



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

AMANDA ALVES FECURY

**VÍRUS DA HEPATITE C: PREVALÊNCIA DOS GENÓTIPOS,
FATORES DE RISCO, ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E
HISTOPATOLÓGICAS DE PACIENTES ATENDIDOS NO
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**

Belém - Pará

2011

AMANDA ALVES FECURY

VÍRUS DA HEPATITE C: PREVALÊNCIA DOS GENÓTIPOS, FATORES DE RISCO, ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE PACIENTES ATENDIDOS NO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará (UFPA), como Requisito para a Obtenção do Grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luisa Caricio Martins

Belém - Pará

2011

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)-
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical**

Fecury, Amanda Alves.

Vírus da Hepatite C: prevalência dos genótipos, fatores de risco, alterações bioquímicas e histopatológicas de pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical / Amanda Alves Fecury; orientadora Luisa Caricio Martins. – 2011.

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

1. Hepatite C. 2. Hepatite por vírus. I. Martins, Luisa Caricio, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.3623

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA ALVES FECURY

VÍRUS DA HEPATITE C: PREVALÊNCIA DOS GENÓTIPOS, FATORES DE RISCO, ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE PACIENTES ATENDIDOS NO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará (UFPA), como Requisito para a Obtenção do Grau de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Luisa Caricio Martins
Núcleo de Medicina Tropical - NMT

Banca avaliadora:

Prof^ª Dr^ª Fabiola Elizabeth Villanova
Núcleo de Medicina Tropical - NMT

Prof Dr Juarez Antônio Simões Quaresma
Núcleo de Medicina Tropical - NMT

Prof^ª Dr^ª Rita Catarina Medeiros de Sousa
Núcleo de Medicina Tropical - NMT

Prof^ª Dr^ª Lívia Caricio Martins (suplente)
Instituto Evandro Chagas - IEC

Belém - Pará

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes portadores do vírus da hepatite C, suas famílias, e aos profissionais que buscam melhorias no atendimento, na clínica, no diagnóstico e no tratamento desses pacientes.

AGRADECIMENTOS

Expressar através de palavras um sincero agradecimento é a forma mais simples de demonstrar que um trabalho não se faz sozinha e que por trás de cada etapa desse estudo contei com a colaboração de familiares e amigos.

Agradeço a Deus por seu amparo e por guiar meus caminhos.

Aos meus pais (Martha e Ricardo), irmãos (Rafaela, João, Priscylla e Renata), avós (Anna, Armando, Scylla e João *in memoriam*), tios e primos agradeço pelo incentivo constante durante a caminhada nos estudos e na vida, tornando-a mais bela.

Um agradecimento especial à Prof^a Dr^a Luisa Caricio Martins por minha acolhida no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais, pela orientação sempre atenta, pelo exemplo como profissional e pela amizade de tantos anos.

Um muito obrigada aos colaboradores do Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), citando a Dr^a Elizabeth Lampe, pela receptividade e auxílio com o aperfeiçoamento das técnicas moleculares desenvolvidas nesse projeto.

Ao professor Reza Nassiri, seu staff e alunos, da Michigan State University pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos e experiências e pela acolhida.

A Cláudio Dias pelo amor e auxílio incansáveis.

Agradeço imensamente aos amigos que adquiri no decorrer desses anos e participaram comigo dessa jornada, seja no trabalho diário do laboratório (Marcella, Kemper, Adriana, Adenilson, Renata, Andrea, Andrei, Suellen, dona Socorro, dona Fátima e seu Sylvio), durante as aulas ou “nossos anexos” (Mário, Miguel, Samuel, Louise, Ruth, Karen, Danilo e Ana Cláudia). Aos amigos “de ontem, hoje e sempre” que fizeram parte dessa vitória: Anna Laura, Hivana, Adriane, Katarine, Valéria, Alex,

Lígia, Glenda, Ciane, Luciano, Fábio, Edmundo e Rogério. Lembrando também dos colegas do Laboratório de Imunopatologia, sob a coordenação dos professores doutores Juarez Quaresma, Hellen Fuzzi e Fabiola Villanova.

A todos os funcionários do NMT, principalmente ao Dr. Carlos Araújo, Dr. Ângelo Crescente e Dr.^a Rita Medeiros, pela colaboração e atenção aos pacientes, à “tia” Val pela dedicação, à Socorro da secretaria do mestrado e à Marluce pelos “lanchinhos”, meus agradecimentos.

Agradeço novamente: à Rafaela (revisão do texto); ao Adê (auxílio com as figuras) e à “tia” Val (em sua incansável ajuda na revisão bibliográfica).

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Pará por minha graduação, especialização e pós-graduação, com qualidade; aos professores (em nome do professor Manoel Ayres) que contribuíram em meu processo de formação pessoal e profissional, e à FAPESPA pelo apoio financeiro para execução deste trabalho e financiamento da bolsa de estudo.

RESUMO

A hepatite causada pelo HCV constitui-se de uma doença silenciosa que tende a evoluir para a forma crônica. A persistência viral, fatores genéticos do indivíduo e do vírus (genótipos), estilo de vida e exposição a fatores de risco aumentam as chances de o portador desenvolver carcinoma hepatocelular. Este estudo teve como objetivo verificar a função hepática dos pacientes com hepatite C; avaliar os fatores de riscos para aquisição do vírus; determinar os genótipos de HCV mais prevalentes e correlacionar os genótipos com os achados histopatológicos das biópsias hepáticas. A amostra constituiu-se de 152 pacientes adultos com sorologia (ELISA) reagente para anticorpos anti-HCV, que aceitaram participar da pesquisa, colheram amostra sanguínea para as análises e responderam a um questionário epidemiológico. A análise epidemiológica demonstrou maioria do sexo masculino, faixa etária de 45 anos e predomínio de indivíduos casados ou com união estável. Quanto aos fatores de risco para aquisição da infecção, observou-se a multiplicidade de parceiros, o não uso de preservativos, internações hospitalares e o compartilhamento de kits de manicure. Na detecção do RNA viral, 107 (70,4%) apresentaram positividade, sendo 97 (90,6%) do genótipo 1 e 10 (9,4%) do genótipo 3. Não houve variação entre as dosagens bioquímicas, os genótipos e as alterações histopatológicas. Dos 65 pacientes que realizaram biópsia hepática e exame histopatológico, todos os pacientes tinham hepatite crônica. Analisando as alterações histopatológicas e os genótipos virais encontramos associação destas variáveis, sendo o genótipo 1 relacionado a modificações histológicas mais intensas. Os resultados encontrados estão em concordância com outros descritos na literatura.

Palavras-chave: HCV, fatores de risco, alterações bioquímicas, genótipo, histopatológico.

ABSTRACT

The hepatitis caused by HCV is a silent disease that tends to develop into the chronic form. The viral persistence depends on genetic factors of the individual and the virus (genotypes), lifestyle and exposure to risk factors increase the chances of the carrier to develop hepatocellular carcinoma. This study objective to check the liver function of patients with hepatitis C and evaluate the risk factors for acquiring the virus and determine the most prevalent HCV genotypes and the genotypes correlate with histopathologic findings of liver biopsies.. The sample consisted of 152 adult patients with reagent serology (ELISA) for anti-HCV, who agreed to participate, collected blood samples for analysis and answered an epidemiological questionnaire. Epidemiological analysis showed most male, age 45 years and a predominance of married or stable individuals. Regarding risk factors for acquiring the infection, there was a multiplicity of partners, not condom use, hospitalizations, and manicure kits share. In the detection of viral RNA, 107 (70,4%) were positive, with 97 (90,6%) genotype 1 and 10 (9,4%) genotype 3. There was no variation in the biochemical assays, the genotypes and histopathological changes. Of the 65 patients who underwent liver biopsy and histopathological examination, all patients had chronic hepatitis. Analyzing the histopathological changes and viral genotypes found association of these variables, with the genotype 1 related histological changes more intense. The results are in agreement with other previously reported.

Keywords: HCV, risk factors, biochemical changes, genotype, histopathology.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -IFN (interferon-alfa)

AC (Acre)

ALT (TGP ou alanina aminotransferase ou transaminase glutâmica pirúvica)

AP (Amapá)

AST (TGO ou aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmina oxalacética)

C (core)

CMV (citomegalovírus)

DNA (ácido desoxirribonucléico)

E (envelope)

EBV (vírus Epstein-Barr)

ELISA (ensaio imunoenzimático)

FAPESPA (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará)

γ -GT (gama-glutamyltranspeptidase)

GO (Goiás)

GP (glicoproteínas)

HAV (vírus da hepatite A)

HBV (vírus da hepatite B)

HCC (carcinoma hepatocelular)

HCV (vírus da hepatite C)

HDV (vírus da hepatite D)

HEV (vírus da hepatite E)

HEMOPA (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará)

HIV (vírus da imunodeficiência humana adquirida)

Kb (quilo bases)

MA (Maranhão)

MS (Mato Grosso do Sul)

Nm (nanômetro)

NMT (Núcleo de Medicina Tropical)

NS (não estruturais)

ORF (matriz aberta de leitura)

PA (Pará)

pb (pares de base)

PCR (reação em cadeia da polimerase)

Q-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa)

RFLP (tamanho do fragmento de polimorfismo restrito)

RIBA (ensaio de imunnoblot recombinante)

RNA (ácido ribonucléico)

RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa)

SBPH (Sociedade Brasileira de Patologia e Hepatologia)

SUS (Sistema Único de Saúde)

TMA (amplificação mediada por transcrição)

TP (tempo de protrombina)

UDIs (usuários de drogas intravenosas)

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Vírus da hepatite C em microscopia eletrônica de varredura.	21
Figura 2 Vírus da hepatite C (HCV): modelo estrutural e organização genômica.....	22
Figura 3 Distribuição mundial da hepatite C no ano de 2007.	24
Figura 4 Prevalência dos diferentes genótipos do HCV no Brasil.	27
Figura 5 Visualização de “bandas” do produto da PCR em gel de agarose observado em luz ultra-violeta.....	50
Figura 6 Visualização da combinação dos “cortes” feitos pelas enzimas de restrição AVA II e RSA I. Nesta figura é possível observar os genótipos 1 e 3.....	52
Figura 7 Genótipos virais dos 107 pacientes com RT-PCR positivo.	63

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Distribuição faixa etária e gênero dos indivíduos estudados.....	57
Tabela 2 Distribuição da renda familiar mensal.....	57
Tabela 3 Distribuição amostral quanto ao grau de instrução.....	58
Tabela 4 Atividades ocupacionais dos indivíduos analisados por classes e áreas de atuação.....	59
Tabela 5 Caracterização do estado civil da amostra analisada.....	59
Tabela 6 Consumo do álcool, tabaco e drogas ilícitas entre os pacientes do estudo.....	60
Tabela 7 Fatores de risco para aquisição do HCV relacionados ao comportamento sexual.....	61
Tabela 8 Análise de fatores de risco para aquisição do HCV.....	62
Tabela 9 Valores dos testes bioquímicos.....	64
Tabela 10 Associação entre dosagens bioquímicas e correlação com os genótipos virais.	64
Tabela 11 Associação entre dosagens bioquímicas e atividades histopatológicas portais.	65
Tabela 12 Associação entre dosagens bioquímicas e fibrose.....	66
Tabela 13 Correlação dos genótipos virais e dos achados histopatológicos.....	66

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Características gerais das hepatites virais.....	20
Quadro 2 Escore de Metavir.....	38

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA HEPATITE C.....	19
3.1.1 Vírus da hepatite C.....	19
3.1.1.1 Classificação e morfologia	19
3.1.1.2 Organização genômica e replicação viral.....	21
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C.....	23
3.2.1 Epidemiologia da hepatite C.....	23
3.2.2 Epidemiologia molecular da hepatite C	26
3.2.3 Transmissão e fatores de risco.....	28
3.3 FISIOPATOGENIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C.....	30
3.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA HEPATITE C	31
3.4.1 Diagnóstico sorológico da hepatite C.....	31
3.4.2 Detecção dos ácidos nucleicos do HCV por biologia molecular e determinação do genótipo do vírus	32
3.4.3 Determinação das aminotransferases (AST e ALT), gama glutamiltranspeptidase (γ-GT) e fosfatase alcalina	33
3.4.4 Alterações histopatológicas.....	36
3.4.5 Tratamento.....	38
4 OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GERAL	41

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	42
5.1 CASUÍSTICA.....	42
5.1.1 Desenho do estudo	42
5.1.2 Local do estudo	42
5.1.3 Aspectos éticos	43
5.1.4 Caracterização da amostra.....	43
5.1.5 Critérios de inclusão e exclusão.....	43
5.1.5.1 <i>Critérios de inclusão</i>	43
5.1.5.2 <i>Critérios de exclusão</i>	44
5.2 MÉTODOS	44
5.2.1 Obtenção do material biológico.....	44
5.2.2 Classificação do consumo de álcool, fumo e drogas para as análises epidemiológicas	45
5.2.3 Diagnóstico sorológico da hepatite C.....	46
5.2.4 Detecção dos ácidos nucleicos do vírus da hepatite C por biologia molecular	48
5.2.5 Determinação do genótipo do vírus	51
5.2.6 Determinação das aminotransferases (ALT e AST), gama glutamiltransferase (γ-GT) e fosfatase alcalina.....	52
5.2.7 Avaliação histopatológica	54
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5.4 FONTES DE FINANCIAMENTO	55
6. RESULTADOS	56
6.1 ANÁLISE SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICA	56

6.2 FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DA INFECÇÃO PELO HCV	60
6.3 AVALIAÇÃO DOS ACHADOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E HISTOPATOLÓGICOS.....	63
7 DISCUSSÃO	67
8 CONCLUSÃO.....	70
9 REFERÊNCIAS	71
10 APÊNDICES	77
APÊNDICE 1	77
APÊNDICE 2	79
11 ANEXO.....	80

1 INTRODUÇÃO

A palavra hepatite origina-se do grego *hepar* que significa fígado e *itis* que quer dizer inflamação, ou seja, hepatite seria qualquer afecção de natureza inflamatória que acometa o fígado, resultando em agressões contra as células que compõe este órgão, denominadas de hepatócitos. Independente dos agentes etiológicos envolvidos, o processo inflamatório que ocorre no tecido hepático pode resultar desde uma alteração laboratorial até uma doença fulminante ou levando a enfermidades de curso prolongado, resultando em um processo de cronificação (ABREU, 2007; PASSOS, 2003).

As infecções virais são as causas mais significativas para o desenvolvimento das hepatites e têm como etiologia o vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite Delta (HDV) e vírus da hepatite E (HEV), ou infecções ocasionalmente causadas pelos vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), herpes vírus simples, febre amarela, malária, febre tifóide, brucelose, leptospirose, entre outros. Agentes químicos que comumente originam hepatites são substâncias tóxicas exógenas como a toxicidade químico-alcoólica e medicamentosa, apresentando manifestações clínicas comuns àquelas encontradas nas hepatites de origens virais (ABREU, 2007; BRASIL, 2005).

Os vírus hepatotrópicos possuem características físico-químicas e epidemiológicas distintas entre si e entre os subgrupos ou subtipos. Sabe-se que alguns vírus, como HBV, HDV e, principalmente, HCV possuem elevado potencial de cronificação, estando intimamente relacionados ao surgimento de alterações hepáticas como cirrose e hepatocarcinoma (AGUILERA, 2006; PASSOS, 2003).

A hepatite C foi uma infecção inicialmente observada em doadores de sangue e caracterizada como hepatite “não A” e “não B”, sendo considerada uma doença de descoberta recente, com casos registrados no final da década de 80 e que apresenta um crescente número de infectados (AGUILERA, 2006; PASSOS, 2003).

É caracterizada como uma doença silenciosa, pois muitas vezes os sintomas clínicos não aparecem no momento da infecção, ou são leves e inespecíficos (AGUILERA, 2006). Frequentemente a infecção apenas é detectada em algum exame de rotina, como os necessários para a doação de sangue, no entanto, na maioria dos casos (85%) a infecção evolui para a forma crônica. Dos pacientes cronicamente infectados, cerca de 20% evoluem com lesões no fígado para cirrose hepática ou câncer, sendo, portanto, a hepatite C considerada como a maior causa de transplantes de fígado no mundo, sendo que esse prognóstico passou a deter a atenção de diversas instituições de saúde (FAGUNDES et al., 2008; LOPES, 2009; PERZ et al., 2006; STRAUSS e TEIXEIRA, 2006).

Assim como para demais agentes cancerígenos, na oncogênese do HCV fatores genéticos e ambientais são importantes para o desenvolvimento e progressão do câncer (BRASILEIRO FILHO, 2008). A persistência viral, fatores genéticos do indivíduo e do vírus (associados aos 6 genótipos), estilo de vida e exposição a fatores de risco aumentam progressivamente as chances de o portador desenvolver carcinoma hepatocelular (MARQUESINI et al., 2008). A relevância de identificar os 6 genótipos e subtipos está relacionada com o prognóstico da doença e a resposta ao tratamento anti-HCV (JEROME, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

O HCV tem sido identificado como um dos principais fatores para o desenvolvimento de doença hepática crônica. Contudo, no Brasil com base em estudos de Hemocentros observa-se uma variação entre as regiões brasileiras: 0,62% na região Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46 no Sul (MARQUESINI et al, 2008; TOMEI et al., 2005).

Em Belém, entre os doadores de sangue foi detectada uma prevalência de 2,7% e tem sido relatados surtos entre usuários de drogas intravenosas e hemodialisados (AQUINO et al, 2008). Contudo, apesar da alta prevalência da infecção pelo HCV em nossa população existem poucos estudos realizados nessa área. Sendo extremamente importante definir não só a soroprevalência deste vírus, mas também a caracterização dos genótipos circulantes em nossa cidade.

Em pacientes com testes sorológicos reagentes para pesquisa de anticorpos anti-HCV também se faz necessária a realização de exames complementares, como a pesquisa do RNA e caracterização do subtipo viral, importantes na orientação ao tratamento e prognóstico da doença.

As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes, podem originar uma melhor visão da situação da infecção pelo HCV, bem como elucidar os principais fatores de risco a que esses pacientes estavam expostos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS DA HEPATITE C

3.1.1 Vírus da hepatite C

3.1.1.1 Classificação e morfologia

Há algum tempo sabia-se da existência de uma hepatite de transmissão parenteral, inicialmente denominada de “não-A, não-B”, por não apresentar marcadores sorológicos positivos para esses dois tipos de hepatites conhecidos. No entanto, em 1989, nos Estados Unidos, Choo e colaboradores identificaram o vírus da hepatite C como sendo o principal agente etiológico da hepatite crônica anteriormente denominada de “não-A não-B”. O desenvolvimento de um marcador sorológico específico permitiu caracterizá-lo, possibilitando o estudo dessa forma de hepatite (AGUILERA, 2006; BRASIL, 2008; MAJOR e FEINSTONE, 1997; PASSOS, 2003).

O Quadro 1, adaptado de TORTOTA et al., 2005 e TRABULSI et al., 2005, relaciona as características das hepatites virais (A, B, C, D e E), como as vias de transmissão, agente causal, sinais e sintomas, se evolui para doença hepática crônica e se há vacinas comercialmente utilizadas para prevenir infecções, sintetizando características das infecções virais.

Quadro 1 Características gerais das hepatites virais

Característica	Hepatite A	Hepatite B	Hepatite C	Hepatite D	Hepatite E
Agente causal	Vírus da hepatite A (HAV); RNA de fita simples; sem envelope	Vírus da hepatite B (HBV); DNA de fita dupla, envelope	Vírus da hepatite C (HCV); RNA de fita simples, envelope	Vírus da hepatite D (HDV); RNA de fita simples, envelope de HBV	Vírus da hepatite E (HEV); RNA de fita simples, sem envelope
Via de transmissão	Fecal-oral (ingestão de alimentos e água contaminados)	Parenteral (sangue ou outros líquidos corporais contaminados), sexual, vertical	Parenteral, sexual (?) e perinatal	Parenteral (hospedeiro co-infectado com HBV), superinfecção, vertical	Fecal-oral
Associação a transfusões	Rara	5-10%	50%	Alta	Rara
Sinais e sintomas	Subclínico ou febre, cefaléia, mal-estar, icterícia	Subclínico, semelhante ao HAV, mas provável progressão para doença hepática grave	Similar ao HBV, porém com maior chance de cronicidade	Lesão hepática severa, alta taxa de mortalidade	Parecido com o HAV, no entanto, grávidas com alta mortalidade
Distribuição	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial (frequente: Mediterrâneo e Oriente Médio)	Mundial (frequente: África)
Faixa etária	Crianças e jovens	Adultos	Jovens e adultos	Adultos	Jovens e adultos
Mortalidade	< 0,5%	1-2%	0,5-1%	Alta	10-20% em gestantes
Vacina	Inativada, imunoglobulina (proteção temporária)	Produzida por engenharia genética em leveduras	Nenhuma	Vacina contra o HBV, pois a co-infecção é necessária	Em desenvolvimento
Doença hepática crônica	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Associação com carcinoma hepático	Não	Sim	Sim	Sim	Não

Fonte: Adaptado de TORTOTA et al., 2005 e TRABULSI et al., 2005.

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, espécie *Hepatitis C virus*. Possui material genético de RNA fita simples positiva envelopado, capaz de uma rápida variação genética, o que caracterizou o surgimento de 6 diferentes genótipos (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e subtipos (MARQUESINI et al., 2008; TORTORA, 2005). Suas partículas virais são esféricas com 50 nm de diâmetro e contêm envelope lipoprotéico. O core viral é esférico, com aproximadamente 30 nm, mas ainda não há detalhes descritos dessa estrutura, devido à dificuldade de cultivo do vírus (MARQUESINI et al., 2008; TRABULSI, 2005; YU et al., 2007). A Figura 1 demonstra a estrutura externa do vírus da hepatite C visualizada através de microscopia eletrônica de varredura.

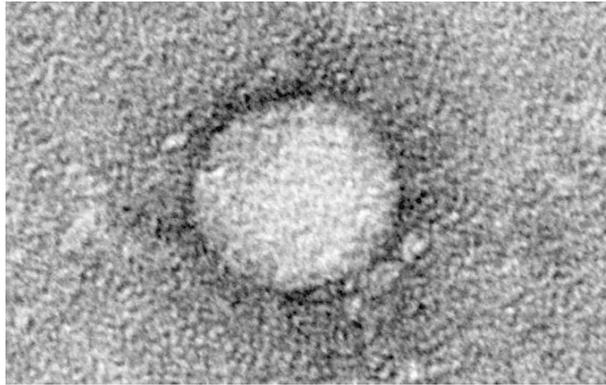


Figura 1 Vírus da hepatite C em microscopia eletrônica de varredura.

Fonte: RICE, 2010.

3.1.1.2 Organização genômica e replicação viral

O genoma do HCV contém uma molécula de RNA de fita simples de polaridade positiva, com cerca de 9,6 kb e o vírus contém uma matriz aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína precursora (YANG, 2008). Diferente da maioria dos vírus, o RNA do HCV não realiza transcrição reversa e também não se integra no genoma do hospedeiro, porém é capaz de induzir doenças necro-inflamatórias que agiriam como promotores da carcinogênese (LOPES, 2009; MIRANDA, 2004).

Após penetração no citoplasma da célula hospedeira por endocitose, o vírus terá seu RNA de fita simples positiva “desnudo”, liberado, das estruturas que o protegem (proteínas do envelope viral e core) (Figura 2). O material genético de RNA do vírus alcançará os ribossomos da célula do hospedeiro presentes no retículo endoplasmático rugoso e este RNA viral fará a síntese de uma poliproteína precursora com: três proteínas estruturais, nucleocapsídeo ou core (C) e glicoproteínas do envelope viral E1 (gp31) e E2 (gp70), codificadas pela porção aminoterminal do genoma do vírus; além de seis proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B),

codificadas na porção 3' (Figura 2) (CALLENS et al., 2005; YANG, 2008; YU et al., 2007).

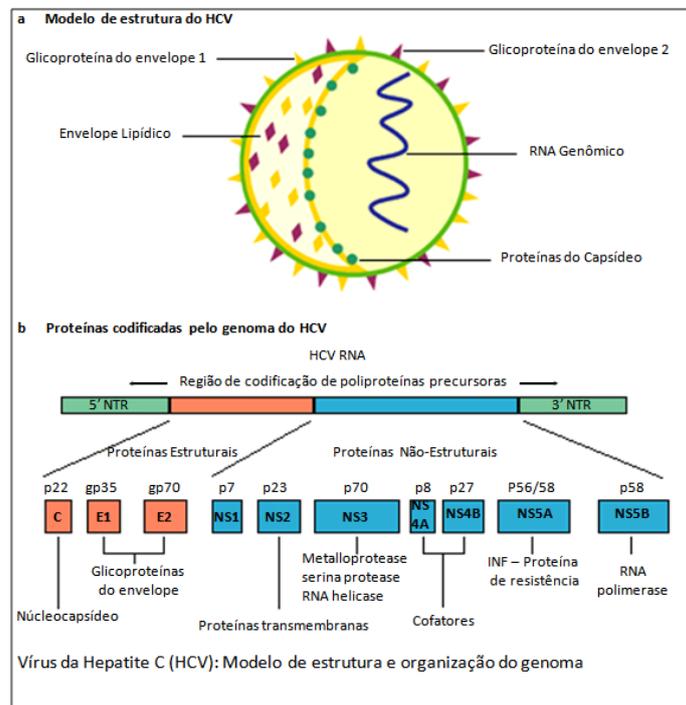


Figura 2 Vírus da hepatite C (HCV): modelo estrutural e organização genômica.

Fonte: Adaptado de ANZOLA e BURGOS, 2003.

A poliproteína originada será clivada pela ação da protease formada pelas proteínas codificadas pelos genes NS3 e NS4A, que associada com uma RNA polimerase (codificada pelo gene NS5B) formará um complexo de replicação, que irá realizar a cópia da fita de RNA positiva para uma fita simples de RNA negativa (RICE e LINDENBACH, 2005).

A fita negativa gerada será novamente copiada no complexo de replicação, originando uma nova fita simples de RNA positiva. A nova fita será envolvida, “empacotada”, pelo core e pelo envelope viral e poderá sair do retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira, transitar pelo citoplasma e ser liberada para o meio, recomeçando o processo e infectando novas células (RICE e LINDENBACH, 2005).

Como não há um sistema de cultivo eficiente para o HCV, ainda não foi possível um estudo antigênico detalhado, mas as regiões conservadas do vírus têm sido estudadas e sabe-se que existem seis genótipos (1 a 6) e mais de 50 subtipos (1a, 1b, 1c, ...) virais (CALLENIS et al., 2005; MARQUESINI et al., 2008).

Os diferentes genótipos estão associados a variações nas manifestações clínicas, à evolução da doença e a resposta ao tratamento, sendo que o genótipo 1 está mais relacionado à infecções crônicas, intenso dano hepático e maior resistência ao tratamento, quando comparado aos outros genótipos (2, 3, 4, 5 e 6) (BARBOSA et al., 2005; TOMEI et al., 2005).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C

3.2.1 Epidemiologia da hepatite C

Achados epidemiológicos indicam que o vírus da hepatite C tem distribuição mundial, sendo que entre 1 a 2% da população de países desenvolvidos pode estar infectada, e que cerca de 3% da população mundial seria portadora do vírus da hepatite C, onde a distribuição da infecção pelo HCV é representada na Figura 3. De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), aproximadamente 170 milhões de indivíduos estão cronicamente infectados, um número que tem levado as autoridades de saúde pública a considerar a hepatite C como “a grande pandemia do século XXI” (AQUINO et al., 2008; FAGUNDES et al., 2008; PASSOS, 2003).

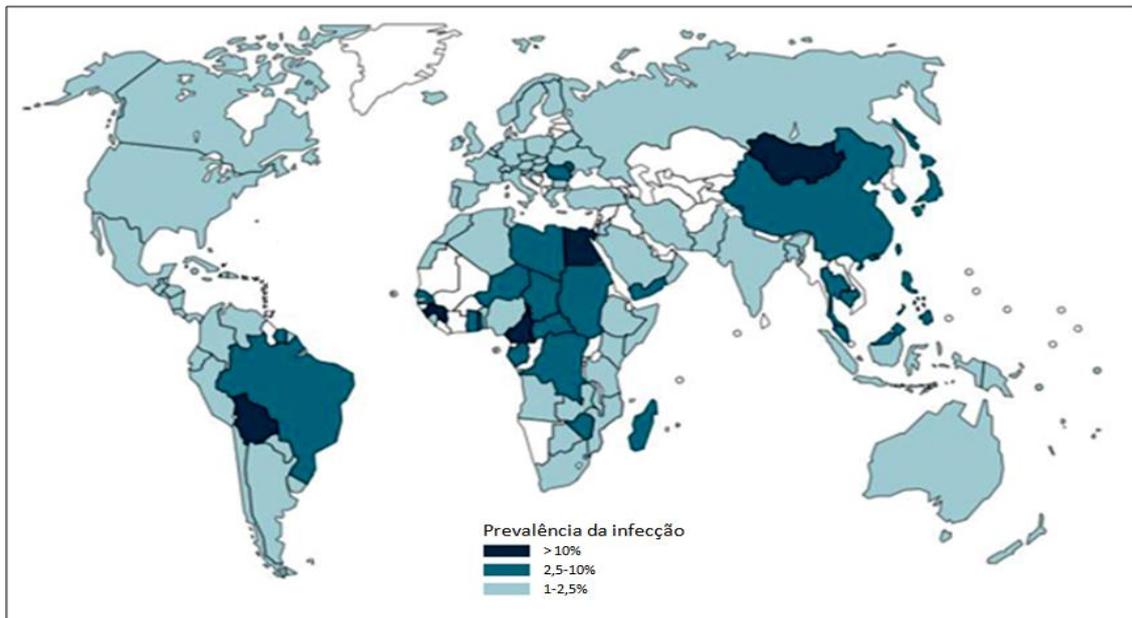


Figura 3 Distribuição mundial da hepatite C no ano de 2007.

Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION apud HEALTH PROTECTION AGENCY, 2008.

Nos Estados Unidos, estima-se que nas últimas três décadas, cerca de 4 milhões de pessoas tenham sido infectadas, com aumento anual de 30 mil casos (PASSOS, 2003). No Japão e Egito, estudos epidemiológicos que levaram em consideração a sorologia positiva para HCV demonstraram predomínio de pacientes do sexo masculino em patologias como cirrose e carcinoma hepatocelular e que a co-infecção com HBV aumenta muito o risco de desenvolvimento dessas patologias (PERZ et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, estima-se que 20% da população possua anticorpos IgG HCV específicos, indicando que já tenha havido contato prévio com o vírus; e teoricamente essa alta prevalência seria explicada principalmente pela infecção através de agulhas e seringas contaminadas (AQUINO et al., 2008; LOPES et al., 2009).

No Brasil, dados preliminares do Ministério da Saúde indicam que nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Distrito Federal há endemicidade moderada de

hepatite C (BRASIL, 2008). Ainda relacionando as regiões brasileiras, outro estudo demonstrou uma maior prevalência de infecção pelo HCV em Estados do sul e sudeste, na população urbana (BRASIL, 2005; MIRANDA et al., 2004).

Em Campinas, um estudo desenvolvido em pacientes de um serviço especializado em hemodiálise indicou positividade de aproximadamente 4,7% das amostras na pesquisa anti-HCV, com uma prevalência anual de 3,8% nos anos de 2001 e 2002 e de 12% no ano de 2003. Estudos semelhantes desenvolvidos em outras localidades demonstraram grande variação da prevalência entre as cidades analisadas, como em Pernambuco (8,4%), São Paulo (14,6%), Curitiba (39,2%), Belo Horizonte (20%) e Goiânia (46,7%), sendo importante ressaltar que há variação na prevalência entre as diferentes amostras e grupos de risco (MARQUESINI et al., 2008).

Na Bahia, em Salvador, estudo realizado por Zarife et al. (2006) na população geral demonstrou uma prevalência de 1,5% da infecção pelo HCV. Em Santa Catarina, na cidade de Criciúma, uma triagem sorológica semelhante realizada em 300 voluntários de uma campanha de saúde indicou 1,53% de prevalência da infecção pelo vírus HCV (FAGUNDES et al., 2008).

Em Belém (PA), a análise sorológica de 5.542 indivíduos demonstrou 3,6% de positividade para pesquisa de anticorpos anti-HCV, com a maioria dos indivíduos acima de 50 anos de idade. Na população geral da região amazônica, a prevalência do HCV varia entre 1,1 a 2,4%, em tribos indígenas a prevalência é de cerca de 1,4%, e em indivíduos do grupo de risco, como hemodialisados, a prevalência se eleva para 48,1 a 51,9% (AQUINO et al., 2008).

De acordo com Miranda et al. (2004), em pesquisa realizada com 36 pacientes portadores de carcinoma hepatocelular na Amazônia Oriental (constituída dos municípios localizados nos Estados do Pará, Amapá, Tocantins e Maranhão, e de alguns

municípios do Mato Grosso), houve predomínio de indivíduos do sexo masculino, com idade média de aproximadamente 51 anos, sendo que o Estado do Pará foi responsável por 88,9% dos casos estudados. Em relação à procedência dos pacientes, o município de Belém (PA) teve maior frequência (27,8%), seguido por Altamira (PA), Macapá (AP) e Turiaçu (MA). Nesse estudo, 53% dos pacientes eram procedentes da zona rural.

3.2.2 Epidemiologia molecular da hepatite C

A elevada taxa de mutação do vírus da hepatite C ($1,44$ a $1,92 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos/local no genoma/ano) determina a classificação do vírus em grupos filogenéticos. O HCV pode ser classificado em seis genótipos e vários subtipos ou quasispécies, sendo que há variação na prevalência desses genótipos entre os diferentes continentes e também entre regiões do mesmo país (CALLENS et al., 2005; LOPES et al., 2009; ZARIFE et al., 2006).

Estudos demonstram uma distribuição mundial dos genótipos 1, 2 e 3, sendo descritos no Pacífico Oeste, no Mediterrâneo, nas Américas e na Europa, sendo que o continente Europeu ainda possui os genótipos 4 e 5. No continente Africano há prevalência dos genótipos 1, 4 e 5 e no sudeste Asiático são mais encontrados os genótipos 3 e 5 (DUARTE, 2006; ESTEBAN et al., 2008; LOPES et al., 2009; ZARIFE et al., 2006). Outros estudos, como os de Silva et al. (2006) e Martins et al. (2006) indicam o genótipo 4 como o mais prevalente no norte da África, genótipo 5 no sul da África e genótipo 6 em regiões asiáticas.

Seguindo o padrão de distribuição dos genótipos nas Américas, o Brasil apresenta maior prevalência do genótipo 1, seguido do genótipo 3 (Figura 4) (DUARTE, 2006; LOPES et al., 2009, SILVA et al., 2006). Em estudo realizado

utilizando amostras obtidas em diferentes Estados brasileiros, observou-se que a média de prevalência do genótipo 1 nas regiões brasileiras é de 64%, do genótipo 2 é de 4%, do genótipo 3 de 31%, menor que 1% dos genótipo 4 e 5 (ZARIFE et al., 2006).

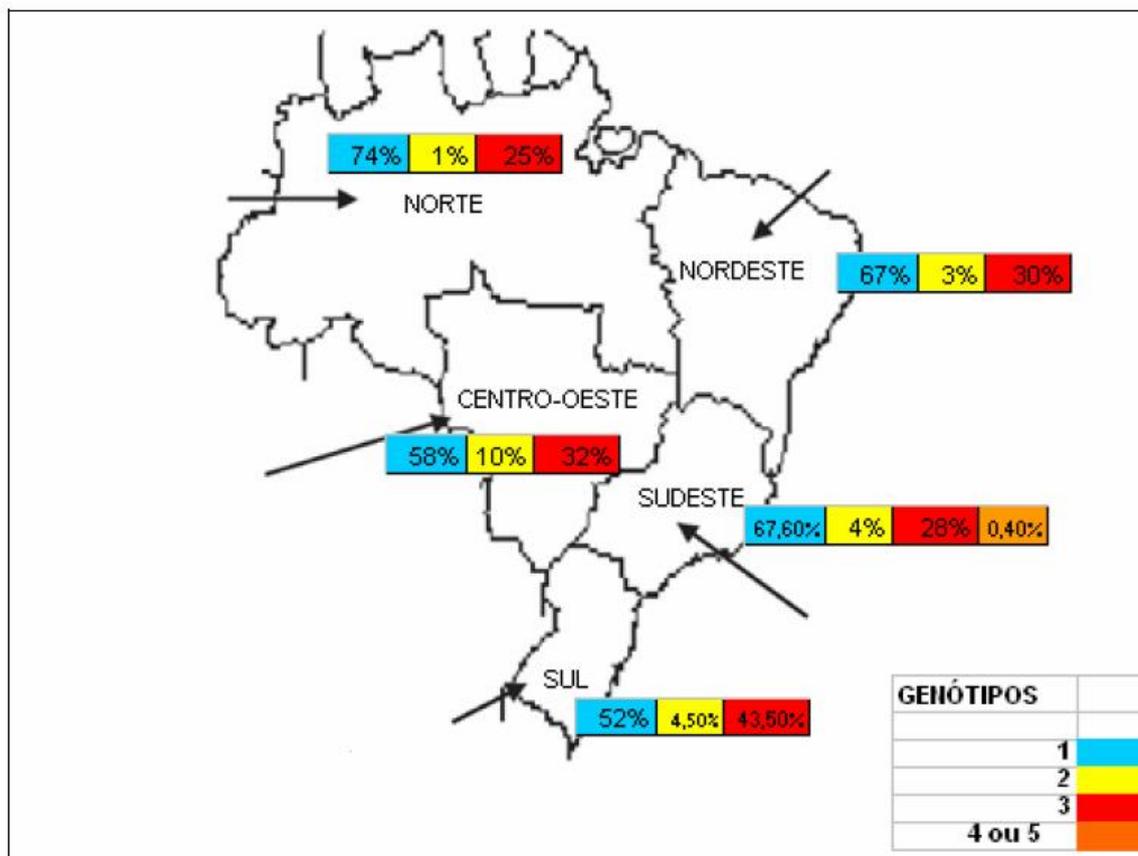


Figura 4 Prevalência dos diferentes genótipos do HCV no Brasil.

Fonte: Adaptada de DUARTE, 2006.

Quando comparadas as regiões do Brasil, o genótipo 1 foi mais prevalente na região Norte, o genótipo 2 na região Centro-Oeste, especialmente em Mato Grosso, e o genótipo 3 na região Sul, sendo que os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados, com casos descritos em São Paulo e apenas um caso relatado na Bahia (ZARIFE et al., 2006).

Em Goiânia (GO) e Campo Grande (MS) um estudo realizado por Lopes et al. (2009), através de técnicas moleculares e análise filogenética, observou maior

prevalência do genótipo 1, subtipos 1a e 1b, e genótipo 3, subtipo 3a, entre as amostras analisadas. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado no Rio de Janeiro. Outro estudo realizado em Goiânia por Barbosa et al. (2005) também apresentou os mesmos genótipos.

Em Rio Branco (AC), foram analisadas amostras de profissionais da área da saúde e verificou-se que o genótipo 1 foi o mais prevalente, seguido pelos genótipos 3 e 2, respectivamente. Em Belém, Pará, os resultados encontrados foram semelhantes, e esses achados estão em concordância com os dados da região Norte do país (PARANÁ et al., 2007).

3.2.3 Transmissão e fatores de risco

Diversos estudos indicam que o HCV é quase que exclusivamente transmitido pela via parenteral, com a exposição ao sangue contendo o vírus, através do compartilhamento de objetos contaminados como agulhas, seringas, lâminas de barbear, escovas de dente, alicates de manicure, utensílios para colocação de *piercing* e confecção de tatuagens, além de instrumentos utilizados para consumo de drogas injetáveis (cocaína, anabolizantes e complexos vitamínicos), inaláveis (cocaína) ou pipadas (crack) que compartilham os equipamentos de uso, porém em um percentual significativo (mais de um terço) dos casos não é possível identificar a via de infecção, o que dificulta a ação de medidas epidemiológicas mais efetivas (AGUILERA et al., 2006; AQUINO et al., 2008; BRASIL, 2006, 2008; CAVALHEIRO, 2007; LOPES et al., 2009; PASSOS, 2003).

Há também possibilidade de transmissão através de acidentes com material perfurocortante, em procedimentos cirúrgicos e odontológicos e hemodiálise sem os

procedimentos adequados de biossegurança. Após a instituição da triagem sorológica obrigatória para hepatite C em 1993 nos bancos de sangue e o rigoroso controle de qualidade, a transmissão do HCV via transfusão sanguínea e de hemoderivados vem diminuindo significativamente (BRASIL, 2006, 2008; PASSOS, 2003).

Mesmo com intenso controle, pacientes hemodialisados possuem maior chance de contrair o HCV, porém o exato modo de transmissão nas unidades de hemodiálise não são totalmente esclarecidos. Há evidências que indicam a infecção nosocomial pelo compartilhamento de máquinas e equipamentos de diálise, através da ruptura acidental da membrana da diálise, por alteração no tamanho do poro ou pela superfície externa do equipamento. O número de transfusões sanguíneas e a duração do tratamento de hemodiálise seriam fatores de risco para uma maior transmissão do vírus (BOULAAJAJ, 2005; MARQUESINI et al., 2008).

A transmissão sexual em parceiros estáveis e perinatal também foram relatadas na literatura, porém não parecem ser comuns. Embora teoricamente o HCV possa ser transmitido por exposição de mucosas ao vírus, quando comparado ao HBV, essa via é menos eficiente. A baixa titulação do HCV no sangue com relação ao HBV seria responsável por essa diferença de transmissão na mucosa. A transmissão vertical, da mãe para o bebê, geralmente ocorre no momento do parto, sendo incomum a via transplacentária. Pessoas com múltiplos parceiros, com práticas sexuais desprotegidas (sem o uso de preservativos), gestantes com elevada carga viral do HCV, ou pacientes coinfectados, principalmente com HIV, possuem um maior risco de transmissão da doença hepática (CAVALHEIRO, 2007; FAGUNDES et al., 2008; MARQUESINI et al., 2008; PASSOS, 2003).

3.3 FISIOPATOGENIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

O período de incubação do vírus é em média 7 semanas, variando de 2 a 22 semanas, e os sinais e sintomas podem variar de subclínicos até fulminantes, onde podem apresentar febre, cefaléia, mal-estar, vômitos, colúria, hipocolia fecal, alteração das aminotransferases e, em poucos casos, icterícia (BRASIL, 2008). Entre as manifestações extra-hepáticas causadas pelo HCV, podemos relatar a crioglobulinemia associada à glomerulonefrite, porfiria cutânea tardia, e outras desordens auto-imunes, além de haverem evidências da presença do vírus em linfócitos, células do epitélio intestinal e sistema nervoso central (BARBOSA et al., 2005; FLINT e LEVY, 2001).

Pode ocorrer persistência viral e cronificação em cerca de 70 a 85% dos casos, sendo que essas infecções persistentes têm sido relacionadas epidemiologicamente ao hepatocarcinoma, à cirrose hepática e algumas formas de hepatites auto-imunes (AGUILERA, 2006; HALFON et al., 2006; MIRANDA et al., 2004).

Ao penetrar na célula hospedeira, o RNA viral não se integra ao genoma do hospedeiro e os mecanismos pelos quais o HCV induz a carcinogênese ainda são pouco conhecidos. Dentre os possíveis mecanismos carcinogênicos estão proteínas dos vírus (proteína NS3 e proteína do núcleo viral) que se ligam e inibem o pRb e p53, proteínas reguladoras do ciclo celular, impedindo a transdução de sinais pró-apoptóticos. Em outro mecanismo, induzido pela replicação viral, poderia haver co-expressão de genes que codificam TGF α e IGF-II, que são importantes fatores de crescimento na hepatocarcinogênese. Por induzir inflamação crônica, associada à necrose e regeneração, o vírus poderia também atuar como promotor e indutor de alterações

genéticas mediante estímulo de radicais livres produzidos pelas células do exsudato inflamatório, além de interferir na proliferação celular por meio de citocinas, quimiocinas e alterações na matriz extracelular associadas ao processo inflamatório (BRASILEIRO FILHO, 2008; PROMRAT e LIANG, 2003; RICE e LINDENBACH, 2005).

A infecção pelo HCV pode levar a diferentes tipos de injúrias no fígado, com variabilidade de manifestações clínicas e do tratamento aplicado. Dentre os fatores relacionados a essas alterações estão incluídas variações genéticas do vírus (diferentes genótipos) e do hospedeiro (polimorfismos genéticos) (HALFON et al., 2006; PEREIRA et al., 2005; PROMRAT e LIANG, 2003).

3.4 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA HEPATITE C

3.4.1 Diagnóstico sorológico da hepatite C

Atualmente existem testes sorológicos específicos para a detecção de anticorpos anti-HCV presentes no soro de pacientes infectados. Esses testes baseiam-se no ensaio imunoenzimático tipo ELISA, com antígenos recombinantes obtidos por clonagem e expressão do genoma viral (BRASIL, 2008; JEROME e GRETCH, 2004).

Os testes sorológicos foram inicialmente desenhados para triagem nos bancos de sangue e detectam indivíduos infectados de forma crônica, em que os anticorpos contra os diferentes antígenos estão presentes, portanto não são adequados para infecções agudas de pacientes que estão na janela imunológica, período em que já houve a infecção, mas ainda não é possível detectar a presença de anticorpos no sangue dos infectados, pois estes estão em baixas titulações. Nesses casos em que o teste de

ELISA apresenta baixa positividade, para o diagnóstico da hepatite C aguda é recomendada a detecção do genoma viral através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que geralmente é positivo nessa fase (ESTEBAN et al., 2008; MARQUESINI et al., 2008).

A soroconversão ao antígeno utilizado nos testes de primeira geração, utilizando o antígeno denominado C100-3, derivado do gene não-estrutural NS4 ocorria de 2 a 3 meses após a infecção e não possuía a sensibilidade e especificidade adequadas e, em 1992, foi substituído pelos testes de segunda geração. Estes testes fazem uso de antígenos derivados dos genes C do core e não estruturais NS3, representando um teste multigênico, aumentando a sensibilidade e um pouco da especificidade, além de melhorar a detecção na janela imunológica (ESTEBAN et al., 2008; JEROME e GRETCH, 2004).

Um teste de terceira geração, utilizando antígenos reconfigurados da proteína do core (c22-3) e da NS3 (c200) e mais um antígeno adicional derivado do gene NS5, passou a ser utilizado a partir de 1995. Os testes positivos na triagem devem ser confirmados por outros métodos, como o ensaio de immunoblot recombinante (RIBA), que contém antígenos recombinantes no formato immunoblot, ou técnicas moleculares (DUARTE, 2006; HALFON et al., 2005; MARQUESINI et al., 2008).

3.4.2 Detecção dos ácidos nucleicos do HCV por biologia molecular e determinação do genótipo do vírus

O RNA do vírus pode ser identificado através de testes quantitativos ou qualitativos por métodos e técnicas de biologia molecular. Os testes qualitativos comumente utilizados para detecção do RNA do HCV são a RT-PCR (reação em cadeia

da polimerase por transcriptase reversa) e TMA (amplificação mediada por transcrição), porém a amplificação do material genético do vírus pelo método de RT-PCR e a posterior análise da sequência de nucleotídeos apresentam-se como as melhores técnicas de determinação dos genótipos virais do HCV, sendo que a RT-PCR também pode ser utilizada na avaliação da terapia antiviral (DUARTE, 2006; MARTINS et al., 2006).

A técnica de RT-PCR para detecção do RNA viral em amostras de pacientes suspeitos para a infecção pelo HCV iniciou-se na década de 90, sendo que esse método apresenta boa sensibilidade e especificidade, permitindo inclusive a detecção da infecção antes da positividade de muitos ensaios sorológicos, que necessitam da resposta imunológica do hospedeiro. Pacientes imunodeprimidos, que têm dificuldade em formar uma resposta imune efetiva, podem se beneficiar desse método diagnóstico (DUARTE, 2006; JEROME e GRETCH, 2004).

A região 5' NC (não codificante) do genoma viral, por ser uma das mais conservadas, permitiu sua amplificação para a reação da PCR, abrangendo os diferentes genótipos do vírus (1, 2, 3, 4, 5 e 6). Por essa razão, essa região é bastante utilizada na detecção do RNA viral e na posterior genotipagem, tendo importância na prática clínica para definição do esquema terapêutico do paciente (CHANG, 2000; LOPES, 2009; PERZ et al., 2006).

3.4.3 Determinação das aminotransferases (AST e ALT), gama glutamiltranspeptidase (γ -GT) e fosfatase alcalina

As enzimas aspartato aminotransferase (AST, TGO ou transaminase glutâmica-oxalacética) e alanina aminotransferase (ALT, TGP ou transaminase glutâmina-pirúvica) estão amplamente distribuídas nos tecidos humanos. Atividades

elevadas de AST são encontradas no miocárdio, fígado, músculo esquelético, com pequenas quantidades nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos (PEREIRA et al., 2005; MOTTA, 2003).

AST e ALT são enzimas intracelulares encontradas em grande quantidade nos hepatócitos, portanto lesões ou destruição dessas células liberam as enzimas para a circulação sanguínea. O ALT é encontrado principalmente no citoplasma do hepatócito e cerca de 80% do AST encontra-se nas mitocôndrias. Essa diferença tem auxiliado no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas, pois no dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática (ALT), enquanto que em lesões mais graves há liberação da enzima mitocondrial (AST), elevando a relação AST-ALT (HALFON et al., 2006; MOTTA, 2003).

Os níveis de aminotransferases séricas elevam-se de uma a duas semanas antes do aparecimento dos sintomas das hepatites virais agudas e o aumento pode atingir até 100 vezes o limite superior de normalidade dos valores de referência. Os valores começam a cair entre a terceira e a quinta semana após o desaparecimento dos sintomas, também podendo ser encontrados hiperbilirrubinemia e pequeno aumento de fosfatase alcalina sérica (BRASIL, 2005; MOTTA, 2003).

Nas hepatites auto-imunes e hepatites crônicas, de pacientes sintomáticos ou não, também há aumento das taxas de aminotransferases. Na presença de cirrose hepática de qualquer etiologia podem ser detectados níveis séricos cerca de cinco vezes maiores que os limites superiores de normalidade, dependendo do grau de comprometimento celular. Nesses casos, a atividade do AST tende a ser maior que a do ALT. A disfunção hepatocelular provoca falha na síntese de albumina, prolongamento do tempo de protrombina (TP), hiperbilirrubinemia, teores de amônia elevados e uremia baixa (BOULAAJAJ et al., 2005; MOTTA, 2003).

Aumento nas aminotransferases semelhantes ao padrão encontrado nas cirroses pode ser ocasionado por colestase extra-hepática, carcinoma de fígado, ingestão de álcool, durante o “*delirium tremens*” (psicose que pode ser causada pela abstinência ao consumo de álcool) e após a administração de alguns fármacos (opiáceos, salicilatos ou ampicilina) (MOTTA, 2003; PEREIRA et al., 2005).

A gama-glutamyltranspeptidase (γ -GT) está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídios através de membranas celulares, na síntese protéica e na regulação dos níveis de glutatíon tecidual e pode ser encontrada no fígado, vias biliares, rins, intestino, próstata, pâncreas, pulmões, cérebro e coração (BOULAAJAJ et al., 2005; MOTTA, 2003).

No fígado, a γ -GT está localizada nos canalículos das células hepáticas e, particularmente, nas células epiteliais que revestem os ductos biliares, portanto o principal valor clínico na avaliação da γ -GT é no estudo de alterações hepatobiliares. A γ -GT é mais sensível e duradoura que a fosfatase alcalina, as transaminases e a nucleotidase na detecção de icterícia obstrutiva, colangite e colecistite. São encontrados níveis moderadamente aumentados da enzima na presença de câncer de próstata e metástase hepática (BOULAAJAJ et al., 2005; HALFON et al., 2006; MOTTA, 2003).

A fosfatase alcalina pertence a um grupo de enzimas relativamente inespecíficas sendo amplamente distribuída nos tecidos humanos, principalmente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos), leucócitos e placenta. A forma predominante no soro de pacientes adultos normais origina-se no fígado e esqueleto e sua exata função metabólica ainda não é conhecida. No fígado, a fosfatase alcalina está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares (BOULAAJAJ et al., 2005; MOTTA, 2003).

A enzima encontra-se elevada em desordens do trato biliar, atingindo 2 a 3 vezes os valores de referência, podendo chegar a 10-15 vezes, dependendo do grau de estase biliar. Esses aumentos podem ser devido a fatores como: incremento na síntese da enzima; retenção de ácidos biliares no fígado, que solubilizam a fosfatase alcalina e removem a membrana plasmática dos hepatócitos; e regurgitação da enzima para a circulação pelo impedimento da excreção. As elevações nos valores ocorrem em lesões expansivas (carcinoma hepatocelular primário, metástases, abscessos e granuloma), hepatite viral e cirrose (pequenas elevações dos níveis), fármacos e outras desordens como mononucleose infecciosa e colangite (BOULAAJAJ et al., 2005; MOTTA, 2003).

3.4.4 Alterações histopatológicas

O grau de alteração hepática entre os pacientes portadores do vírus da hepatite C é variável e pode ser observado através de marcadores histológicos e imunohistoquímicos avaliados em biópsias de fígado de pacientes infectados (BRASIL, 2005; JOVANOVIC et al, 2004). A análise de fragmentos hepáticos é considerada como exame de referência (padrão ouro) para detecção dessas alterações, no entanto, é necessário avaliar cuidadosamente o paciente candidato à realização da biópsia, por ser um procedimento invasivo, com taxa de morbidade de 0,3 a 0,6% e de mortalidade de cerca de 0,05% (HALFON et al., 2006). Mello e Alves (2008) preconizam que, na ausência de contra-indicações clínicas, a biópsia deve ser realizada em todos os pacientes com RNA viral detectado através de técnicas moleculares.

Mudanças ocorridas no espaço porta-hepático, como infiltrado linfocitário e presença de macrófagos, lesões nos ductos biliares, esteatose e condensações nos citoplasmas dos hepatócitos, são correlacionadas com a intensidade dos danos no

fígado. A análise da população do infiltrado celular, a monitorização da viremia e dos níveis de necrose nos hepatócitos são necessários para uma melhor elucidação das vias de cronificação do HCV (BRASIL, 2005; DIENES et al., 1999; JOVANOVIC et al., 2004).

Através da análise de biópsias hepáticas, estudos demonstram que os achados mais frequentes em pacientes infectados pelo HCV são: hepatite crônica (70%), esteatose (7%) e há pacientes que ainda não apresentam lesões detectáveis (23%). A cirrose representa um estágio de evolução da fibrose hepática e é acompanhada de perda progressiva das funções hepáticas e de uma hipertensão portal, sendo que a presença do infiltrado de linfócitos no espaço porta apresenta-se como a característica histológica mais frequente, seguida de alterações nos ductos biliares, nos pacientes portadores de hepatite C crônica. A esteatose e corpos acidofílicos (marcador de apoptose para hepatites virais) foram encontrados em biópsias com estágios primários de alterações (CURCIARELLO et al., 1997; HALFON et al., 2006).

O nível de alterações celulares presente nas biópsias hepáticas pode ser classificado de acordo o escore de Metavir (Quadro 2) ao através dos critérios da Sociedade Brasileira de Patologia e Hepatologia (SBPH). Ambas são semelhantes e levam em consideração a atividade necro-inflamatória e o nível de fibrose, no entanto, a classificação da SBP subdivide a atividade necro-inflamatória em atividade periportal e atividade parenquimatosa (HALFON et al., 2006; MELLO e ALVES, 2008).

Quadro 2 Escore de Metavir.

Atividade necro-inflamatória	Fibrose
Sem atividade (A0)	Sem fibrose portal (F0)
Com atividade mínima (A1)	Fibrose portal sem septo (F1)
Com atividade moderada (A2)	Fibrose portal com septos raros (F2)
Atividade severa (A3)	Fibrose septal sem cirrose (F3)
	Fibrose septal com cirrose (F4)

O risco do desenvolvimento de câncer hepatocelular após o desenvolvimento de cirrose é de 1 a 5% ao ano. A progressão da fibrose não é um processo linear ao longo do tempo em um mesmo paciente, porém tende a seguir uma curva exponencial, e entre diferentes indivíduos é altamente variável, dependendo de fatores como idade, sexo, ingestão alcoólica, co-infecção com HIV e HBV, atividade necro-inflamatória, metabólica (diabetes, obesidade) e esteatose, além dos fatores virais, carga viral e genótipo (JOVANOVIC et al., 2004; HALFON et al., 2006).

3.4.5 Tratamento

O tratamento ideal contra o HCV deveria conseguir erradicar o vírus no início da doença, para prevenir a progressão desta, mas até o momento ainda não há esse tipo de terapêutica e também não se conseguiu desenvolver uma vacina eficaz contra o HCV. Drogas antivirais como a ribavirina e o interferon-alfa (α -IFN) são apenas parcialmente eficazes, sendo que nem sempre o tratamento dos infectados é indicado. Muitos pacientes crônicos tratados não respondem ao tratamento com α -IFN ou têm recidivas, e a associação do interferon com o antiviral ribavirina, além de ser

onerosa, só apresenta resposta favorável em cerca de 35 a 45% dos casos (YANG, 2008).

O Ministério da Saúde do Brasil (2008) preconiza que o tratamento da hepatite C crônica está indicado nos casos em que o portador do vírus possui diagnóstico por métodos moleculares (teste qualitativo de HCV), ter realizado biópsia hepática nos últimos 24 meses e no resultado houver evidências de atividade necro-inflamatória moderada a intensa (maior ou igual a A2 pelo escore de Metavir) e/ou presença de fibrose moderada a intensa (maior ou igual a F2 pelo mesmo escore), ter entre 12 e 70 anos, possuir contagem de plaquetas superior a 50.000/mm³ e de neutrófilos acima de 1.500/mm³ (BRASIL, 2008).

Ainda em concordância com o Ministério da Saúde do Brasil (2008), para possível utilização do interferon peguilado, além de possuir os requisitos acima relacionados, os pacientes precisam também se enquadrar nos seguintes critérios: ser portador do HCV genótipo 1 diagnosticado através de biologia molecular e genotipagem, e possuir contagem plaquetária superior a 75.000/mm³.

Pacientes portadores de hepatite C crônica genótipo 1 são tratados com interferon peguilado associado à ribavirina por um período de 48 semanas, os pacientes portadores dos genótipos 2 ou 3 são tratados com interferon convencional e ribavirina por 24 semanas e os portadores dos genótipos 4 e 5 poderão completar 48 semanas do mesmo tratamento empregado aos genótipos 2 e 3. Em caso de não responsividade e retratamento: indivíduos portadores do genótipo 1 previamente tratados com interferon peguilado e não responsivos, não é indicado retratamento; pacientes não-respondedores ou recidivantes após tratamento com interferon convencional associado ou não à ribavirina e independente do genótipo, indica-se o uso de interferon peguilado e ribavirina por 48 semanas (BRASIL, 2008).

Em conformidade com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde do Brasil (2008), não deverão fazer parte do protocolo de tratamento para HCV pacientes com tratamento prévio com interferon peguilado (associado ou não à ribavirina), consumo abusivo de álcool nos últimos 6 meses, hepatopatia descompensada, cardiopatia grave, doença da tireóide descompensada, neoplasias, diabetes melito tipo 1 de difícil controle ou descompensada, convulsões não controladas, imunodeficiências primárias, homens e mulheres sem adequado controle contraceptivo, gravidez confirmada (beta-HCG positivo) e não concordância em realizar o tratamento após exposição dos riscos e benefícios e assinatura de um termo de responsabilidade. Situações especiais como co-infecção HIV-HCV, pacientes pediátricos, com distúrbios psiquiátricos, com doença cérebro-vascular, coronária ou insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica, hemólise, hemoglobinopatias e supressão de medula óssea, hemofilia, cirrose compensada e usuários de drogas devem ter seus casos avaliados cuidadosamente (BRASIL, 2008).

Atualmente novas drogas têm sido testadas como as que agem em uma NS3 helicase recombinante, que desponta como promissora para eliminação da infecção, por agir na replicação viral (YANG, 2008).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência dos genótipos de HCV entre os pacientes atendidos no Programa de Hepatites do Núcleo de Medicina Tropical e correlacionar com os dados clínicos e epidemiológicos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o levantamento dos dados epidemiológicos destes pacientes;
- Destacar os principais fatores de riscos (internação hospitalar, presença de outras DSTs, e outros) para aquisição do HCV a que esses pacientes estavam expostos;
- Avaliar, através de exames (dosagem de ALT, AST, γ -GT e Fosfatase alcalina), os marcadores bioquímicos de lesão celular dos pacientes com hepatite C;
- Determinar a prevalência dos genótipos virais (1 a 6) do HCV entre os pacientes;
- Correlacionar os genótipos virais do HCV com os achados histopatológicos das biópsias hepáticas.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

5.1.1 Desenho do estudo

Esse é um estudo transversal analítico, em que foram mensuradas enzimas bioquímicas indicativas de alterações na função hepática dos pacientes com sorologia reagente (ELISA positivo) para o HCV e determinados os genótipos do vírus por técnicas de biologia molecular. Foram identificados os principais fatores de risco aos quais os pacientes estavam expostos através da avaliação do questionário epidemiológico (APÊNDICE 1), que possui informações como idade, sexo, uso de drogas, número de parceiros sexuais, transfusões sanguíneas, condições sócio-econômicas e de saneamento básico.

5.1.2 Local do estudo

Os pacientes eram encaminhados do HEMOPA, Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará, ao Programa de Hepatites Virais desenvolvidos pelo Núcleo de Medicina Tropical onde foram atendidos e avaliados. O estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

5.1.3 Aspectos éticos

Por se tratar de pesquisa com seres humanos, o projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (ANEXO 1). Esse trabalho faz parte do projeto intitulado “Vírus da Hepatite C: prevalência, fatores de risco e genotipagem”, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Luisa Caricio Martins.

Todos os participantes do estudo receberam esclarecimentos sobre a pesquisa e sua importância e foi solicitada sua permissão para participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2), conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

5.1.4 Caracterização da amostra

A amostra constituiu-se de 152 pacientes adultos, de ambos os sexos, com sorologia positiva (ELISA reagente) para infecção por HCV encaminhados do HEMOPA e sem tratamento prévio.

5.1.5 Critérios de inclusão e exclusão

5.1.5.1 Critérios de inclusão

- Indivíduos de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos;
- Possuir teste imunoenzimático (ELISA) reagente para pesquisa de anticorpos anti-HCV;

- Aceitar participar de forma livre e esclarecida (APÊNDICE 2) dessa pesquisa.

5.1.5.2 Critérios de exclusão

- Não participaram do estudo indivíduos menores de 18 anos;
- Portadores de deficiências mentais;
- Pessoas que não aceitaram participar da pesquisa;
- Pacientes co-infectados por HIV ou vírus da hepatite B;
- Pacientes tratados previamente para infecção por HCV.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Obtenção do material biológico

Foram colhidos em frasco sem anticoagulante 10 mL de sangue periférico dos pacientes participantes da pesquisa. As amostras sanguíneas passaram por processo de centrifugação, o soro foi separado e colocado em frasco estéril devidamente identificado. Os soros foram armazenados e resfriados de 2 a 8°C por até 3 dias.

Foram realizadas dosagens das enzimas transaminases (ALT e AST), gama-GT e fosfatase alcalina, com o intuito de avaliar a função hepática dos pacientes.

Também foi realizado um novo teste para pesquisa sorológica de anticorpos IgG totais anti-HCV por método imunoenzimático (ELISA) e os pacientes que apresentaram positividade tiveram seus resultados confirmados através de técnicas

moleculares (RT-PCR) com digestão enzimática para identificação do genótipo viral (genotipagem).

5.2.2 Classificação do consumo de álcool, fumo e drogas para as análises epidemiológicas

O cálculo do consumo de álcool foi realizado de acordo com a concentração dessa substância nas bebidas (rum com teor de 40%, bebidas destiladas com 55%, vinho com 12% e cerveja com 5%). A intensidade do consumo alcoólico foi calculada através da média do consumo diário em gramas e comparada com os níveis estabelecidos na literatura para 70g por semana para mulheres e 140g por semana para homens (DUFOUR, 1999). Indivíduos que consumiam semanalmente álcool com níveis iguais ou superiores aos valores estabelecidos acima foram classificados como de consumo frequente, já os que possuíam média de consumo abaixo dos referidos valores foram classificados como consumidores eventuais e os pacientes que não ingeriam bebidas alcoólicas foram denominados de não consumidores.

O consumo de tabaco foi calculado pela média do consumo diário, levando em consideração de cada cigarro feito à mão equivale a cinco cigarros manufacturados e os indivíduos foram classificados como fumantes frequentes (5 ou mais unidades por dia), fumantes eventuais (menos de 5 unidades por dia) ou não fumantes (não faziam consumo) (PELETEIRO et al., 2008).

O mesmo padrão de classificação foi utilizado para o consumo de drogas ilícitas, onde os usuários foram categorizados em consumidores frequentes, eventuais ou que nunca consumiram.

5.2.3 Diagnóstico sorológico da hepatite C

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

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

O primeiro poço da placa ficou para o branco da reação, na sequência da microplaca de ELISA, foram dispensados 200 µL do controle negativo em triplicata (3 poços), 200 µL do calibrador em duplicata (2 poços) e 200 µL do controle positivo em amostra única (1 poço).

Adicionou-se 200 µL do Diluente de Amostra em todos os poços que continham as amostras dos pacientes a serem dosadas, depois houve a dispensação de 10 µL do soro do paciente no poço correspondente e a homogeneização cuidadosa da placa de ELISA, a fim de retirar eventuais bolhas, porém tomando cuidado para não contaminar os poços adjacentes.

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

Após incubação, o líquido nos poços foi desprezado e houve a lavagem de cada poço da microplaca de 4 a 5 vezes com 300 µL da Solução de Lavagem diluída, sempre homogeneizando cuidadosamente, desprezando o conteúdo dos poços e tirando

o excesso de líquido (residual) dos poços vertendo a placa de ELISA sobre papel absorvente até completar o número de lavagens necessárias.

Foi pipetado 100 μL de Conjugado Enzimático, exceto no poço do branco, coberta novamente a microplaca de ELISA com adesivo e incubada por 45 min a 37°C. Após incubação, desprezou-se o líquido nos poços e ocorreu a lavagem de cada poço da microplaca de 4 a 5 vezes com 300 μL da Solução de Lavagem diluída, sempre homogeneizando cuidadosamente, desprezando o conteúdo dos poços e tirando o excesso de líquido (residual) dos poços vertendo a placa de ELISA sobre papel absorvente até completar o número de lavagens necessárias.

Foi acrescentado por pipetação 100 μL de Cromógeno/Substrato em todos os poços e homogeneizado. A microplaca foi incubada e protegida da luz intensa e direta, à temperatura ambiente (18-24°C) por 15 min. Pipetou-se 100 μL de Ácido Sulfúrico em todos os poços, na mesma ordem em que foi pipetado o cromógeno, para “parar” a reação enzimática e medir a absorbância da solução obtida em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

O teste foi validado de acordo com os valores do controle de qualidade preconizados pelo fabricante e que devem tanger os valores para o branco da reação $\leq 0,100$; controle negativo $\leq 0,050$; controle positivo $\geq 1,000$; e calibrador $\geq 1,100$. Para as amostras testadas, os valores reagentes e não reagentes para pesquisa de anticorpos anti-HCV tiveram interpretação da seguinte maneira: não reagentes com valores $\leq 0,9$; reagentes com valores $\geq 1,1$; e indeterminados entre os valores 0,9 – 1,1.

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

Nas amostras com sorológicas positivas (ELISA) foi realizada extração do RNA viral presente no soro do paciente, utilizando kit comercial (QIAmp Viral RNA kit, Quiagen, Alemanha).

Foram pipetados 560 μL de tampão AVL (lise) contendo RNA em tubo de centrífuga de 1,5 mL identificado, adicionados 140 μL da amostra e homogeneizado em vórtex por 15s; incubando a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 min. Após incubação, centrifugou-se rapidamente o tubo para remover partículas dispersas.

Adicionou-se 560 μL de etanol (96-100%) na amostra que posteriormente foi homogeneizada no vórtex por 15 s, e centrifugada rapidamente. Depois, cuidadosamente, foram transferidos 630 μL para as colunas devidamente identificadas, centrifugadas a 14.000 rpm por 1 min e descartada a parte de baixo, ficando só com a coluna para encaixar em outro tubo.

O resto das amostras foi colocado nas colunas devidas, centrifugadas a 14.000 rpm por 1 min e descartada a parte de baixo, ficando só com a coluna para encaixar em outro tubo. Lavou-se com 500 μL de tampão da lavagem (AW1) e houve nova centrifugação por 1 min, mantendo a coluna e descartando a parte de baixo. Lavou-se com 500 μL de tampão da lavagem (AW2) e realizada centrifugação por 4 min, mantendo a coluna e descartando a parte de baixo.

Os tubos para RNA foram identificados para colocar as colunas. Adicionou-se 60 μL de tampão para eluir (AVE) em cada amostra, que depois foram centrifugadas por 1 min, descartando a coluna e ficando com o tubo. Colocou-se em banho-maria por

10 min a 65°C, depois ocorrendo breve centrifugação e armazenamento imediato no gelo. As amostras extraídas foram congeladas e armazenadas em freezer a -20°C.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado de acordo com a técnica de RT-PCR qualitativa, e utilizou a região conservada 5 NCR do vírus. A metodologia foi adaptada no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais a partir da técnica obtida no Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, da seguinte maneira para o Mix de uma amostra: Tampão: 12 µL; *primer* ou iniciador k10: 1µL; *primer* ou iniciador k11: 1µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 5 µL; Enzima Taq polymerase One-Step (Invitrogen): 1 µL. O *primer* k10 constitui-se da sequência 5'GGC GAC ACT CCA CCA TRR3' e o *primer* k11 da sequência 5'GGT GCA CGG TCT ACG AGA CC3'.

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

Para visualização do produto dessa 1ª PCR (RT-PCR), foi feito um gel de agarose a 1% (1g de agarose para 100mL de tampão TEB 1X e 3 µL de brometo de etídio), que migrou na cuba de eletroforese com 100V, 500A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através de luz UV (ultravioleta). Os pacientes positivos, que apresentarem “banda” com fragmento de 279 pb, continuaram os procedimentos e os negativos, que não apresentaram “bandas” foram liberados como indetectáveis por este método (Figura 5).

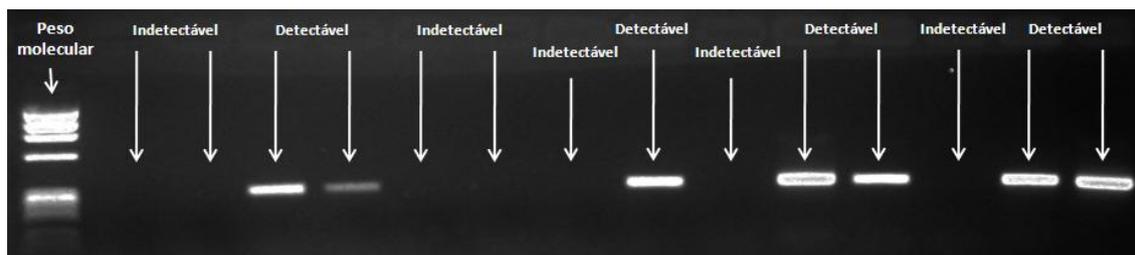


Figura 5 Visualização de “bandas” do produto da PCR em gel de agarose observado em luz ultra-violeta.

A 2ª PCR (RFLP) é responsável por fazer a amplificação do cDNA, produto da 1ª PCR. Para esta etapa, também com adaptações feitas no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais, foram necessários para o Mix de uma amostra: Tampão 10X: 2,5 µL; dNTP: 4 µL; MgCl₂: 1,5 µL; *primer* ou iniciador k15: 1 µL; *primer* ou iniciador k16: 1 µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 12,5 µL; Enzima Taq platinum (Invitrogen): 0,5 µL. O *primer* k15 constitui-se da sequência 5´ACC ATR RAT CAC TCC CCT GT3´ e o *primer* k16 da sequência 5´CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT3´.

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

O produto da 2ª PCR foi observado através de um gel de agarose a 1% (1g de agarose para 100 mL de tampão TEB 1X e 3 µL de brometo de etídio), que migrou na cuba de eletroforese com 100V, 500A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através de luz UV (ultravioleta). Os pacientes positivos, que apresentaram

“banda” (fragmento amplificado), continuaram os procedimentos e os negativos, que não apresentarem “bandas” foram repetidos para o procedimento da 2ª PCR para confirmar o resultado.

5.2.5 Determinação do genótipo do vírus

Os pacientes positivos para a 2ª PCR foram submetidos à genotipagem do vírus através do método de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), utilizando um par de enzimas de restrição, AVA II e RSA I. Essa técnica também foi adaptada no Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais à partir da técnica obtida no Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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

Para a preparação do mix de uma amostra para a enzima de restrição AVA II (Promega), foram utilizados: Buffer C X30: 2 µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 12,5 µL; AVA II: 0,5 µL. Para o mix de uma amostra de RSA I (Invitrogen), foram necessários: React 1 10X: 2 µL; água ultrapura livre de DNase e RNase: 11 µL; RSA I: 2 µL.

O volume do mix por amostra foi de 15 µL e o volume da amostra (produto da 2ª PCR) de 5 µL, perfazendo um volume total por tubo de 20 µL para cada microtubo correspondente a sua enzima de restrição. As amostras formaram “pares” de microtubos AVA II e RSA I e foram colocadas em banho-maria a 37°C durante à noite (12 a 16 horas) para digerir (cortar) os fragmentos.

Para visualização do produto da digestão (RFLP) e verificação dos genótipos, foi preparado um gel de agarose a 2% (2g de agarose para 100 mL de tampão TEB 1X e 3 μ L de brometo de etídio), que migrou em cuba de eletroforese com 100V, 500A por 60 minutos. Os resultados foram visualizados através de luz UV (ultravioleta). Os pacientes positivos apresentaram “bandas” de tamanhos diferentes. O número de bandas e sua disposição no gel formaram padrões de combinação correspondentes a cada genótipo viral (Figura 6).

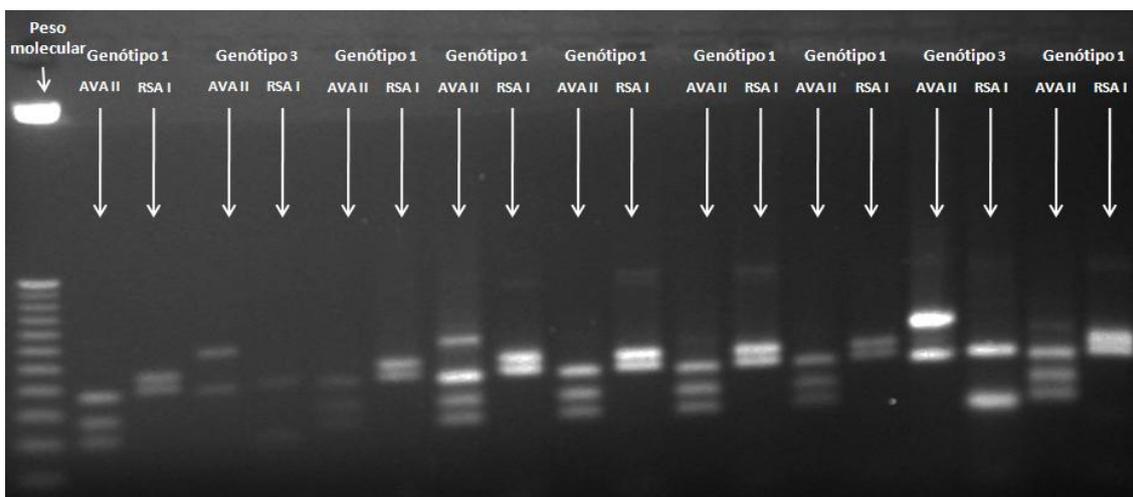


Figura 6 Visualização da combinação dos “cortes” feitos pelas enzimas de restrição AVA II e RSA I. Nesta figura é possível observar os genótipos 1 e 3.

5.2.6 Determinação das aminotransferases (ALT e AST), gama glutamiltransferase (γ -GT) e fosfatase alcalina

Os pacientes tiveram a função hepática avaliada através de dosagens bioquímicas, pela quantificação das aminotransferases, fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase. Os testes foram quantificados em aparelho semi-automatizado BIO-PLUS Bio 2000. Os kits comerciais cinéticos utilizados para as dosagens eram da marca

Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda, Minas Gerais, Brasil, e os procedimentos foram executados de acordo com a bula do fabricante.

A amostra de soro obtida não devia ser hemolisada, pois a atividade das enzimas é maior nos eritrócitos, podendo gerar um resultado falsamente elevado. Outros interferentes que podem alterar o resultado das dosagens são: alimentação antes da coleta (jejum menor que 8 horas), paracetamol, ampicilina, agentes anestésicos, cloranfenicol, codeína, cumarínicos, difenilhidantoína, etanol, isoniazida, morfina, contraceptivos orais, sulfonamidas e tiazidas (MOTTA, 2003).

Para quantificação de AST, identificou-se um tubo de ensaio e foram adicionados 1,0 mL de reagente de trabalho, equilibrando a temperatura de trabalho a 37°C por 2 minutos. Foi adicionada e homogeneizada rapidamente 0,1 mL da amostra a ser testada. A leitura do teste ocorreu através da mensuração da absorbância em 340 ou 365 nm. Os valores de normalidade para homens nesse kit são até 38 U/l e para mulheres até 31 U/l.

Na quantificação de ALT, identificou-se um tubo de ensaio e foram adicionados 1,0 mL de reagente de trabalho, equilibrando a temperatura de trabalho a 37°C por 2 minutos. Foi adicionada e homogeneizada rapidamente 0,1 mL da amostra a ser testada. A leitura do teste ocorreu através da mensuração da absorbância em 340 ou 365 nm. Os valores de normalidade para homens nesse kit são até 38 U/l e para mulheres até 31 U/l.

Para dosagem da γ -GT, identificou-se um tubo de ensaio e foram adicionados 1,0 mL de reagente de trabalho. Após a estabilização da temperatura de trabalho a 37°C por 2 minutos, adicionou-se 0,05 mL da amostra a ser testada, que foi rapidamente homogeneizada. A leitura da absorbância ocorreu em filtro de 405 nm. Os

valores de normalidade para homens nesse kit são de 7 a 45 U/l e para mulheres de 5 a 26 U/l.

Na dosagem da fosfatase alcalina, foi identificado um tubo de ensaio e adicionado 1,0 mL de reagente de trabalho. Após a estabilização da temperatura de trabalho a 37°C por 2 minutos, adicionou-se 0,02 mL da amostra a ser testada, que foi rapidamente homogeneizada. A leitura da absorbância ocorreu em filtro de 405 nm. Os valores de normalidade para ambos os sexos nesse kit varia de 80 a 300 U/l.

5.2.7 Avaliação histopatológica

Foi utilizado material de fígado proveniente de biópsias per cutâneas hepáticas colhidas no Hospital Universitário João de Barros Barreto e na clínica de Diagnóstico Dimagem, concedidas através de cota do SUS. O material a ser utilizado foi fixado em formalina à 10% tamponada, processado rotineiramente e incluído em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados e corados pela hematoxilina-eosina, pelas técnicas de tricromo de Masson, reticulina e Perls, sendo posteriormente analisados sob microscopia de luz.

A avaliação deste material foi feita de acordo com o protocolo descrito no escore de Metavir e Consenso de Hepatites Virais da Sociedade Brasileira de Patologia/Sociedade Brasileira de Hepatologia para o estadiamento da infecção dos pacientes.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no projeto de pesquisa foram inseridos em planilha no programa Excel 2007 e transportada para análise através de testes estatísticos adequados para cada variante, utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES, 2008). O nível de significância aceita foi de 95% ($p > 0,005$).

5.4 FONTES DE FINANCIAMENTO

Esse projeto foi aprovado e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará – FAPESPA (edital nº 035/2007).

6. RESULTADOS

O estudo incluiu 152 indivíduos acima de 18 anos com sorologia (ELISA) reagentes para HCV encaminhados do HEMOPA (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Pará) ao Programa de Hepatites Virais do Núcleo de Medicina Tropical.

Inicialmente serão apresentados os dados referentes aos indivíduos estudados, tais como idade, sexo, estado civil e nível de escolaridade, além dos fatores de risco para aquisição do HCV. Em seguida, serão avaliados e relacionados os resultados dos exames laboratoriais (dosagens bioquímicas, PCR, genotipagem e achados histopatológicos).

6.1 ANÁLISE SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICA

Analisando os dados obtidos, observou-se que houve um predomínio de indivíduos do sexo masculino (96/152) em relação ao sexo feminino (56/152) ($\chi^2=10,007$; $p=0,0016$). A média de idade encontrada foi de 45 anos, com faixa etária de 18 a 74 anos, a maioria dos pacientes possuía entre 38 e 57 anos, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 Distribuição faixa etária e gênero dos indivíduos estudados.

Faixa etária	Gênero		Total
	Masculino (%)	Feminino (%)	
18-27	6 (6,3)	3 (5,3)	9
28-37	15 (15,6)	17 (30,4)	32
38-47	24 (25,0)	19 (34,0)	43
48-57	42 (43,7)	10 (17,8)	52
58-67	7 (7,3)	5 (8,9)	12
>68	2 (2,1)	2 (3,6)	4
Total	96 (63)	56 (37)	152

Em relação à renda familiar mensal, verificou-se que 55,9% (85/152) dos indivíduos possuíam renda que compreende até dois salários mínimos. A distribuição da renda mensal pode ser observada na tabela 2.

Tabela 2 Distribuição da renda familiar mensal.

Renda familiar mensal	N (%)
< 1 salário	4 (2,6)
1 salário	29 (19,1)
2 salários	52 (34,2)
3 a 5 salários	56 (36,9)
> 5 salários	11 (7,2)
Total	152 (100)

Quanto ao grau de instrução ou nível de escolaridade se observou que 44,7% (68/152) possuíam baixo nível de escolaridade, e 42,8 (65/152) concluíram o ensino médio, e poucos ingressaram no ensino superior, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 Distribuição amostral quanto ao grau de instrução.

Grau de Instrução	N (%)
Semi-analfabeto	1 (0,7)
Ensino fundamental incompleto	23 (15,1)
Ensino fundamental completo	20 (13,2)
Ensino médio incompleto	24 (15,7)
Ensino médio completo	65 (42,8)
Ensino superior incompleto	9 (5,9)
Ensino superior completo	10 (6,6)
Total	152 (100)

As atividades ocupacionais foram agrupadas em classes e distribuídas em áreas de atuação como apresentado na tabela 4, sendo observada a maior concentração de indivíduos no setor de comércio e serviços, que abrangeu comerciantes, vendedores, manicures, cabeleireiras e autônomos, entre outros.

Tabela 4 Atividades ocupacionais dos indivíduos analisados por classes e áreas de atuação.

Ocupação	N (%)
Área administrativa	12 (7,9)
Construção civil	18 (11,9)
Educação	9 (5,9)
Segurança	10 (6,6)
Serviços gerais	18 (11,9)
Comércio e serviços	68 (44,7)
Aposentado	4 (2,6)
Estudante	5 (3,3)
Saúde	8 (5,3)

Em relação ao estado marital, 69,7% (106/152) dos indivíduos relataram ser casados ou manter uma união estável ($\chi^2=22,901$; $p=0,0001$). Outros estados civis com menor frequência podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5 Caracterização do estado civil da amostra analisada.

Estado civil	Frequência	%
Solteiro	44	28,9
Casado / união estável	106	69,7
Divorciado	1	0,7
Viúvo	1	0,7
Total	152	100

O consumo de álcool, tanto frequente quanto eventual, foi observado em 64,5% (98/152) dos indivíduos, porém o número de relatos de pacientes que não utilizava tabaco ou drogas ilícitas foi elevado, como observado na tabela 6.

Tabela 6 Consumo do álcool, tabaco e drogas ilícitas entre os pacientes do estudo.

	Frequentemente	Eventualmente	Nunca
	(%)	(%)	(%)
Consumo de álcool	20 (13,2)	78 (51,3)	54 (35,5)
Consumo de tabaco	14 (9,2)	34 (22,4)	104 (68,4)
Consumo de drogas ilícitas	17 (11,2)	2 (1,3)	133 (7,5)

6.2 FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DA INFECÇÃO PELO HCV

Quando avaliados, através da análise das respostas obtidas no questionário epidemiológico, os fatores de risco para aquisição do HCV observou-se que a maioria dos participantes do estudo (125/152) não utilizava preservativos em suas relações sexuais, não possuía histórico de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) (103/152) e teve até dois parceiros sexuais nos últimos dois anos (116/152), como demonstra a tabela 7.

Tabela 7 Fatores de risco para aquisição do HCV relacionados ao comportamento sexual.

Fatores de Risco	Variável	N (%)
Uso de preservativo	Sim	27 (17,8)
	Não	125 (82,2)
Histórico de DST	Sim	49 (32,2)
	Não	103 (67,8)
Nº de parceiros sexuais nos dois últimos anos	≤ 2	116 (76,3)
	≥ 3	36 (23,7)

Analisando outras variáveis também relacionadas a fatores de risco para possível aquisição ou facilitação de propagação do vírus da hepatite C destacou-se: o relato de internação hospitalar demonstrou significância estatística ($\chi^2=37,007$; $p=0,001$) e a não utilização de alicates de unha das manicures, usando “kits próprios”, porém os participantes afirmaram compartilhar esses kits com membros da família ($\chi^2=11,059$; $p=0,009$). Os principais dados referentes a fatores de risco podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 Análise de fatores de risco para aquisição do HCV.

Fatores de risco	Variável	N (%)
Alicates de unha da manicure	Sim	55 (36,2)
	Não	97 (63,8)
Piercing/tatuagem	Sim	23 (15,1)
	Não	129 (84,9)
Transfusão sanguínea	Sim	33 (21,7)
	Não	119 (78,3)
Hemodiálise	Sim	1 (0,7)
	Não	151 (99,3)
Exame de endoscopia	Sim	34 (22,4)
	Não	118 (77,6)
Internação	Sim	114 (75)
	Não	38 (25)
Cirurgias dentárias	Sim	73 (48)
	Não	79 (52)
Histórico de doenças infecciosas hepatotrópicas	Sim	35 (23)
	Não	117 (77)
Histórico familiar de HBV e HCV	Sim	16 (10,5)
	Não	136 (89,5)

6.3 AVALIAÇÃO DOS ACHADOS BIOQUÍMICOS, MOLECULARES E HISTOPATOLÓGICOS

Todas as 152 amostras dos pacientes incluídos no estudo com sorologia positiva para HCV (ELISA) foram testadas pelo método molecular de RT-PCR para detecção do RNA viral, onde 45 (29,6%) foram indetectáveis pelo método e 107 (70,4%) apresentaram positividade. Quanto aos genótipos virais encontrados, 97/107 (90,6%) pertenciam ao genótipo 1 e 10/107 (9,4%) ao genótipo 3 (figura 7).

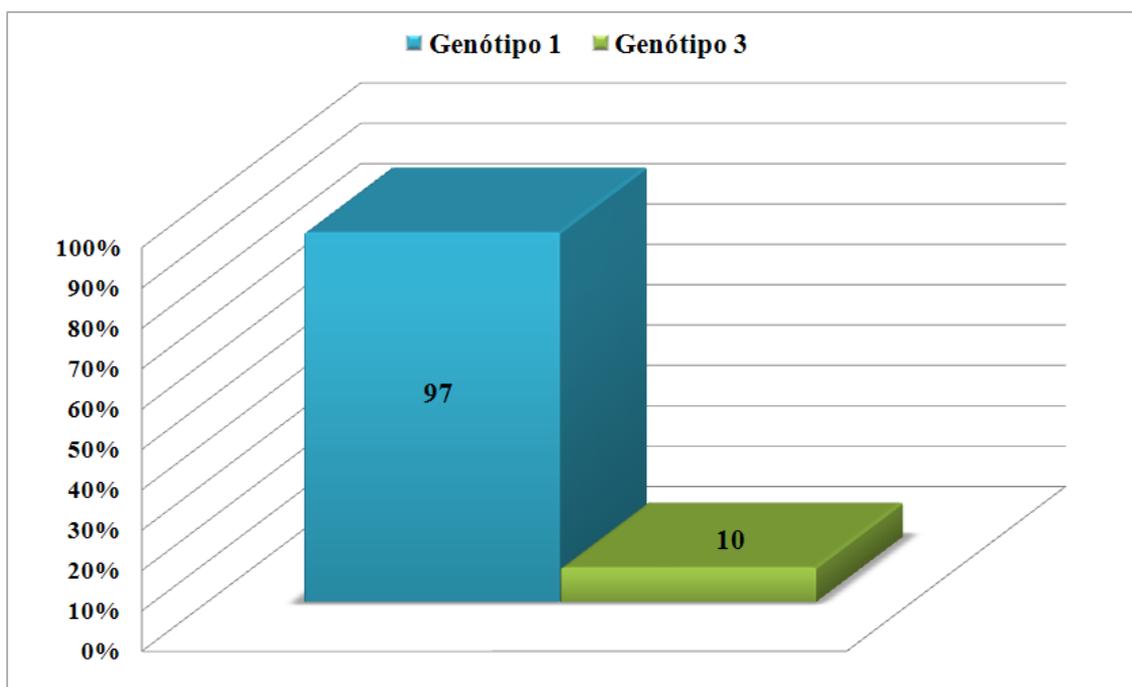


Figura 7 Genótipos virais dos 107 pacientes com RT-PCR positivo.

Analisando as dosagens bioquímicas das transaminases (ALT, AST), Gama GT e Fosfatase alcalina, com relação aos valores de referências dos kits comerciais utilizados, foi possível observar que não houve alterações significativas nos resultados, indicando que a maioria dos pacientes estava dentro da faixa de normalidade (tabela 9).

Tabela 9 Valores dos testes bioquímicos.

Valores bioquímicos	AST (%)	ALT (%)	Fosfatase alcalina (%)	γ-GT (%)
Normais	111 (73)	108 (71)	152 (100)	109 (72)
Alterados	41 (27)	44 (29)	-	43 (38)
Total	152	152	152	152

Correlacionando as dosagens bioquímicas de ALT, AST, Fosfatase alcalina e γ -GT com os genótipos virais, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre os genótipos 1 e 3, como demonstra a tabela 10.

Tabela 10 Associação entre dosagens bioquímicas e correlação com os genótipos virais.

Dosagem	<u>Genótipo 1</u>	<u>Genótipo 3</u>	p (bilateral)
	Média (escores)	Média (escores)	
AST (TGO)	41 (10-350)	34 (13-54)	0,8097
ALT (TGP)	44 (8-249)	36 (14-115)	0,7401
Fosfatase alcalina	112 (12-250)	96 (51-163)	0,2105
γ -GT	52 (5-432)	45 (10-172)	0,9190

Dos 152 pacientes participantes deste estudo, 65 realizaram coleta de biópsia hepática e exame histopatológico, sendo utilizado o Escore de Metavir para análise do grau de atividade portal (A) e fibrose (F). Segundo laudo histopatológico,

todos os pacientes tinham hepatite crônica. Observou-se que 29,3% (19/65) dos pacientes apresentaram atividade variando de grau 0 a 1 e 70,7% (46/65) entre os graus 2 e 3. Quanto ao nível de fibrose, 36,9% (24/65) apresentaram graus 0 a 1 e 63,1% (41/65) graus 2 a 4.

Comparando as dosagens bioquímicas com as alterações histopatológicas, não obtivemos concordância, pois pacientes portadores de fibrose (F2-F4), bem como, com atividade portal (A2-A3) apresentavam valores normais das enzimas hepáticas estudadas, como é possível verificar nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 Associação entre dosagens bioquímicas e atividades histopatológicas portais.

Dosagem	<u>A0 – A1 (19)</u>	<u>A2 – A3 (46)</u>	p (bilateral)
	Média (escores)	Média (escores)	
AST (TGO)	45 (17-98)	49 (12-350)	0,4446
ALT (TGP)	50 (10-158)	54 (10-249)	0,8853
Fosfatase alcalina	101 (50-143)	116 (12-250)	0,4028
γ -GT	84 (14-432)	58 (6-239)	0,2545

Tabela 12 Associação entre dosagens bioquímicas e fibrose.

Dosagem	<u>F0 – F1 (24)</u>	<u>F2 – F4 (41)</u>	p (bilateral)
	Média (escores)	Média (escores)	
AST (TGO)	46 (17-104)	49 (12-350)	0,2451
ALT (TGP)	54 (13-158)	53 (10-249)	0,1656
Fosfatase alcalina	97 (50-143)	119 (12-250)	0,0600
γ -GT	82 (14-432)	55 (6-239)	0,2161

Analisando as alterações histopatológicas e os genótipos virais pudemos encontrar associação destas variáveis, sendo o genótipo 1 relacionado a modificações histológicas mais intensas, como indicam os dados da tabela 13.

Tabela 13 Correlação dos genótipos virais e dos achados histopatológicos.

Característica histopatológica	Genótipo 1	Genótipo 3	p (bilateral)
	Média (escores)	Média (escores)	
Atividade neutrofílica	2 (A0-A3)	1 (A0-A1)	0,0189
Fibrose	2 (F0-F4)	1 (F0-F1)	0,0211

7 DISCUSSÃO

A variedade de manifestações clínicas, que transcorre de pacientes assintomáticos ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, os diferentes genótipos virais associados à progressão da doença e a diversidade de vias de contaminação fazem da infecção de vírus da hepatite C importante assunto para pesquisa (ABREU, 2007; AGUILERA, 2006; MARQUESINI et al., 2008; PASSOS, 2003).

Através da análise do questionário epidemiológico aplicado aos participantes, o estudo revela o predomínio de homens com média de idade de 45 anos, baixa renda e escolaridade, sendo a maioria trabalhadores dos setores de comércio e serviços. Esses achados corroboram com os encontrados por Miranda et al. (2004).

Um total de 64,5% dos pacientes estudados relatou fazer consumo frequente ou eventual de bebidas alcoólicas. O consumo frequente de álcool (DUFOUR, 1999) pode estar relacionado a alterações dos marcadores bioquímicos, sem que necessariamente haja infecção pelo HCV ou, quando presente, a infecção apresente características mais severas. Outros estudos demonstram que o uso abusivo de álcool representa uma das principais causas de cirrose e é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular tendo um efeito sinérgico na presença do HCV (BOULAAJAJ et al., 2005; PERZ et al., 2006).

Muitos indivíduos afirmaram ser casados ou manter uma união estável, porém 82,2% do total de participantes não utilizavam preservativos e 76,3% disseram ter mantido relações sexuais com até 2 parceiros nos últimos dois anos. Quando questionados sobre a presença de DST, 67,8% disseram que não possuíam ou não tinham conhecimento de terem histórico dessas doenças. Estudos como os de Cavalheiro (2007) e Fagundes et al. (2008) indicam que apesar da via sexual não ser

uma rota efetiva para transmissão do HCV, a multiplicidade de parceiros (3 ou mais nos últimos dois anos), a não utilização de preservativos e a coinfeção com outras doenças DST, principalmente o HIV, aumentam o risco de transmissão de HCV, dados que reforçam os achados deste trabalho.

De acordo com Aguilera et al. (2006), Brasil (2006, 2008) e Lopes et al. (2009), o HCV é quase exclusivamente transmitido via parenteral através da exposição ao sangue contendo as partículas virais, como no compartilhamento de utensílios para colocação de *piercing* e confecção de tatuagens. Instrumentos hospitalares e o compartilhamento de alicates de unhas não só das manicures, como também entre os membros da família, também são fatores de risco destacados em vários estudos epidemiológicos (AGUILERA et al., 2006; AQUINO et al., 2008; LOPES et al., 2009).

Resultados similares foram observados neste estudo onde uma grande proporção dos pacientes relatou internação hospitalar. Quanto à utilização de alicates de unha, 36,2% dos pacientes relataram utilizar os das manicures e dos 63,8% que possuíam alicate próprio, todos compartilhavam entre seus familiares esse utensílio.

Dados da literatura indicam que em mais de um terço dos casos não é possível identificar claramente a fonte de infecção (AGUILERA et al., 2006; AQUINO et al., 2008; LOPES et al., 2009).

Das 152 amostras sorologicamente positivas para HCV, 45 foram indetectáveis e 107 positivas para detecção do RNA viral por RT-PCR, sendo o genótipo viral 1 (90,6%) o mais prevalente seguido do genótipo 3 (9,4%). Os genótipos virais 2, 4, 5 e 6 não foram visualizados nas amostras analisadas. Outros estudos realizados na região Norte descrevem somente a presença dos dois genótipos (1 e 3), sendo o genótipo 1 o mais prevalente (PARANÁ et al., 2007; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010), no entanto, no restante das regiões brasileiras é encontrado o genótipo 2 com

prevalência maior que 3% e os genótipos 4 e 5 em baixas frequências na região Sudeste (DUARTE, 2006; LOPES et al., 2009, SILVA et al., 2006; ZARIFE et al., 2006).

Nesse estudo, as dosagens das transaminases (ALT e AST), γ -GT e Fosfatase alcalina não se mostraram bons marcadores para avaliar o grau de alteração da função hepática de pacientes portadores de infecção pelo HCV. Trabalhos relatados na literatura, como os de Marquesine et al. (2008) e Pereira et al. (2005) indicaram resultados semelhantes e Boulaajaj et al. (2005) afirmou que aproximadamente metade dos pacientes com hepatite crônica têm transaminases normais.

Quanto a associação encontrada entre o genótipo 1 e as alterações histopatológicas mais intensas presentes nas biópsias hepáticas, estudos com os de Barbosa et al., 2005, Jovanovic et al., 2004 e Tomei et al., 2005 encontraram resultados concordantes com os deste estudo.

8 CONCLUSÃO

Dos 152 pacientes com sorologia positiva para anticorpos anti-HCV analisados, verificou-se que:

- A amostra foi caracterizada com predomínio de indivíduos do sexo masculino, média de idade de 45 anos e baixo nível de escolaridade.
- A renda familiar mensal foi, em sua maioria, de até dois salários mínimos; e as atividades ocupacionais com maior concentração foram na área de comércio e serviço, que abrange comerciantes, vendedores, manicures, entre outros.
- A maioria dos indivíduos era casado ou mantinha união estável; e o consumo de álcool frequente e eventual representou mais da metade dos avaliados.
- Quanto aos fatores de risco para a aquisição viral, destacaram-se a não utilização de preservativos nas relações sexuais; a multiplicidade de parceiros (mais de 2 nos últimos dois anos); o histórico de internação hospitalar; e o compartilhamento de kits de manicure.
- O RNA viral foi encontrado em 107 das 152 amostras analisadas, havendo predomínio do genótipo 1 (97/107), seguido do genótipo 3 (10/107) e os outros genótipos não foram encontrados.
- Através dos testes bioquímicos realizados para análise da função hepática dos pacientes, não houve alteração significativa nos resultados quando comparados com os genótipos virais nem com as alterações histopatológicas.
- Foram realizadas biópsias hepáticas de 65 pacientes com indicação para o referido procedimento. Comparando os genótipos virais e os achados histopatológicos, observou-se maiores modificações histológicas em pacientes portadores do genótipo 1 do vírus.

9 REFERÊNCIAS

ABREU, C. Hepatites víricas em viajantes. **Acta Med Port** v. 20, p. 557-566, 2007.

AGUILERA, G.A.; ROMERO, Y.S.; REGUEIRO, B.J. Epidemiology and clinical manifestations of viral hepatitis. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v.24, n. 4, p. 264-76, 2006.

ANZOLA, M; BURGOS, J.J. Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. v. 5, n. 28, p. 1-16, nov. 2003.

AQUINO, J.A; PEGADO, K.A; BARROS, L.P; MACHADO, L.F.A. Soroprevalência de infecções por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C em indivíduos do Estado do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 45, n. 4, p. 334-337, jul/ago 2008.

AYRES. M, AYRES JUNIOR M. Bio Estat 5.0: aplicações estatísticas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. MCT-CNPq, 2008.

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

BOULAAJAJ, K; ELOMARI, Y; ELMALIKI, B; MADKOURI, B; ZAID, D; BENCHEMSI, N. Infections virales: VHC, VHB et VIH chez les hémodialyses, CHU Ibn-Rochd, Casablanca. **Néphrologie & Thérapeutique**, v.1, n.5, p. 274-284, nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília, DF, 2005.

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

BRASILEIRO FILHO, G. **Luigi Bogliolo Patologia Geral** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 216-220.

CALLENS, N; CICZORA, Y; BARTOSCH, B; VU-DAC, N; COSSET, F.L; PAWLOTSKY, J.M; PENIN, F; DUBUISSON, J. Basic Residues in Hypervariable Region 1 of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Contribute to Virus Entry. **Journal of Virology**; v. 79, n. 24, p. 15331-15341, dec. 2005.

CAVALHEIRO, N. P. Review: sexual transmission of hepatitis C. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.49, n. 5, p. 271-277, sep/oct. 2007.

CHANG, M.H. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in children. **Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol**; v. 14, n. 2, p. 341-350, apr. 2000.

CURCIARELLO, J.O; CASTELLETTO, R; VASSIA, M.A; VIOLA, M; CHIERA, A; PISCOPO, G; BARBERO, R; BELLONI, P; JMELNITZKY, A.C. Liver histopathological characteristics in patients with HCV-positive sera. **Acta Gastroenterol Latinoam**; v. 27, n. 1, p. 15-18, 1997.

DIENES, H.P; DREBBER, U; VON BOTH, I. Liver biopsy in hepatitis C. **J Hepatol**, v. 31, p. 43-46, 1999. Suple. 1.

DUARTE, C.A.B. Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em tempo-real. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Curitiba, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 58 f.

DUFOUR, M.C. What Is Moderate Drinking? Defining "Drinks" and Drinking Levels. **Alcohol Research & Health**, v. 23, n.1, p. 5-14, 1999.

ESTEBAN, J.I; SAULEDA, S; QUER, J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe (Review). **Journal of Hepatology**, v. 48, n.1 , p. 148-162, 2008.

FAGUNDES, G.D; BONAZZA, V; CERETTA, L.B; BACK, A.J; BETTIOL, J. Detection of the hepatitis C virus in a population of adults. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 16, n. 3, p. 396-400, mai/jun 2008.

FLINT, M; QUINN, E.R; LEVY, S. In search of hepatitis C virus receptor(s). **Clinical Liver Disease**, v. 5, n.1, p. 873-893, 2001.

HALFON, P; BOURLIÈRE, M; PÉNARANDA, G; CACOUB, P. Les marqueurs sanguins non invasifs de fibrose hépatique au cours de l'infection chronique par le virus de l'hépatite C. **La Revue de Médecine Interne**, v. 27, p. 751-761, 2006.

JEROME, K.R.; GRETCH, D.R. Laboratory approaches to the diagnosis of hepatitis C virus infection. **Minerva Gastroenterol Dietol**. v. 50, n. 1, p. 9-20, 2004.

JOVANOVIĆ, M; KONSTANTINOVIĆ, L; KATIĆ, V; CIRIĆ, S; KOSTIĆ, V; JOVANOVIĆ, B. Histopathologic and immunocytochemical changes in the liver in patients with chronic hepatitis C. **Voinosanit Pregl**. v. 61, n. 1, p. 29-34, jan/fev 2004.

LOPES, C.L.R; TELES, S.A; ESPÍRITO-SANTO, M.P; LAMPE, E.; RODRIGUES, F.P; MOTTA-CASTRO, A.R.C; MARINHO, T.A; REIS, N.R; SILVA, A.M.C; MARTINS, R.M.B. Prevalência, fatores de risco e genótipos da hepatite C entre usuários de drogas. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, ago. 2009. Suple. 1.

MAJOR, M.E; FEINSTONE, S.M. The Molecular Virology of Hepatitis C. **Hepatology**. v. 25, n. 6, p. 1527-1538, 1997.

MARQUESINI, G; GONÇALES, N.S.L; GONÇALES JÚNIOR, F.L. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite C (VHC) em hemodialisados. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 10, n. 1, p. 23-27, 2008.

MARTINS, R.M; TELES, S.A; FREITAS, N.R; MOTTA-CASTRO, A.R; SOUTO, F.J; MUSSI, A; AMORIM, R.M; MARTINS, C.R. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 48, n.1, p. 53-55, 2006.

MELLO, E.S; ALVES, V.A.F. Hepatite crônica pelo vírus C – Anatomia Patológica. **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepatite C**, São Paulo, v.1, p. 48-53, 2008.

MIRANDA, E.C.B.M; MOTA, L.J.P; AMARAL, I.S.A; BARBOSA, M.S.B; CONDE, S.R.S.S.; ARAÚJO, M.T.F; CRUZ, E.R.M; DEMACHKI, S; BENSABATH, G; SOARES, M.C.P. Infecções pelos vírus das hepatites B e C e o carcinoma hepatocelular na Amazônia Oriental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 11, p. 47-51, 2004.

MOTTA, V.T. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações 4ª ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2003. cap. 9, p. 112-120.

OLIVEIRA-FILHO, A.B; PIMENTA, A.S.C; ROJAS, M.F.M; CHAGAS, M.C.M; CRESCENTE, J.A.B; CRESPO, D.M; LEMOS, J.A.R. Prevalence and genotyping of hepatitis C vírus in blood donors in the state of Pará, Northern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 103-106, 2010.

PARANÁ, R; PAIVA, T; LEITE, M.R; OLIVEIRA, F.N; LOBATO, N. C; DANTAS, T; TAVARES NETO, J. Infection with hepatitis C vírus among health care workers in the brazilian western amazon region (Rio Branco, state of Acre). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 76, n. 1, p. 165-169, 2007.

PASSOS, A.D.C; Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. **Medicina**, Ribeirão Preto, n. 36, p. 30-36, jan/mar. 2003.

PELETEIRO, B.; BASTOS, J; BARROS, H.; LUNET, B. Systematic review of the prevalence of gastric intestinal metaplasia and its area-level association with smoking. **Gac Sanit.** v 22, n. 3, p. 236-247, 2008.

PEREIRA, H.M.V; CAVALHEIRO, N.P; TENGAN, F.M; MELO, C.E; MELLO, E.S; BARONE, A.A. Patients with chronic hepatitis C and normal transaminases. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** v. 47, n. 5, p. 247-251, sep/oct 2005.

PERZ, J.F; ARMSTRONG, G.L; FARRINGTON, L.A; HUTIN, Y.J.F; BELL, B.P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **Journal of Hepatology**; v. 45, n.4, p. 529-538, oct 2006.

PROMRAT, K; LIANG, T.J. Chemokine Systems and Hepatitis C Virus Infection: Is Truth in the Genes of the Beholders? **Hepatology**; v. 38, n. 6, p. 1359-1362, 2003.

RICE, C. 2010. Disponível em:

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HCV_EM_picture.png>. Acesso em: 08/07/2011.

RICE, C.M; LINDENBACH, B.D. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**. n. 436, p. 933-938, 2005.

SILVA, L.K; SILVA, M.B; RODART, I.F; LOPES, G.B; COSTA, F.Q; MELO, M.E; GUSMÃO, E; REIS, M.G. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res**. v. 39, n. 5, p. 595-602, 2006.

STRAUSS, E; TEIXEIRA, M.C.D. Quality of life in hepatitis C. Review Article. **Liver International**. v. 26, p.755-765, 2006.

TOMEI, L; ALTAMURA, S; PAONESSA, G; DE FRANCESCO, R; MIGLIACCIO, G. HCV antiviral resistance: the impact of in vitro studies on the development of antiviral agents targeting the viral NS5B polymerase. **Antivir Chem Chemother**. v. 16, n. 4, p. 225-245, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.25, p. 705-740.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *et al.* **Microbiologia** 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C. An Introduction. Disponível em <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index1.html>. Acesso em: 10.01.10.

WORLD HEALTH ORGANIZATION apud HEALTH PROTECTION AGENCY. **Hepatitis C**. May 2008. Disponível em http://www.nathnac.org/pro/factsheets/hep_c.htm . Acesso em 07.02.10.

YANG, J; LEI, Y.F; YIN, W; WEI, S.H; AN, Q.X; LV, X; HU, X.B; XU, Z.K. Production and Characterization of Monoclonal Antibody Specific for NS3 Helicase of Hepatitis C Virus. **Hybridoma**. v. 27, n. 3, p. 181-186, 2008.

YU, X; QIAO, M; ATANASOV, I; HU, Z; KATO, T; LIANG, T.J; ZHOU, Z.H. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. **Virology**. n. 367, p. 126-134, 2007.

ZARIFE, M. A. S. A; OLIVEIRA, E. C. P; ROMEU, J. M. S. L; REIS, M. G. Detecção do genótipo 4 do vírus da hepatite C em Salvador, BA. Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 6, p. 567-569, nov/dez 2006.

10 APÊNDICES

Apêndice 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROJETO: Vírus da Hepatite C: prevalência, fatores de risco e caracterização de subtipos virais.

I - IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Idade: _____
 Sexo: () Masc. () Fem. Peso _____ Altura _____ Cor: _____
 Naturalidade: _____ Data de nascimento ____/____/____
 Residência atual _____
 Tempo de residência: _____ Telefones: _____
 Paciente encaminhado por qual instituição? _____

II – ESTILO DE VIDA

Estado Marital: () Solteira () Casada () União estável
 Uso de preservativo: () Sempre () Algumas vezes () Nunca
 Uso de anticoncepcional: () Sim () Não Qual? _____
 Uso de álcool: () Frequentemente () Eventualmente () Nunca
 Fumo: () Frequentemente () Eventualmente () Nunca
 Uso de drogas: () Sim () Não Qual? _____
 Idade da primeira relação sexual _____ Nº de parceiros nos últimos dois anos _____
 Já teve alguma DST? () Sim () Não Qual? _____

III – CONDIÇÃO DE SAÚDE

Já realizou exame de endoscopia? () Não () Sim Quando e quantas vezes? _____
 Transfusão sanguínea? () Não () Sim Quando e quantas vezes? _____
 Transplantes de órgãos? () Não () Sim Quando e quantas vezes? _____
 Hemodiálise () Não () Sim Quando e quantas vezes? _____
 Internação hospitalar () Não () Sim Quando e quantas vezes? _____
 Doenças : Diabetes () Não () Sim
 Hipertensão () Não () Sim
 Cardiopatas () Não () Sim
 Distúrbios renal () Não () Sim
 Doenças infecciosas () Não () Sim Qual? _____
 Outras? _____

Toma algum medicamento controlado? () Não () Sim Qual? _____

IV- ANTECEDENTES FAMILIARES:

1- Alguém familiar já teve hepatite? Sim () Não ()
 Quem e qual? _____

V - CONDIÇÕES HABITACIONAIS

Saneamento: () Bom () Razoável () Ruim
 Abastecimento de água: () Encanada () Poço () Rios e lagos
 Fossa: () Sanitária () Fossa Negra
 Número de pessoas na casa: _____ Adultos () Crianças ()
 Número de cômodos da casa: _____

VI – CONDIÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS

Escolaridade _____ Profissão: _____

Salário Familiar

 < que 1 mínimo de 3 a 5 mínimos 1 mínimo de 5 a 10 mínimos 2 mínimos > que 10 mínimos

Utensílios domésticos:

1. Geladeira: Sim Não2. Freezer: Sim Não3. TV: Sim Não4. Som: Sim Não5. Microondas: Sim Não6. Sofá: Sim Não**Responsável pela coleta:** _____

Apêndice 2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL****TERMO DE ESCLARECIMENTO E CONSENTIMENTO LIVRE**

PROJETO: Vírus da Hepatite C: prevalência, fatores de risco e genotipagem.

Esta pesquisa possui como principal objetivo estudar a prevalência da infecção pelo vírus HCV nos pacientes atendidos no programa de Hepatites do Núcleo de Medicina Tropical. Para tanto é necessário coletar sangue, com essa finalidade prestamos os seguintes esclarecimentos:

- 1- Serão realizados exames de sangue para pesquisar a infecção pelos vírus HCV.
- 2- A pesquisa oferece riscos mínimos para o participante, referente à coleta de sangue que será realizada por profissional treinado.
- 3- O benefício para quem participa da pesquisa é a realização dos exames que auxiliaram no diagnóstico e tratamento da doença.
- 4- Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do participante para sua realização.
- 5- Os resultados dos exames realizados pela pesquisa serão usados como dados da pesquisa, omitindo-se a identidade do participante.
- 6- Somente o pesquisador responsável e o médico ficarão sabendo da participação e se for necessário, autoridades de saúde poderão ser informados para tomar medidas que beneficiem o participante da pesquisa ou outras pessoas.
- 7- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

Solicitamos assim, a sua autorização para efetuarmos o referido exame e realizarmos uma entrevista, sendo que a mesma é confidencial; para desenvolvermos o estudo em questão.

CONSENTIMENTO

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

Belém, / _____ / _____

ASSINATURA DO PACIENTE

Pesquisador Responsável: Dra. Luisa Caricio Martins, End. Avenida Generalíssimo Deodoro, n° 92,
Núcleo de Medicina Tropical CEP: 66055-240 – Fone: 32016812

11 ANEXO



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

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº039/2007-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** VIRUS DA HEPATITE C: PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E GENOTIPAGEM.
3. **Pesquisador Responsável:** Luisa Caricio Martins.
4. **Instituição / Unidade:** UFPA.
5. **Data de Entrada:** 10/10/2007.
6. **Data do Parecer:** 30/10/2007.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela durante a reunião realizada no dia 30/10/2007. Considerando que, embora tenham sido atendidas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS, é importante acatar às seguintes recomendações :

- Indispensável ajustar o cronograma de atividades e esclarecer detalhadamente os critérios de inclusão e exclusão.

Parecer: **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO.**

Belém, 31 de outubro de 2007.

Profº Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.