepatite C inclui o interferon e a ribavirina. Interferons são glicoproteínas produzidas

pelas células que ativam os macrófagos, os neutrófilos e as células NK e, para alguns, possui uma atividade antiviral direta. Ribavirina é um análogo da guanosina que impede a formação do RNA mensageiro e assim inibe a replicação de muitos vírus DNA e RNA (CHAN *et al.*, 2000). Tanto o interferon quanto a ribavirina provocam efeitos colaterais significativos. Considera-se uma boa resposta quando a carga viral se torna indetectável ao final de 6 meses de tratamento. Pode ocorrer resistência à terapia apresentada, sendo esta a razão de estarem em fase de estudo vários tipos de antivirais, como os inibidores de protease, de polimerase e da helicase. Não existem, ainda, vacinas devido ao alto grau de mutabilidade do HCV (BJØRO *et al.*, 2002; WEBSTER *et al.*, 2000; MORADPOUR *et al.*, 2001).

O custo elevado é outro fator que dificulta o tratamento. Embora a Ribavirina seja produzida no Brasil, o Interferon não é, e seu preço pode chegar a U\$ 345.00 por dose (SLOBODA, 2004). O tratamento completo custa U\$ 1,700.00 por mês é oferecido gratuitamente desde que o portador do HCV faça parte do grupo de inclusão, segundo a portaria 639 do Ministério da Saúde (MS), que regulamentou o protocolo de diagnóstico e tratamento aos portadores pelo SUS. Cerca de nove mil pacientes recebem atualmente do SUS a ribavirina e o interferon peguilado, que promete elevar a resposta ao tratamento de 47% do interferon- α convencional para 60% dos casos. São de grande importância estratégias terapêuticas que possam melhorar a qualidade de vida dos portadores do HCV (WEBSTER *et al.*, 2000; FELIPPE-JUNIOR, 2003).

O interferon peguilado foi sintetizado a partir da ligação do IFN- α -2b recombinante à uma molécula de cadeia única linear de PEG com peso molecular médio de 12.000 dáltons em uma proporção molar de 1:1. O PEG liga-se por união covalente

primária à histidina 34 da IFN- α -2b (MORADPOUR *et al.*, 2001). Os sítios secundários de peguilação incluem a cisteína N-terminal, bem como os resíduos lisina -31, -121 e -134 (MONOGRAFIA SCHERING-PLOUGH, 1997).

A peguilação das proteínas é um método bem estabelecido de retardar a depuração e reduzir a imunogenicidade das proteínas, tendo se mostrado seguro para os seres humanos (WANG *et al.*, 2000; WEBSTER *et al.*, 2000). A molécula de PEG é inerte, hidrossolúvel, não-tóxica e de tamanho variável, constituindo-se em um agente modificador ideal que já foi utilizado para retardar a depuração de uma variedade de proteínas com aplicações clínicas, tais como a adenosina de aminase, a L-asparaginase, a interleucina-2, o fator de estimulação de colônia de macrófagos-granulócitos, o fator de necrose tumoral e o hormônio do crescimento humano (WANG *et al.*, 2000, WEBSTER *et al.*, 2000; MONOGRAFIA SCHERING-PLOUGH, 1997).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- A partir dos padrões eletroforéticos gerados por RT-PCR e RFLPs, traçar um perfil genético (genotipagem e subtipagem) preliminar da população do vírus da hepatite C no Hospital Dia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e do Laboratório Central de Alagoas (LACEN).

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a prevalência do RNA-HCV em amostras anti-HCV positivas;

- Avaliar a eficiência e especificidade da diagnose molecular do vírus através de RT-PCR e RFLPs nas amostras analisadas.

4. Casuísticas e Métodos

O trabalho foi executado no Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica - GEMPRO da UFAL, a partir de amostras obtidas do serviço de Hepatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e do Laboratório Central de Alagoas (LACEN).

4.1 Aspectos Éticos

Este trabalho contou com as autorizações da Comissão de Ética em Pesquisa da UFAL em agosto de 2001 (Apêndice 1) e dos participantes pela assinatura de um termo de livre consentimento (Apêndice 2).

4.2 População em Estudo

Na diagnose e genotipagem do HCV, foi efetuada a identificação dos pacientes através de preenchimento de formulário contendo: nome completo, estado civil, profissão, idade, sexo, endereço, telefone, procedência e ocorrência dos fatores de risco (Apêndice 3). Por outro lado, dados relacionados com transfusão sanguínea, tabagismo, alcoolismo, tatuagem foram também levantados neste estudo de pesquisa, objetivando-se o conhecimento do perfil de portadores anti-HCV positivo.

4.3 Participantes

Cerca de 104 indivíduos anti-HCV positivos foram avaliados em relação à presença de HCV-RNA, durante março de 2003 a abril de 2004, após consentimento informado. Desses, 76 foram avaliados em relação ao tipo e subtipo viral.

4.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos com anti-HCV positivo pelo método de Elisa 3ª geração e pacientes sem de tratamento (Apêndice 1).

4.3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos em tratamento e com anti-HCV negativo.

4.4 Obtenção das Amostras Clínicas

As amostras de sangue foram coletadas dos pacientes selecionados com sorologia positiva para anti-HCV comprovado, utilizando-se seringas descartáveis e de uso individual.

O sangue coletado foi centrifugado 4000xg durante 2 min para obtenção do plasma sangüíneo. O material biológico foi acondicionado em microtubos a 5°C e posteriormente levado ao Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica em caixa térmica e mantido em freezer a -20°C.

4.5 Isolamento de RNA Total

A extração do RNA total foi realizada utilizando a solução extratora TRIzol® *LS Reagent* (Life Technologies™), baseada no protocolo de CHOMCZYNSKY & SACCHI (1989). Esta é composta basicamente por fenol e isotiocianato de guanidina, indicado para isolamento de RNA viral de amostras de sangue total, soro ou plasma sangüíneo.

No período que antecede ao isolamento de RNA total, enfatizou-se alguns cuidados para evitar contaminações por RNases, durante a manipulação de pipetas, vidrarias e bancadas. Esses materiais foram tratados com inibidor de RNase, DEPC 0,1%.

O protocolo adaptado TRIzol consiste em cinco etapas: lise, separação, precipitação, lavagem e solubilização. Em microtubos foram adicionados 250 μ L da amostra de plasma sanguíneo para 750 μ L de TRIzol[®] *LS Reagent* (Life Technologies™). Logo após foram incubados por 5 min à temperatura ambiente. Após esta etapa foram adicionados 200 μ L de clorofórmio. Os tubos foram agitados em *vortex* durante 15 s e incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida foram centrifugados a 4000xg por 45 min a 2°C. A camada superior (sobrenadante) foi recuperada em alíquotas de 500 μ L que foram transferidas para um novo tubo de 1,5 mL onde foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico a -20°C. Os microtubos foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 10 min e centrifugado a 4000xg por 30 min a 2°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 1000 μ L de etanol 75% (em água tratada com DEPC). A amostra foi agitada em *vortex* e centrifugada a 4000xg por 15 min a 2°C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 30 min para permitir a secagem das amostras. Para redissolver o RNA total, os microtubos receberam um volume de 100 μ L de água Milli-Q livre de RNase (tratada com DEPC) e finalmente incubado por 60 min a 57°C com o objetivo de inativar traços de RNase. As amostras de RNA total foram acondicionadas a -20°C até o momento de serem utilizadas.

4.6 Transcrição Reversa

O RNA total foi utilizado para a síntese da fita de cDNA, a qual foi realizada utilizando-se KCl 75 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), MgCl₂ 3 mM, DTT 2,5 mM, dNTPs 1 mM, 20 U de MLV-RT (Gibco BRL Life Technologies, USA), 8 U de Inibidor RNase (Invitrogen), 2,0 μ M de oligonucleotídeos antisense desenhados a partir da região 5'NCR (5' - TCGCAAGCACCTATCAGGCAG - 3') (LUNGE *et al.*, 1999) e 3 μ L de RNA extraído. A síntese de cDNA

foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradiente) a 37°C por 50 min de incubação, seguida respectivamente por um aquecimento a 95°C durante 5 min e resfriamento a 5°C durante 5 min.

Várias temperaturas e tempos de incubação para a transcrição reversa em cDNA foram testados: 37°C durante 30 minutos; 42°C por 30 minutos e finalmente a que apresentou resultado satisfatório, de incubação de 37°C por 50 minutos, seguida de uma inativação da enzima a 99°C por 5 minutos e mantida por 5 minutos a 5°C.

Os produtos da RT (10 µL) serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas para um volume final de 50 µL com os seguintes reagentes: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 2,0 µM de oligonucleotídeos senso da região 5'NCR (5'-GAAAGCGYCTAGCCATGGCGTTAG - 3') (LUNGE *et al.*, 1999) e *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot). O processo de ciclagem térmica consistiu de desnaturação inicial por 3 min a 95°C seguida de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de desnaturação por 30s a 94°C, pareamento por 40s a 55°C e extensão por 1 min a 72°C. As amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72°C (extensão final), após o término do último ciclo.

4.7 Visualização e Fotodocumentação de Eletroforese em Gel de Agarose do cDNA Amplificado

Alíquotas contendo 9 µL de cDNA amplificado e 1 µL de tampão de corrida 10X (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol ; 40% de sacarose) em água em 1,0 L de tampão de corrida TBE 1X (10,8g de Tris base; 5,5g de ácido bórico; 4 mL de EDTA a 0,5 M; 1000 mL de água destilada). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de

etídio $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o qual foi submetido à uma corrente elétrica de $5,0 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ por 1 h. Os produtos de PCR foram visualizados em Transiluminador UV para detecção de presença de fragmentos de bandas de aproximadamente 325pb. Essa etapa inclui um padrão de peso molecular de 100pb (Cenbiot, RS) para comparações com o produto da amplificação do cDNA. Logo após, o gel de agarose contendo as amostras foi fotodocumentado em sistema digital Kodak.

4.8 PCR Aninhada

Com o objetivo de aumentar a especificidade da RT-PCR foi realizada uma outra reação em cadeia da polimerase com as mesmas concentrações de reagentes da anterior utilizando um novo conjunto oligonucleotídeos: senso (5' - CCCCTGTGAGGAACTWCTGTCTTCACGC - 3') e antisenso (5' - ACGGTC TACGAGACCTCCCGGGGC - 3'), também desenhados a partir da região não-codificada 5'NCR (LUNGE *et al.*, 1999). As temperaturas e tempos de ciclagem foram mantidos, porém o número de ciclos foi reduzido para 30.

4.9 RFLP/PCR da 5'NCR

Os fragmentos de bandas de aproximadamente 260pb de amostras HCV positivos obtidos através das amplificações por PCR aninhada da região 5'NCR foram fracionados por digestão dupla enzimática com as endonucleases de restrição *HaeIII-RsaI*, *HinfI-BstOI* e digestões simples com *ScrFI* ou *BstUI*.

4.9.1 Genotipagem

Três microtubos de 0,6 mL foram previamente identificados *HaeIII-RsaI*, *HinfI-BstOI* e s/d (sem digerir), respectivamente. Aliquotas de $10,0 \mu\text{L}$ das amostras positivas do HCV foram adicionadas em cada um dos três microtubos, juntamente com $1,0 \mu\text{L}$ do tampão One-Phor-All Plus (100 mM Tris-acetato pH 7,5; (100

mM acetato de magnésio; 500 mM acetato de potássio)). A adição das enzimas de restrição ocorreu da seguinte forma: 5 U de *RsaI* e 5 U de *HaeIII* num microtubo e no outro 5 U de *BstOI* e 5 U de *Hinfl*. O microtubo identificado como s/d, por se tratar de um controle interno da reação a ele não foi adicionado nenhum tipo de endonuclease de restrição. Para as digestões simples, foram utilizadas 10 U de cada uma das enzimas *ScrFI* ou *BstUI* foram adicionadas a 25 μ L do produto amplificado do cDNA juntamente com o tampão da enzima a 10X. Logo após, as amostras foram incubadas por aproximadamente 12 h a 37°C. Em seguida, a digestão foi interrompida pela adição de 0,5 μ L de tampão de corrida 10X (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol ; 40% de sacarose).

4.9.2 Subtipagem

Dois microtubos de 0,6 mL foram previamente identificados como sendo da enzima de restrição *ScrFI* ou *BstUI* e s/d (sem digerir), respectivamente. Alíquotas de 25,0 μ L das amostras positivas do HCV foram adicionadas em cada um dos dois microtubos, juntamente com 1,0 μ L do tampão da enzima 10X (100mM Tris-acetato pH 7,5; (100 mM acetato de magnésio; 500 mM acetato de potássio)). A adição das enzimas de restrição ocorreu da seguinte forma: 5 U de *ScrFI* ou 5 U de *BstUI* num microtubo. O microtubo identificado como s/d, por se tratar de um controle interno da reação a ele não foi adicionado nenhum tipo de endonuclease de restrição. Logo após, as amostras foram incubadas por aproximadamente 12 h a 37°C. Em seguida, a digestão foi interrompida pela adição de 0,5 μ L de tampão de corrida 10X (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol ; 40% de sacarose).

4.10 Eletroforese dos produtos de digestão enzimática

Os padrões eletroforéticos referentes aos diferentes fragmentos de bandas referentes a tipos de HCV distintos, obtidos através das digestões enzimáticas (RFLPs) foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% (SAMBROOK *et al.*, 1989) e corados com nitrato de prata de acordo com o método adaptado descrito por SANGUINETTI *et al.* (1994). Para fins comparativos foi utilizado uma amostra não digerida juntamente com marcadores de peso molecular (100pb e 174pb).

Os géis utilizados para a visualização dos padrões eletroforéticos foram preparados a partir de uma solução de poliacrilamida 8%, de acordo com a lista abaixo:

Foram adicionados em um béquer de 50 mL as soluções de poliacrilamida (14,5g acrilamida, 0,5g bis-acrilamina), o TBE 10X (108g de Tris base; 55g de ácido bórico; EDTA a 0,5 M) e a água milli-Q autoclavada. Logo após, a homogeneização da mistura do gel foram adicionados 125 μ L persulfato de amônio (APS 10%) e 12,5 μ L TEMED 0,01% com o objetivo de catalizar a reação de polimerização da poliacrilamida. Como o auxílio de uma seringa o gel foi imediatamente aplicado entre duas placas de vidro, separadas uma da outra por espaçadores de 0,4 mm de espessura presos com grampos de aço e em seguida foi aplicado na parte superior um pente com 10 dentes, o qual permitiu a formação de cavidades para a aplicação das amostras distintas. Após a polimerização do gel de poliacrilamida 8% (aproximadamente 30 min), o pente foi retirado e o gel foi transferido para uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão de corrida (TBE 1X). As amostras foram aplicadas nas cavidades do gel, como também os marcadores padrões de peso molecular (100pb e 174pb). O aparelho foi ligado a uma fonte elétrica de alta voltagem e as

amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de $5\text{v}\cdot\text{cm}^{-1}$, por 1 h e 20 min.

4.11 Coloração por Nitrato de Prata

Após eletroforese, o gel foi imerso em solução fixadora (EtOH 10%; ácido acético 1,3 mM) durante 5 min sob agitação manual e em seguida esta solução foi removida e reservada. Logo após, o gel foi corado com nitrato de prata 0,2 % em agitação manual constante por 10 min. A solução corante (nitrato de prata 20 mM) foi desprezada e o gel lavado uma vez em água Milli-Q. A solução reveladora (NaOH 750 mM; formaldeído 36 mM) foi colocada cuidadosamente no recipiente onde o gel foi depositado. Nesta etapa, o gel permaneceu em solução durante 10 min sendo sempre agitado lentamente até o aparecimento das bandas e em seguida a solução reveladora foi descartada e o gel foi novamente colocado em solução fixadora por 5 min e finalmente, lavado e mantido por 10 min em água Milli-Q.

4.12 Preservação dos géis e registro fotográfico digital

O gel de poliacrilamida 8% que foi mantido durante 10 min em água milli-Q foi então retirado da água e fotodocumentado sistema digital Kodak e secos para serem arquivados. Este foi colocado entre duas folhas de papel celofane incolor sobre uma placa de vidro, em seguida as bordas foram dobradas lateralmente sobre o lado inferior da placa sempre com bastante cuidado para a eliminação de eventuais bolhas. Logo após, a desidratação do gel ocorreu à temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Após a eliminação completa de umidade, o gel desidratado foi anexado ao livro de registros para consultas posteriores.

A eletroforese dos fragmentos de bandas obtidos através da digestão por endonucleases de restrição produziu mapas eletroforéticos característicos para cada tipo viral, os quais foram

comparados com padrões de restrição obtidos por DAVIDSON *et al* (1995) dos diferentes tipos e subtipos de HCV. Essas comparações foram realizadas levando em consideração o tamanho dos fragmentos de cDNA polimórfico gerados pelos RFLPs já identificados.

5. Resultados e Discussão

Em 104 amostras anti-HCV positivas avaliadas neste trabalho, foram realizados testes para o diagnóstico biomolecular, onde foi possível detectar o HCV-RNA em 73,1% (76/104) indivíduos enquanto que 26,9% (28/104) foram considerados HCV-RNA negativos (Figura 4). Esses dados são coerentes com os descritos na literatura (PATINÕ-SARCINELI *et al.*, 1994), uma vez que mais de 50% dos portadores anti-HCV positivos mantêm a infecção.

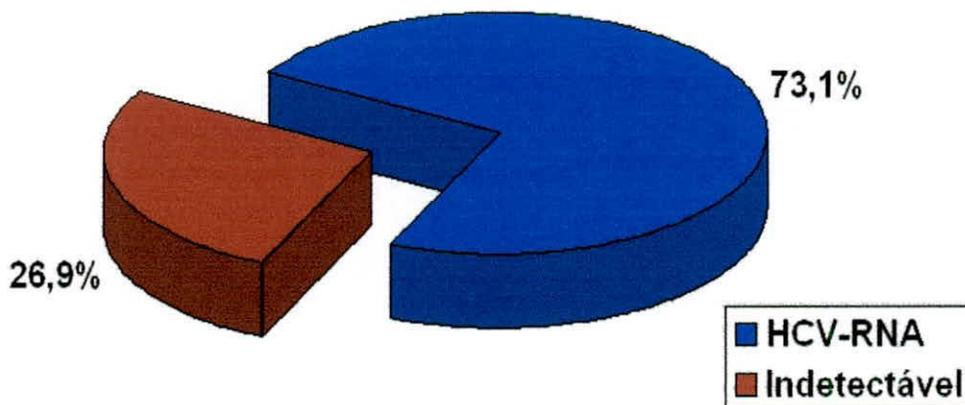


Figura 4. Distribuição das amostras processadas de plasma sanguíneo de 104 pacientes anti-HCV (n=104).

A Figura 5 mostra um algoritmo dos resultados verificados neste estudo, levando-se em consideração o número de amostras HCV-RNA negativas e positivas dos pacientes participantes.

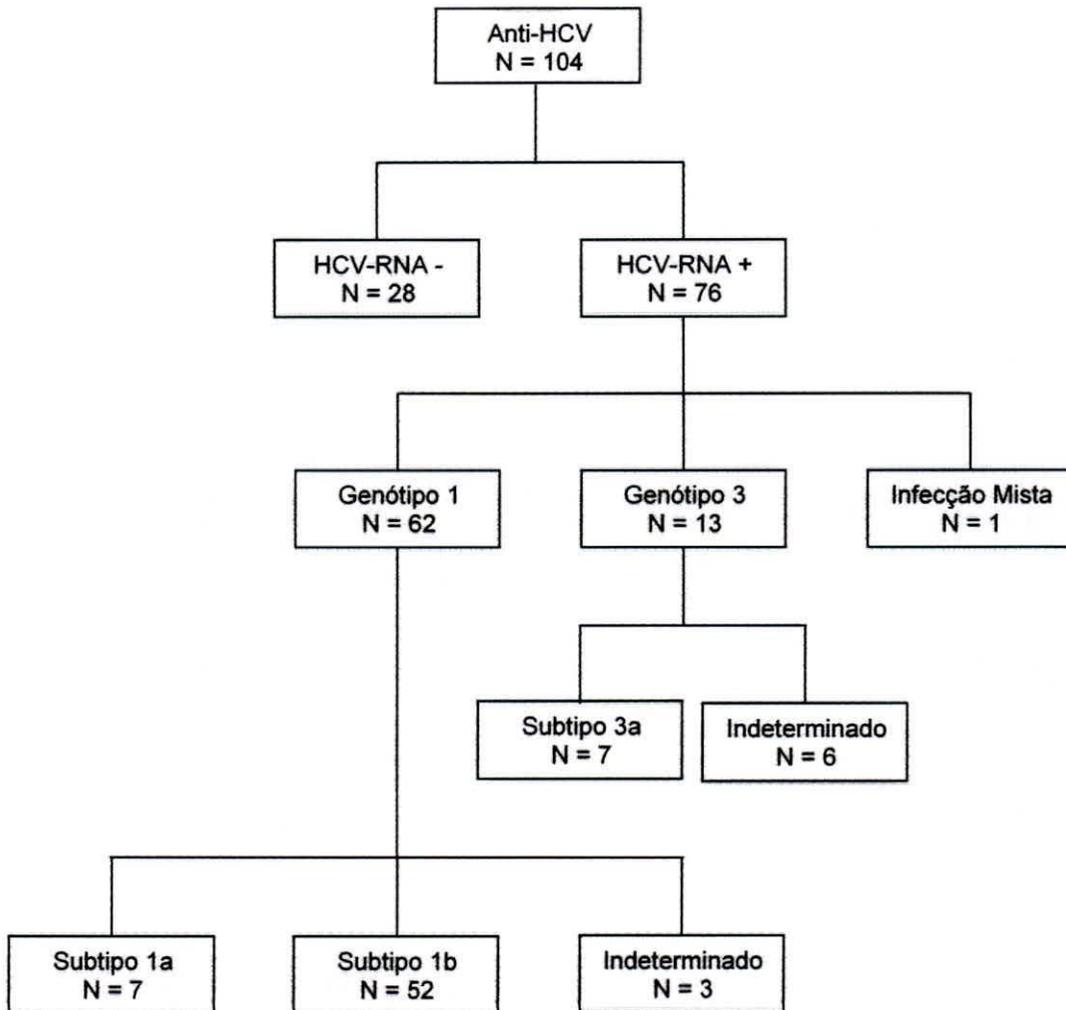


Figura 5. Algoritmo dos resultados das 104 amostras verificadas neste estudo, considerando-se: número de amostras HCV-RNA negativas; e número de amostras HCV-RNA positivas.

5.1 Casuísta

Este estudo preliminar da prevalência de HCV-RNA em plasma sanguíneo de portadores anti-HCV positivos contou com participação de indivíduos, tanto do sexo masculino quanto do feminino e todos cumpriram os critérios de inclusão, de acordo com o item 4.3.1.

A Figura 6 mostra amplo predomínio do sexo masculino, 71,1% (54/76) em relação ao sexo feminino, 28,9% (22/76) em amostras de pacientes HCV-RNA positivos.

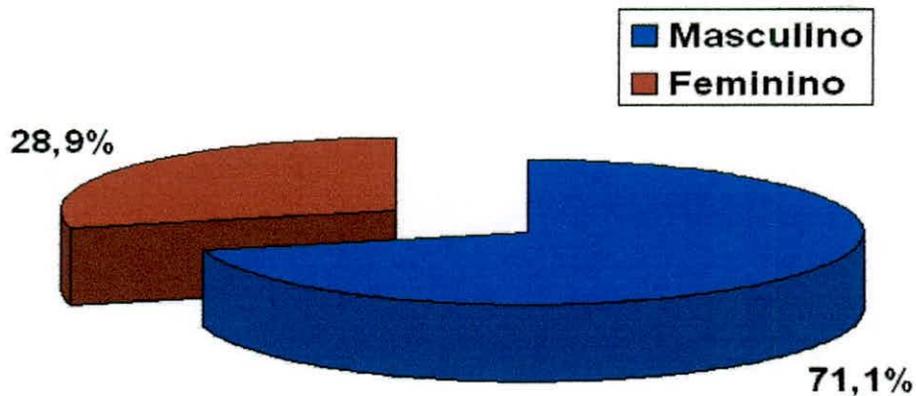


Figura 6. Percentual de distribuição por sexo de pacientes anti-HCV positivos com HCV-RNA detectável (n = 76).

Neste trabalho, cerca de 72 indivíduos, de um total de 76 indivíduos HCV-RNA positivos estavam entre 36 e 70 anos. A média de idade para ambos sexos foi de 49,7 anos (Tabela 1). Como a maioria das pessoas infectadas com o HCV tem de 30 a 49 anos, o número de mortes atribuível a esta doença do fígado deverá aumentar de forma alarmante nos próximos 10 anos.

Outro fator preditivo de evolução para doença hepática grave é o uso de álcool, mesmo em consumo moderado (CDC, 1998; POYNARD *et al.*, 1997; KOFF & DIENSTANG *et al.*, 1995; VENTO *et al.*, 1999). O álcool parece aumentar a replicação viral ou incrementar a susceptibilidade da célula à infecção viral (VENTO *et al.*, 1999). Pacientes com doença hepática desencadeada pelo álcool, tem progressão mais rápida da infecção hepática; entre estes os que apresentam cirrose têm alto risco de progressão para HCC (VENTO *et al.*, 1999). Pacientes sem causa de transmissão definida (casos esporádicos) de infecção pelo HCV, têm alto risco de má evolução, possivelmente pela interação com fatores como a longa duração da infecção e idade mais avançada no momento da descoberta da infecção (PARANÁ *et al.*, 2000).

Tabela 1. Distribuição do número, percentual por faixas e média de pacientes anti-HCV com HCV-RNA detectáveis segundo a faixa etária (n = 76).

Faixas etárias	N° de pacientes por faixas	Percentual do n° pacientes por faixas
0 - 35	4	5,26%
36 - 70	72	94,74%
Total	76	100%

A prevalência mundial de HCV é de 0,2% a 2% em doadores de sangue, e de 80% em usuários de drogas intravenosas. Uma

grande porcentagem de casos de HCV é devida à transmissão por transfusão e outros meios parenterais de compartilhamento de agulhas, exposição ocupacional a sangue e hemodiálise. Entretanto, metade das infecções por HCV possui transmissão desconhecida (ALTER *et al.*, 1999; PARANÁ *et al.*, 2000).

PATINÕ-SARCINELI *et al.* (1994), quando estudaram a prevalência e os fatores de risco para os anticorpos anti-HVC em doadores de sangue voluntários no Brasil, observaram que a soropositividade estava fortemente associada ao sexo masculino, à etnia não-branca e a idades mais avançadas, o que provavelmente reflete um longo tempo de exposição à infecção e baixas condições socioeconômicas. A obtenção, pelos autores, de resultados negativos em 38 amostras (60,3%) e de resultado indeterminado em dez amostras (15,8%) que apresentaram valores baixos de DO nos testes de triagem, quando analisadas pelo teste confirmatório RIBA II, sugerem a ocorrência de resultados falso-positivos, comprovando a necessidade da realização de testes confirmatórios em todas as amostras que apresentarem resultado reagente nos testes sorológicos de triagem.

5.2 Isolamento de RNA viral

Segundo o protocolo TRIzol a temperatura recomendada para o isolamento de RNA é 4°C. Por este fato, inicialmente, as extrações do HCV-RNA foram realizadas utilizando uma microcentrífuga para microtubos a 8.000 xg, dentro de um refrigerador a 4°C. Vários testes foram realizados com esse artifício, mas não foi detectada a presença de HCV-RNA nas amostras anti-HCV positivas. Para este fato, foram consideradas várias hipóteses, como, se a amostra estava em boas condições, se era HCV-RNA positivo, a metodologia empregada para transcrição reversa, a PCR do cDNA e se a PCR aninhada estava funcionando corretamente.

Diante dos resultados, obtidos nas primeiras tentativas para o isolamento de RNA, foram feitas adaptações em uma centrífuga refrigerada Eppendorf (modelo 5810R) com a utilização de placas de isopor de dimensões semelhantes às placas de sequenciamento. Com essas alterações foi possível a detecção do HCV-RNA à temperatura de 4°C. Outros testes foram realizados com as temperaturas de 3°C e 2°C, respectivamente. Melhores resultados foram obtidos a 2°C.

Técnicas de biologia molecular, para detecção direta do HCV-RNA, embora menos acessíveis, complexas e onerosas, são de fundamental importância para a identificação dos tipos e subtipos virais e se tornaram necessárias para confirmação diagnóstica (CONTE, 2000). Da mesma maneira, a necessidade do isolamento de RNA não-degradado é essencial para a construção de moléculas de cDNA (ERLICH & GREENBERG, 1994; SAMBROOK, 1989).

O protocolo adaptado do TRIzol LS *Reagent* foi eficiente para o isolamento do RNA viral, portanto, recomenda a utilização da centrífuga refrigerada com rotação de 12.000 xg. Entretanto, como a rotação máxima da centrífuga utilizada neste trabalho é de 4.000 xg, adaptou-se o protocolo aumentando em 3 vezes o tempo de centrifugação.

Os resultados negativos de HCV-RNA no plasma sanguíneo de 28 amostras analisadas podem ser devido à baixa carga viral e/ou a persistência do vírus em outros sítios de replicação, como medula óssea, células mononucleares do sangue periférico. Deve-se considerar também que reagentes empregados na triagem sorológica da Hepatite C exibem alta sensibilidade, podendo resultar em falso-positivos (SCHMIDT *et al.*, 1997; ZEHENDER *et al.*, 1997). É possível, também, que estas amostras tenham apresentado um número de cópias inferior a 1.000 cópias virais por mL, número necessário para a detecção por RT-PCR (DAVIS *et al.*, 2003).

5.3 RT-PCR

A transcrição reversa foi realizada em RNA total proveniente de plasma sanguíneo de pacientes portadores de HCV, com oligonucleotídeos desenhados a partir da região 5' NCR, tendo sido observada alta especificidade para a região do genoma viral. A temperatura de incubação de 37°C por 50 minutos, seguida de uma inativação da enzima a 99°C por 5 minutos e 5 minutos a 5°C, foram eficientes para a produção de cDNA a partir de RNA.

A PCR, realizada logo após o término da transcrição reversa, foi eficiente para amplificação do cDNA, possibilitando o diagnóstico da infecção pelo vírus da Hepatite C. Por essa técnica foi possível detectar, através da eletroforese em gel de agarose 2%, seguido da visualização por UV, fragmentos de bandas de DNA de aproximadamente 325pb.

Vinte e oito amostras tiveram resultados negativos, tanto na primeira PCR quanto na PCR aninhada, demonstrando que as técnicas de PCR utilizadas apresentaram alta especificidade e sensibilidade para a detecção da presença do vírus da hepatite C. A PCR pôde detectar o RNA no soro sanguíneo de pacientes infectados em apenas 1 ou 2 semanas após a exposição ao vírus (Figura 6).

Vinte e oito amostras foram negativas para a PCR utilizando o cDNA como molde para a reação. Essas tiveram seus RNAs novamente isolados e a partir deles foram efetuadas novas reações de transcrição reversa e de PCR para a confirmação dos resultados.

De acordo com TOYO *et al.* (2001), se a PCR for por duas vezes negativa, o resultado deve ser questionado e o teste sorológico deve ser repetido, pois pode se tratar um resultado de anti-HCV falso-positivo.

Com o objetivo de dar maior segurança aos resultados das amostras HCV-RNA positivas foram realizadas duas ampliações para cada amostra. Além disso, para cada reação de transcrição reversa, PCR e PCR aninhada foi utilizado um controle positivo (amostra de HCV-RNA positiva) e um controle negativo (sem a fita molde), visando indicar a presença de contaminação das reações com cDNA exógeno.

5.4 PCR Aninhada

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade, a especificidade e a eficiência da reação, o produto de cDNA amplificado foi submetido a uma nova amplificação utilizando um conjunto de oligonucleotídeos capazes de amplificar um fragmento interno do produto de cDNA de 260pb utilizando como molde o segmento de 325pb.

Vários testes foram realizados para PCR aninhada levando em consideração temperatura de pareamento e quantidade de produto de PCR.

Após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio da RT-PCR, foi possível visualizar em transiluminador UV fragmentos de bandas de aproximadamente 325 pb. A Figura 7 mostra fragmentos de aproximadamente 260pb, obtidos da PCR aninhada, de três amostras de diferentes indivíduos, utilizando para fins comparativos, um marcador de peso molecular de 100pb, além de um controle negativo para a reação.

A região 5' NCR do genoma do HCV tem sido a mais utilizada nas reações de PCR aninhado. O conjunto de oligonucleotídeos utilizado na metodologia foi obtido através do trabalho de KRUG *et al.* (1996).

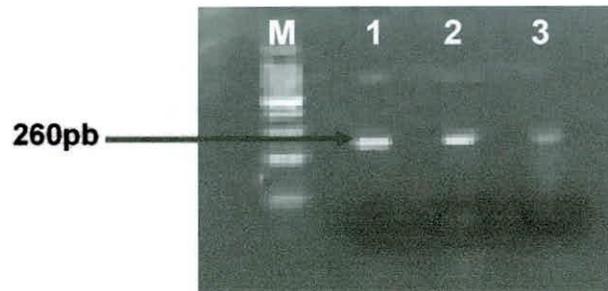


Figura 7. Perfil eletroforético de três amostras HCV-RNA positivas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos da PCR aninhada do vírus da hepatite C. M=marcador 100pb; 1 a 3=HCV positivo (banda de aproximadamente 260pb).

A PCR aninhada tem sido recomendada por várias razões. Acredita-se que ela melhora a sensibilidade do teste. Além de diminuir os altos custos com a utilização de sondas radioativas, também reduz o tempo de reação e elimina o risco potencial do biólogo molecular na utilização de materiais radioativos (ASLANZADEH *et al.*, 2000).

5.5 Genotipagem do HCV

Resultados obtidos neste estudo mostraram a ocorrência de 2 genótipos no Estado de Alagoas: 1 e 3. De 76 amostras analisadas, 62/76 foram reativas para o genótipo 1 (81,6%), 13/76 genótipo 3 (17,1%), 1/76 (1,3%) 1a/3a infecção mista. Não foram encontradas amostras do genótipo 2 (Figura 8).

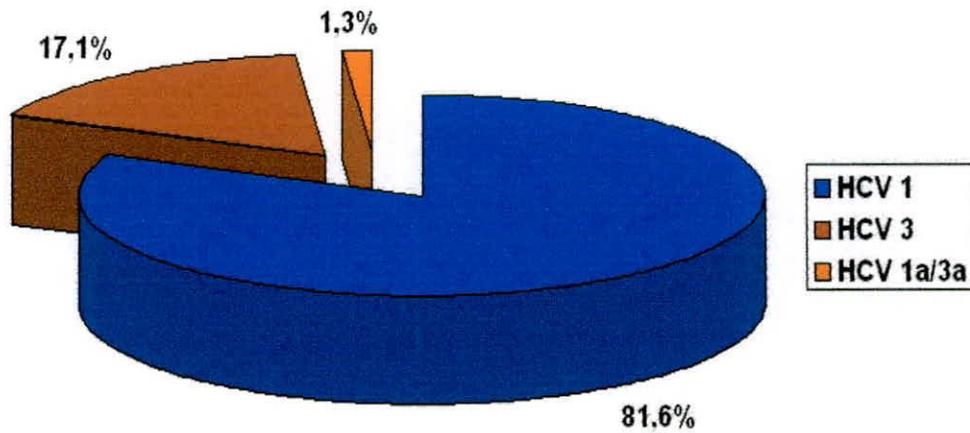


Figura 8. Distribuição da frequência de genótipos do HCV após digestão dupla com as endonucleases de restrição *HaellI-RsaI* e *Hinfl-BstOI* entre os casos HCV-RNA positivos (n=76).

Neste estudo, os resultados obtidos demonstraram que o genótipo 1 é o mais prevalente no Estado de Alagoas. Além disso, o estudo revelou alto índice do genótipo 1 em relação a outros estudos realizados em diferentes regiões do país, em contraste com uma baixa ocorrência do genótipo 3. Fato importante verificado também foi a inexistência de outros genótipos detectados no Nordeste do Brasil, como o genótipo 2, particularmente em Salvador.

Na figura 9 está destacado o perfil dos genótipos de HCV obtidos após digestão dupla com as endonucleases de restrição *BstI/Hinfl*.

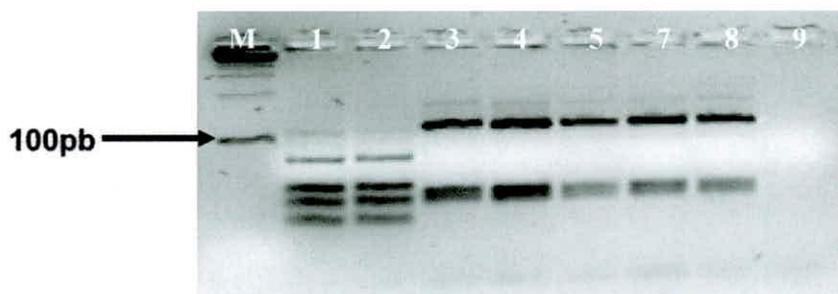


Figura 9. Padrões de restrição dos produtos da amplificação RT-PCR da região 5'UTR do HCV obtidos após digestão dupla com endonucleases de restrição *BstI/HinfI*. Eletroforese em gel MetaPhor 4% com tampão de corrida TAE 1X. M=marcador 100pb; 1 e 2=genótipo 1(bandas de aproximadamente 94, 63, 53 e 41 pb); e 3 a 8=genótipo 3 (bandas de aproximadamente 140, 57 e 53pb); 9=controle negativo.

YOSHIDA *et al.* (1999) estudaram 59 pacientes com hepatite C crônica na cidade do Rio de Janeiro, encontrando uma prevalência de 85,7% para o genótipo 1. Neste estudo preliminar os valores percentuais encontrado nos portadores de HCV do HU e LACEN estão de acordo com esse estudo.

De acordo com KRUG *et al.* (1996) o genótipo mais freqüente no Sul do Brasil é o genótipo 1, apesar deste estudo ter revelado um índice mais baixo para esse genótipo em relação a outros estudos realizados no país. Os autores detectaram, também, um alto índice do genótipo 3. Esta diferença, segundo KRUG *et al.* (1996), pode ser devida ao fato de que os trabalhos realizados na região Sudeste analisaram grupos epidemiológicos restritos (pacientes hemofílicos com ALTs alteradas e pacientes com doença do fígado).

MARTINELLE *et al.* (2000), analisaram plasma sangüíneo de 90 pacientes do Estado de São Paulo por RFLPs. Amplicons gerados a partir da região 5'NCR após digestão dupla com as endonucleases de restrição *HaeIII/RsaI* e *BstI/HinfI* produziram mapas coerentes aos genótipos 1, 2 e em um percentual muito baixo, o genótipo 5. Este último, geralmente encontrado na África do Sul, Egito e sudeste asiático.

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

5.6 Subtipagem do HCV

O subtipo 1b foi o mais freqüente dentre o genótipo 1 com um percentual de 83,8% (52/62), o subtipo 1a apresentou um índice de 11,3% (7/62) e 4,8% (3/62) do genótipo 1 que não foram tipados (Figura 10).

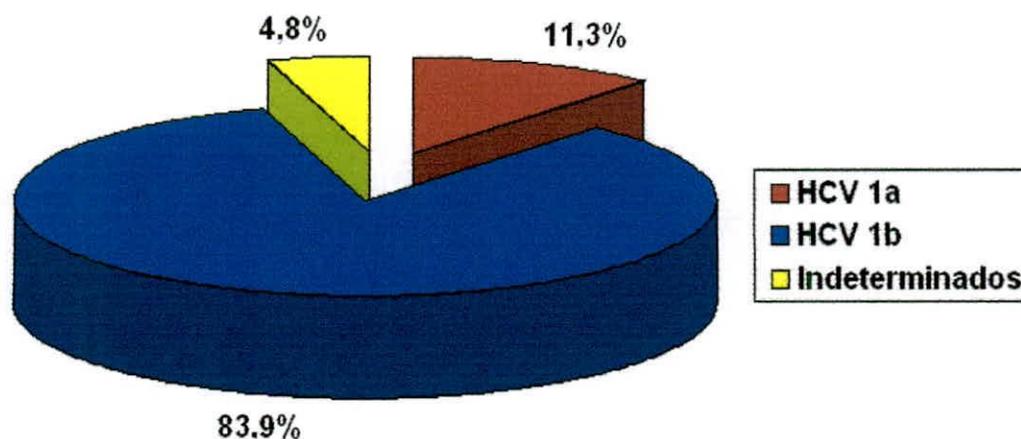


Figura 10. Distribuição da freqüência de subtipos do genótipo 1 em amostras de HCV-RNA positivos após digestão simples com a endonuclease de restrição *BstUI* (n=62).

Com relação ao genótipo 3, o subtipo 3a teve um percentual de 53,8% (7/13). Devido a especificidade dos oligonucleotídeos ao subtipo 3a, o restante das amostras 46,2% (6/13) do genótipo 3 ainda não foi identificada. É possível que pertençam a outros subtipos do genótipo 3 (Figura 11).

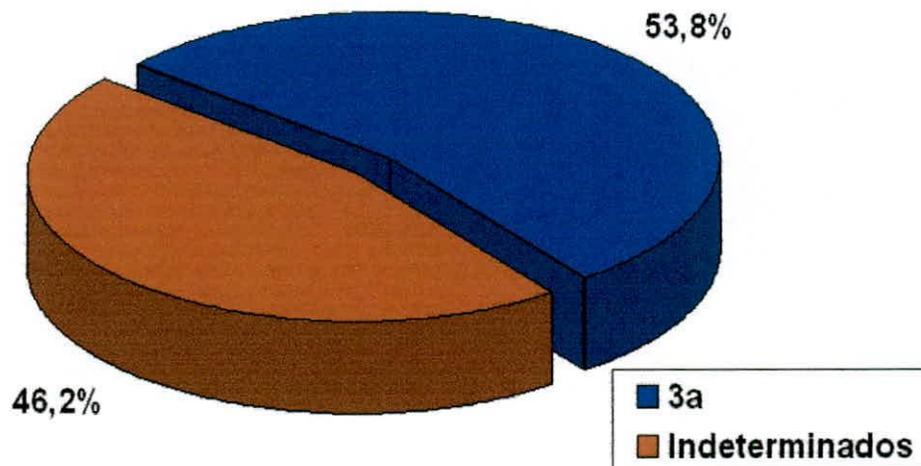


Figura 11. Distribuição da frequência de subtipos do genótipo 3 em amostras de HCV-RNA positivas após digestão simples com a enzimas de restrição *ScrFI* (n=13).

Os resultados encontrados neste estudo, associados ao alto índice de pacientes com o subtipo 1b e 1a e 3a em Alagoas, significam uma perspectiva preocupante em relação ao prognóstico clínico e ao tratamento dos pacientes portadores destes genótipos (Figura 12).

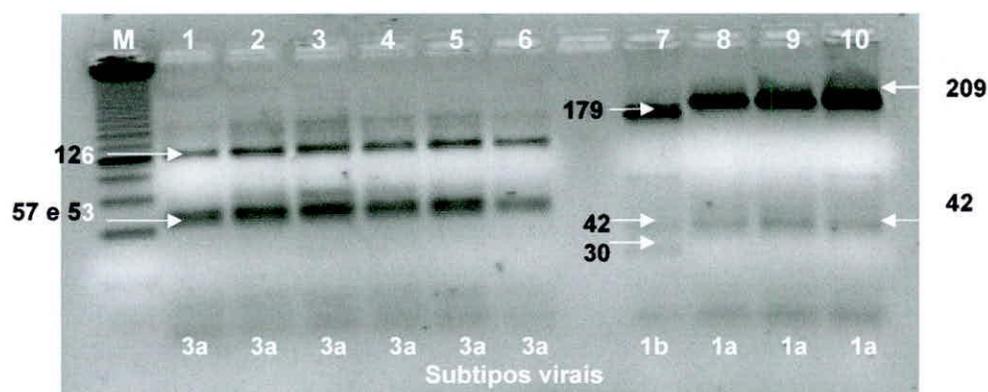


Figura 12. Padrões de restrição dos produtos da amplificação RT-PCR da região 5'NCR do HCV de diferentes indivíduos obtidos após digestão simples com endonucleases de restrição *ScrFI* (1-6) e *BstI* (7-10). Eletroforese em gel MetaPhor 4% com tampão de corrida TAE 1X. M=Marcador de 100pb.

Segundo ZEIN (2000), o subtipo 1b é o mais agressivo de todos os genótipos e o que apresenta baixa resposta sustentada ao tratamento com Interferon. Os genótipos 2 e 3 respondem melhor ao tratamento com o antiviral.

Vários estudos têm demonstrado uma correlação entre os resultados terapêuticos e a seqüência de um aminoácido de uma pequena região da proteína não estrutural 5A (NS5A) do HCV. Isto tem sugerido que essa região expressa a região determinante da sensibilidade ao IFN (ISDR), podendo mediar a resistência ao IFN pela interação direta com uma ou duas proteínas celulares associadas com a resposta virológica sustentada ao IFN (WEBSTER *et al.*, 2000). Os resultados encontrados neste estudo indicaram que os subtipos 1b de HCV são importantes na

determinação do tempo de tratamento e conseqüentemente, da resposta que o indivíduo apresentará a esse tratamento.

Esses dados são preocupantes se levarmos em consideração o alto índice de pacientes portadores do subtipo 1b do HCV, encontrado no nosso trabalho, no Estado de Alagoas.

LUNGE *et al.* (1999), encontraram padrões de bandas típicas para os genótipos 1 (1a e 1b), 2 e 3. Os mesmos genótipos foram encontrados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil por KRUG *et al.* (1999), OLIVEIRA *et al.* (1999) e BASSIT *et al.* (1999). Infecção mista foi verificada em 8 amostras, 6 no Norte e 2 no Nordeste. Um padrão não descrito para um genótipo foi encontrado e definido como indeterminado. No estudo foi determinada a prevalência dos subtipos 1a e 1b. O subtipo 1b foi o mais prevalente 60% na região Norte e 71 % na região Nordeste (KRUG *et al.*, 1999).

BARBARO *et al.* (1999) verificaram que os pacientes de HCV com genótipos 1b freqüentemente apresentavam alterações ultraestruturais das mitocôndrias com depleção do mtDNA, podendo comprometer o processo de fosforilização oxidativa. Sendo assim, a produção aumentada de radicais livres nos pacientes com genótipos 1b poderia atuar de modo negativo na evolução da doença hepática, aumentando o efeito citopático do vírus C da hepatite. Nesses pacientes, haveria, portanto, aumento de hiperoxidação, com conseqüente resistência à ação dos interferons e pior evolução da doença hepática. A ser confirmado este fato, novas estratégias terapêuticas poderão vir a ser desenvolvidas no combate a essa doença.

A persistência da infecção pelo vírus da hepatite C é um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer hepático. A persistência da infecção levaria a uma exposição descontrolada a fatores que regulam a transcrição de genes associados à proliferação celular, como é o caso do fator de transcrição Stat 3, cujo acúmulo na forma fosforilada está associado ao desenvolvimento de HCC.

No Brasil, poucos estudos de genotipagem de HCV foram realizados. BASSIT & SAÉS-ALQUÉSAR (1999) estudaram 54 doadores de sangue na cidade de São Paulo utilizando a técnica de LIPA, obtendo como resultado as prevalências de 59% para o genótipo 1, 6% para o genótipo 2 e 35% para o genótipo 3.

De acordo com KRUG *et al.* (1996) a incidência do genótipo 1 no Brasil é provavelmente baixa, devido à falta de estudos que estabeleçam a real prevalência dos genótipos no país, principalmente nas regiões do Nordeste e Norte, onde existem poucos dados publicados. Entretanto, segundo os resultados obtidos para Alagoas neste trabalho, a suposição dos autores não reflete a realidade encontrada no Estado.

PARANÁ *et al.* (2000), detectaram o subtipo 1a em 75 pacientes (32%), 1b em 72 (31%), 3a em 61 (26%), 2a em 14 (6%), 5 (2,5%) tinham infecção mista e 5 (2,5%) tiveram o genótipo indeterminado. Os autores também observaram que pacientes com genótipo 1 apresentavam média de idade mais alta e nenhum fator de risco peculiar esteve associado a um genótipo específico. O genótipo 1 predominou amplamente no nordeste do Brasil, seguido pelo genótipo 3. Nesta população o genótipo 3 não parece estar relacionado ao uso de drogas venosas, em contraste ao que foi reportado nos estudos europeus. Embora 80% da população de Salvador seja composta por população negra ou miscigenada, nenhum genótipo africano foi identificado, o que pode significar que o vírus da hepatite C foi introduzido nesta região via imigração européia. Este estudo demonstra algumas peculiaridades da epidemiologia do vírus da hepatite C no Brasil e fortemente sugere que sua introdução nessa região esteve relacionada à imigração européia e não à africana. O nosso estudo não está de acordo com o trabalho de PARANÁ *et al.* (2000), pois encontramos em termos percentuais, um número 8 vezes maior para o subtipo 1b em comparação com o subtipo 1a.

Estudos associam o subtipo 1b com evolução mais freqüente para cirrose e hepatocarcinoma que não são confirmados quando afastados elementos como idade, duração da infecção ou forma de aquisição do HCV, ou seja, o genótipo 1b associava-se com pacientes mais idosos, com muito tempo de infecção ou nos pacientes com doença adquirida por via transfusional. Estudos demonstram que a distribuição dos diferentes genótipos pode ser semelhante em pacientes com enzimas séricas normais, comparada àqueles com enzimas aumentadas.

Estes trabalhos têm resultados concordantes com os estudos de SILINI e FRETZ (1999) que demonstraram alta prevalência do tipo 1 em amostras de pacientes com hepatite causada pelo vírus C.

Três amostras identificadas como genótipo 1 e seis do genótipo 3 não puderam ser subtipadas pelo método utilizado neste trabalho. A hipótese provável para este fato está na capacidade de mutação do HCV, pois dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ter variações do vírus, que comumente são denominadas de *quasispecies*. Estas ocorrem devido à replicação imperfeita do HCV, através de pequenas, mas constantes, mutações. Pela técnica de RFLPs as enzimas de restrição reconhecem seqüências de 4 a 6 nucleotídeos e se por acaso ocorrer uma pequena mutação em algum sítio de restrição, então a enzima não reconhece o sítio e deixa de clivar nesta região de seqüência específica.

Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo subtipo 1b não foram ainda elucidados. Parece que a existência de *quasispecies* e a grande capacidade mutagênica do vírus propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro.

A documentação e análises de dados obtidos dos ensaios de amplificação e digestão dos cDNA do HCV, conduziram a uma subsequente identificação preliminar dos genótipos circulantes em

Alagoas. Em adição, as informações obtidas pela avaliação da variabilidade genética da população do HCV também resultarão na geração de dados estatísticos referentes à ocorrência dos tipos virais considerados resistentes ao interferon peguilado. Isso contribuirá para o desenvolvimento de mecanismos que têm como objetivo um controle epidemiológico mais eficiente em subáreas geográficas específicas, e, conseqüentemente, para a redução da mortalidade entre homens e mulheres potencialmente candidatos à cirrose hepática e ao HCC.

As Portarias SAS/MS nº 17, de 22 de janeiro de 1997 e GM/MS nº 1.464, de 22 de dezembro de 1999, incluíram os antivirais Interferon e Ribavirina na Tabela do Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde SIA/SUS, considerando a necessidade da realização do exame de genotipagem para a determinação do tipo genético do vírus causador da hepatite, o que estabelece o esquema terapêutico a ser utilizado no tratamento desta doença.

Em junho de 2000 o Ministro de Estado da Saúde, sanciona a Portaria N° 639 que aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hepatite Viral Crônica Tipo C (HCV), considerando a prevalência da hepatite viral crônica tipo C na população brasileira e a gravidade de sua evolução clínica e diante da necessidade de custear o tratamento da infecção. Esse protocolo contém critérios de diagnóstico e tratamento, observando ética e tecnicamente a prescrição médica. Além de regulamentar as indicações e seus esquemas terapêuticos e estabeleça mecanismos de acompanhamento de uso e de avaliação de resultados, garantindo assim a prescrição segura e eficaz. O ponto importante na Portaria N° 639 é o estabelecimento do tempo do tratamento da infecção de acordo com o genótipo do portador do HCV. Para o pacientes com genótipo 1 e para os demais genótipos tratamento de 12 meses e 6 meses respectivamente, com uma única dose semanal de Interferon.

Em 2003, a Portaria 1.407 tornou obrigatória a incorporação da técnica de NAT (Teste de Ácidos Nucléicos), na triagem sorológica dos doadores de sangue para o HIV (vírus da imunodeficiência adquirida) e HCV, visando reduzir o risco de transmissão desses vírus.

6. Conclusões

- A metodologia empregada neste estudo foi eficiente para a extração de RNA, detecção do HCV-RNA, bem como para a genotipagem e subtipagem de HCV.
- A positividade do HCV-RNA em soro de portadores do anticorpo anti-HCV selecionados Hospital Dia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e do Laboratório Central de Alagoas (LACEN) foi de 73,1%.
- Entre as amostras RNA-HCV positivas, o genótipo 1 foi o mais prevalente, seguido pelo tipo 3.
- O subtipo 1b foi mais freqüente que o 1a.
- Não foi detectado o genótipo 2 nas amostras analisadas.
- A prevalência do subtipo 1b em Alagoas é maior do que tem sido descrito para a Bahia, Sudeste e Sul do país.

7. Perspectivas

7.1 Sequenciamento Automático de HCV

Oligonucleotídeos específicos para a amplificação parcial da região 5'NCR (260 pb) de diferentes HCV serão utilizados. Os produtos de PCR serão purificados utilizando o kit WizardTM Preps DNA purification (Promega Corp., Madison, WI).

As sequências do cDNA viral serão determinadas através de um sequenciador automático de DNA MegaBace 1000 do Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica – GEMPRO/CECA da Universidade Federal de Alagoas -UFAL.

7.2 Diagnóstico Eletrônico das Seqüências de HCV

As seqüências geradas dos diferentes HCV serão submetidas ao banco de dados de domínio público, o NCBI (National Center for Biotechnology - [www. ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), utilizando o algoritmo heurístico BLAST que busca alinhamentos ótimos. Tal procedimento irá permitir a identificação precisa dos genótipos e subtipos desconhecidos de HCV das amostras seqüenciadas.

7.3 Análise filogenética dos genótipos de HCV

Árvores parsimônicas serão construídas a partir da comparação de seqüências homólogas alinhadas do cDNA dos diferentes tipos de HCV, utilizando-se o programa PAUP 3.1.1. (SWOFFORD, 1993), do Sistema Apple McIntosh. Os valores de *bootstrap*, o suporte interno de cada ramo, serão computados com 500 replicações. A polaridade

dos caracteres será determinada baseada em grupos irmãos (*outgroups*) designados.

Fenogramas serão produzidos mediante utilização do programa MEGA 1.01 (KUMAR *et al.*, 1993) com o objetivo de determinar a similaridade (distância genética) entre as seqüências comparadas. As árvores fenéticas serão construídas utilizando os métodos UPGMA e NJ (*neighbor-joining*), enquanto que o modelo de distância a ser utilizado será o de Kimura's *two-parameter* (LI & GRAUR, 1991). O *bootstrap* será efetuado com 500 replicações.

A partir da análise filogenética será possível estabelecer a relação genética entre os genótipos de HCV, como também identificar genótipos e subtipos novos ou indeterminados, de acordo com os agrupamentos gerados.

8. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, R.W.; RIBEIRO, M.O.; CARVALHEIRA, P.C.; ANDRADE, E.F.; CORREIA, E.M.; SOUZA, S.C.; LEITE, F.M.S.; NOVAES, L.T.; TEIXEIRA, M.H.; FELLOWS, I.B.; MORTENSEN, C.; COBO, E. Genotipagem do vírus da hepatite C: o sequenciamento direto e a comparação com seqüências padrão como método para determinação do genótipo e do subtipo. **NewsLab**. (www.newslab.com.br/genotipagem.htm). Acesso em 15 de janeiro 2002.

ALTER, M.J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **Clinical Liver Diseases**, v. 1, p. 559-568. 1999.

ASLANZADEH, J.; PADILLA, B.B.; SHANLEY, J.D. Evaluation of PCR and nested PCR for laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, p. 173-178. 2000.

BARBARO, G; DI LORENZO, G.; ASTI, A.; RIBERSANI, M.; BELLONI, G. GRISORIO, B; FILICE, G; BARBARINI, G. Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C: ultrastructural and biochemical findings. **American Journal Gastroenterology**, v. 94, p. 2198-2205. 1999.

BARCELLOS, C.S.; ALMEIDA, F., ABREU, L.A.S.; BRAGA, M.A; VALEIRO, P.P.; DE BRITO, P.H.T.; FERREIRA, R.P. Carcinogênese viral: Relação do vírus da hepatite C com o carcinoma hepatocelular. Disponível em <http://www.medstudents.com.br/original/revisão/hcv/hcv.htm>. Acesso em 01 de novembro de 2002.

BARRY, T; POWELL, R.; GANNON, F. A general method to generate DNA probes for microorganisms. **BioTechnology**, v. 8, p. 223-236. 1990.

BASSIT, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; DA SILVA, L.C; TAKEI, K.; VILLACA, P.; DAVID-NETO, E.; CHAMONE, D.; SAEZ-ALQUEZAR, A. Genotype distributions of hepatitis C vírus in São Paulo, Brazil: rare subtype found. **Hepatology**, v. 29, p. 994-995 (Letter). 1999.

BASSIT, L.; SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; DA SILVA, L.C. Chronic hepatitis C virus infections in brazilian patients: association with genotypes, clinical parameters and response to long term alpha interferon therapy. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 3, p. 183-189. 1999.

BDOUR, S. hepatitis C vírus infection in Jordanian haemodialysis units: serological diagnosis and genotyping. **Journal Medical of Microbiology**, v. 51, p. 700-704. 2002.

BELD. M.; HABIBUW, M.R.; REBERS, S.P.; REESINK, H.W. Evaluation of automated RNA-extraction technology and a qualitative HCV assay for sensitivity and detection of HCV RNA in pool-screening systems. **Transfusion**, v. 40, p. 575-579. 2000.

BJØRO K, BELL H, MYRVANG B, RAKNERUD N, SANDVEI P, STØRSETH S, RITLAND S, LUND-TØNNESEN S, BUCHER A, HELLUM KB. Effect of Interferon- α induction therapy on genotype 2b/3a and low viral load hepatitis C virus infection: a randomized multicentre study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 3, p.344-349. 2002.

BRANDÃO, M.A.B.; FUCHS, S.C.; SILVA, M.A.A.; EMER, L.F. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana Salud Publica**, v. 9, n. 3, p. 161-168. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 639 de 05 de fevereiro de 2002. institui, no âmbito do SUS, o Programa Nacional para a Prevenção e o Controle das Hepatites Virais. **Diário Oficial da União** de 05 de fevereiro de 2002; Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/639_02.htm . Acesso em 15 de janeiro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 1376 de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria 721/GM de 09 de agosto de 1989, que aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusões de sangue, componentes e derivados. **Diário Oficial da União** de 02 de dezembro de 1993; Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1376-93.pdf> . Acesso em 15 de janeiro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 1407 de 01 de agosto de 2002. **Diário Oficial da União** de 02 de agosto de 2002, seção I, p. 26.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n° 1461 de 22 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da União** de 23 de dezembro de 1999, seção I, p. 34.

BREVIDELLI, M. M.; CIANCIARULLO, T. I. Aplicação do modelo de crenças em saúde na prevenção dos acidentes com agulha. Application of the health belief model to the prevention of occupational needlestick injuries. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 2. 2001.

BUSEK, S.; OLIVEIRA, G. Molecular epidemiology of the hepatitis C vírus in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 117-123. 2003.

COCHRANE, A.; SEARLE, B.; HARDIE, A.; ROBERTSON, R.; DELAHOOKE, T.; CAMERON, S.; TEDDER, R. S.; DUSHEIKO, G. M.; DE LAMBALLERIE, X.; SIMMONDS, P. A Genetic Analysis of Hepatitis C Virus Transmission between Injection Drug Users. **The Journal of Infectious Diseases** v. 186, p.1212-1221. 2002.

COLOMBO M. Hepatitis C vírus and hepatocellular carcinoma. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, v. 13, n. 4, p. 519-528. 1999.

CHAN M. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in children. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 341-350. 2000.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159. 1987.

CONTE, P.V. Hepatite crônica por vírus C. Parte 1. Considerações gerais. **Arquivos Gastroenterology**, v. 37, n. 3, p. 187-194. 2000.

COOPER, S.; ERICKSON, A.L., ADAMS, E.J. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. **Immunity**, v. 10, p. 439-449. 1999.

CHOO, Q-L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-369. 1989.

DAVIDSON, F.; SIMMONDS, P.; FERGUSON, J.C., JARVIS, L.M.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.C.; SEED, C.R.G.; KRUSIUS, T.; LIN, C.; MEDGYESI, G.A.; KIYOKAWA, H.; OLIM, G.; DURAISAMY, G.; CUYPERS, T.; SAEED, A.A., TEO, D.; CONRADIE, J.; KEW, M.C.; LIN, M.; NUCHAPRAYOON, C.; NDIMBIE, O.K.; YAP, P.L. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' noncoding region. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 1197-1204. 1995.

DAVIS, G.L. Hepatitis C. in: SCHIFF, E.R.; SORRELL, M.F.; MADDREY, W.C.; **Diseases of the Liver**. 8th ed. eds. Schiff's Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 793-836. 1999.

ERLICH, G.D.; GREENBERG, S.J. PCR-based diagnostics in infections disease. **Boston: Blackwell Scientific Publications**, p. 25-27. 1994.

FANG, S-H; CHIANG B-L.; WU, M-H; IBA, H; LAI, M-Y.; YANG, P-M; CHEN, D-S; HWANG, L-H. Functional Measurement of Hepatitis C Virus Core-Specific CD8⁺ T-Cell Responses in the Livers or Peripheral Blood of Patients by Using Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cells as Targets or Stimulators. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 11, p. 3895-3901. 2001.

FELIPPE-JUNIOR, J.; TORRES, N.A. Hepatite C: Estratégia bio-oxidativa. Disponível em: http://www.medicinacomplementar.com.br/artigorevisao/ozonio_shtm. Acesso em: 30/05/ 2003.

FONSECA, A.S.K.; LUNGER, V.R.; IKUTA, N.; CHEINQUES, H. Prevalência de genótipos do vírus da Hepatite C no Estado do Rio Grande do Sul. **NewsLab** 1998; v. 27, p. 62-64. **Principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.37-49. 1998.

FREEMAN, W.M. **Biotechniques**, v. 26, p. 112-125. 1999.

FURIONE M., SIMONCINI L., GATTI M., FAUSTO B., REVELLO M. G., GERNA G. HCV genotyping by three methods: analysis of discordant results based on sequencing. **Journal of Clinical Virology**, v. 13, p. 121-130. 1999.

GERLACH, J.T.; DIEPOLDER, H.M.; JUNG, M.C. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 117, p. 933-941. 1999.

KREKULOVA, L.; REHAR, V.; WAKIL, A.E.; HARRIS, E.; RILEY, L.W. Nested restriction site-specific PCR to detect and type hepatitis C virus (HCV): a rapid method to distinguish HCV subtype 1b from other genotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1774-1780. 2001.

KRUG, L.P.; LUNGE, V.R.; IKUTA, A.S.; FONSECA, H.; CHEIQUER, L.S.; OZAKI, BARROS, S.G. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. **Brazilian Journal Medicine Biology**, v. 29, p. 1229-1232. 1996.

LAYDEN, J.E.; LAYDEN, T. J. Viral kinetics of Hepatitis C: new insights and remaining limitations. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 967-970. 2002.

LECHNER, F.; WONG, D.K.; DUNBAR, P.R. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. **Journal Experimental of Medicine**, v. 191, p. 1499-1512. 2000.

LEWIN, B. **Genes VII. Oxford University Press, New York, USA**, p. 1272. 2000.

LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; KRUG, L.P.; CHEIQUER, L.S.; OZAKI, BARROS, S.G. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in north and northeast regions from Brazil. Editado em **XX wordl Congress of Pathology and Laboratory Medicine**, p. 81-86. 1999.

MARTINELLI, A.C.; BROWN, D.; MORRIS, A. *et al.* Quantificação do RNA-HCV no fígado de pacientes com hepatite C crônica. **Arquivos Gastroenterology**, vol.37, n. 4, p.203-207. 2000.

McHUTCHISON, J.G; GORDON, S.C; SCHIFF, E.R.; SHIFFMAN, M.L; LEE, W.M.; RUSTGI, V.K. *et al.* Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **New England Journal Medicine**, v. 339, n. 21 p.1485-1492. 1998.

McOMISH, F.; YAP, P.L.B.C.; DOW, E.A.C.; FOLLETT, C.; SEED, A..J.; KELLER, T.J.; COBAIN, T.; KRUSIUS, E.; KOLHO, R.; NAUKKARINEN, C.;

MORADPOUR, D.; CERNY, A.; HEIM, M.H.; BLUM, H.E. Hepatitis C: an update. **Swiss Medical Weekly**, v. 131, p. 291-298. 2001.

MURASHIMA, S.; IDE, T.; MIYAJIMA, I.; KUMASHIRO, R.; UENO, T.; SAKISAKA, S.; SATA, M. Mutations in the NS5A gene predict response to interferon therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 27-32. 1999.

OLIVEIRA, M.L.A.; BASTOS, F.I.; SABINO, R.R.; PAÉTZOLD, U.; SCHREIER, E.; PAULI, G.; YOSHIDA, C.F.T. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v. 32, p. 279-282. 1999.

OSELLA, A.R.; MISCIAGNA, G.; GUERRA, V.; ELBA, S.; BUONGIORNO, G.; CAVALLINI, A. DI LEO, A.; SONZOGNI, L.; MONDELLI, M.U.; SILINI, E.M. Hepatitis C Virus Genotypes and Risk of Cirrhosis in Southern Italy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 70-75. 2001.

PALTANIN, L.F.; REICHE, E.M.V. Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4. 2002.

PARANÁ, R.; VITVITSKI, L.; BERBY, F.; PORTUGAL, M.; COTRIM, H.P.; CAVALCANTE, A.; LYRA, L.; TREPO, C. HCV infection in northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arquivos Gastroenterology**, v. 37, n. 4, p. 213-216. 2000.

PATIÑO-SARCINELLI, F.; HYMAN, J.; CAMACHO, L.A.B.; LINHARES, D.B.; AZEVEDO, J.G. Prevalence and risk factors for hepatitis C antibodies in volunteer blood donors in Brazil. **Transfusion**, v. 34, p. 138-141. 1994.

PILERI P, UEMATSU Y, CAMPAGNOLI S, *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, p. 938-941. 1998.

POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S.S.; NIEDERAU, C.; MINUK, G.S.; IDEO, G. Randomised trial of interferon α_2 b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α_2 b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v. 352, n. 9128, p. 1426–1432. 1998.

RUSTER, B.; ZEUZEM, S.; ROTH, W.K. Hepatitis C virus sequences encoding truncated core proteins detected in a hepatocellular carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, n. 3, p. 911-915. 1996.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; BASSIT, L; SABINO, E.C. Hepatites. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 37-49. 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, v. 1-3. Cold Spring Harbour Laboratory, NY. 1989.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid Silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, n. 5, p. 915 – 919. 1994.

SARBAH, S.A.; YOUNUSSI, Z.M. Hepatitis C: an update on the silent epidemic. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v. 30, n. 2, p.125-143. 2000.

SCHMIDT, W.N.; WU, P.; HAN, J.; PERINO, M.J.; LABRECQUE, D.R.; STAPLETON, J.T. Distribution of hepatitis C virus (HCV) RNA in whole blood and blood cell fractions: plasma HCV RNA analyses underestimates circulations virus load. **Journal Infectology Diseases**, v. 176, p. 20-26, 1997.

SHIMAZAKI, T.; HONDA, M.; KANEKO, S.; KOBAYASHI, K. Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN- α correlates with a reduced La protein. **Hepatology**, v. 35, p. 199-208. 2002.

SILINI, E.; FRETZ, C. Molecular epidemiology of hepatitis C virus infection among intravenous drug users. **Journal of Hepatology**, v. 22, p. 691-695. 1999.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C.; CHA, T.; CHAN, S-W.; MCOMISH, F.; IRVINE, B.; BEALL, E.; YAP, P.L.; KOLBERG, J. & URDEA, M.S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2391-2399. 1993.

SLOBODA, P. Hepatite C: um mal silencioso. Disponível em http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/dez03/hepato_slo.htm. Acesso em: 05 de setembro de 2004.

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

SUZIKI R.; SUZIKI T.; ISHII K.; MATSUURA, Y.; MIYAMURA, T. Processing and Functions of hepatitis C virus proteins. **Intervirolgy**, v. 42, p. 145-152. 1999.

TAKAHASHI, M.; YAMADA, G.; MIYAMOTO, R. *et al.* Natural course of chronic hepatitis C. **American Journal Gastroenterology**, v. 88, p. 240-243. 1995.

TAKAKI, A.; WIESE, M.; MAERTENS, G. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. **Natural Medicine**, v. 6, p. 578-582. 2000.

TOYO, C.V.; GALPERIM, B.; LARDI, G.; SANTOS, G.O.; HOCSMAN, J.; SOARES, P.R.B.; DE ALMEIDA, P.R.L. Diagnóstico diferencial das hepatites. **Mom. & Perspec.**, Saúde - Porto Alegre, v. 14 – n. ½. 2001.

VALENTE, V.B. Estudo da distribuição dos marcadores sorológicos das hepatites B e C entre doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto. 2002.

VITRAL, C.L.; YOSHIDA, C.F.T.; GASPAR, A.M.C. Developments in hepatitis A and C viruses experimental infections studies in non-human primates. **The Infection Diseases Review**, v. 1, n. 4, p. 253 -260. 1999.

WANG, Y-S; YOUNGSTER, S.; BAUSCH, J. Identification of the major positional isomer of Pegylated interferon alpha-2b. **Biochemistry**. v. 39, p. 10634-10640. 2000.

WEBSTER, G.; BARNES, E.; BROW, D.; DUSHEIKO, G. HCV genotypes-role in pathogenesis of disease and responde to therapy. **Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology**, v. 14, n. 2, p. 229-240. 2000.

WEILAND, O. Treatment of naïve patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 31, n. 1, p. 168-173. 1999.

WELSH, J. & MCCLELLAND, J. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combination of primers. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5275-5279. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535. 1990.

YEN, T.; KEEFFE, E.B.; AHMED, A. The Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 36, n. 1, p. 47-53. 2003.

YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; MORIYAMA, M. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: National surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. **Annal International Medicine**, v. 131, p. 174-181. 1999.

ZEHENDER, G.; MERONI, L.; MADDALENA, C.; VARCHETTA, S.; MONTI, G.; GALLI, M. Detection of hepatitis C virus RNA in cD19 peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. **Journal Infectology Diseases**, v. 176; p. 1209-1214. 1997.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 223-235. 2000.

9. Lista de Apêndice

Apêndice 01. Parecer de ética da Comissão de Ética em Pesquisa da UFAL.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Maceió-AL, 18/10/01

Senhor(a) Pesquisador(a) :

O Comitê de Ética na Pesquisa (CEP), reunido em 05/10/01 e com base no parecer emitido pelo(a) relator(a) do processo nº 00679/01-99 sob o título "Genotipagem de HCV em Maceió através de RT-PCR/RFLPs e sequenciamento automático" de sua autoria, vem por este instrumento comunicar sua aprovação, com base no item VIII.13,b, da Resolução nº 196/96.

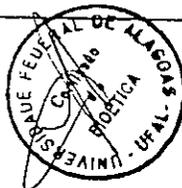
Outrossim, recomendamos a observância do que consta na folha de rosto com respeito ao cumprimento dos prazos para entrega de relatórios, bem como o atendimento da referida Resolução, sobretudo no que se refere aos itens III, IV e V, (*proteção ao sujeito*) e das demais Resoluções da CONEP/CNS, quando for o caso(*).

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais este Comitê coloca-se à disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra referidas.

Por ser uma temática especial prevista em legislação, estamos encaminhando à CONEP para análise e PARECER final.

(*) Áreas temáticas especiais.

Genética (Res. 196/96, VIII, 4, c, 1)



Prof. Dr. Erlon Medeiros-Ferreira
Comitê de Ética em Pesquisa
PRESIDENTE

Apêndice 02. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____

Concordo em participar voluntariamente da pesquisa "Genotipagem de HCV (vírus da hepatite C) em Maceió através de RT-PCR/RFLPs e sequenciamento automático". Fui informado(a) que o estudo consistirá de coleta de sangue para realização de RT-PCR, seguido da identificação de tipos e subtipos de HCVs por RFLPs, sem danos à minha saúde.

Fui esclarecido(a) que os resultados do estudo contribuirão com exames complementares para o diagnóstico de HCV, auxiliando o meu tratamento, e que, quando da apresentação dos resultados da pesquisa, serão omitidos dados que me identifiquem.

Visto que nada tenho a me opor, concordo em participar, assinando este termo, sabendo que posso desistir do estudo, sem qualquer prejuízo em meu atendimento neste Hospital.

Maceió, ____/____/____

Assinatura do Paciente

Assinatura do(a) Médico(a)

Apêndice 03. Questionário aplicado às pacientes estudadas.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

DIAGNOSE MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS

HEMOCENTRO: _____

DATA DE COLETA: ____/____/____ PRONTUÁRIO: _____

NOME: _____

SEXO: MASCULINO FEMININO

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

PROFISSÃO: _____

TELEFONE: _____

ESCOLARIDADE: _____

ESTADO CIVIL: SOLTEIRO(A) CASADO(A) DIVORCIADO(A) VIÚVO(A) OUTROS TRANSFUSÃO SANGUÍNEA: SIM NÃO DOADOR DE SANGUE: SIM NÃO FUMO: SIM NÃO QUANTO TEMPO? _____ ANOSÁLCOOL: SIM NÃO QUANTO TEMPO? _____ ANOS

TESTES SOROLÓGICOS:

ELISA I ELISA II ELISA III RIBA I RIBA II TRATAMENTO: NÃO SIM DATA: ____/____/____IMUNOTERAPIA: NÃO SIM DATA: ____/____/____