



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS E QUASISPECIES DO
VÍRUS DA HEPATITE C E RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES
RENAIS CRÔNICOS**

LAURA PATRICIA VIANA CHAVES

MANAUS

2011

LAURA PATRICIA VIANA CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS E QUASISPECIES DO
VÍRUS DA HEPATITE C E RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES
RENAIS CRÔNICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Doutorado Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Adriana Malheiro Alle Marie

**MANAUS
2011**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C512c Chaves, Laura Patricia Viana
Caracterização dos subtipos e quasispecies do vírus da Hepatite C e resposta imune em pacientes renais crônicos / Laura Patricia Viana Chaves . 2011
123 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adriana Malheiro Alle Marie
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite C. 2. Hemodialisados. 3. Quasispecies. 4. Resposta imune. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

LAURA PATRICIA VIANA CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS E QUASISPECIES DO
VÍRUS DA HEPATITE C E RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES
RENAIS CRÔNICOS**

Aprovada em 15 de dezembro de 2011.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Adriana Malheiro - Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Jonny Yokosawa - Membro
Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Profª. Dra. Aya Sadahiro - Membro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Cristovão Alves Costa - Membro
Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA)

Prof. Dr. Daniel Saito – Membro
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Aos meus pais *Francisco e Conceição*, que sempre
dedicaram o seu amor ao meu desenvolvimento.

Ao *Angelito*, pelo apoio e companheirismo em todos os
momentos.

Aos meus irmãos *Helena e Adriano*, pelos momentos de
ausência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e em especial:

À minha amiga e orientadora Adriana Malheiro, exemplo de responsabilidade, dedicação e sabedoria, que incentivou e deu apoio para ampliar o meu conhecimento científico. Agradeço pelo incentivo.

À Divisão de hepatites virais do Centers for Diseases control and prevention – CDC, especialmente ao Dr. Yury Kudryakov, Gilberto Vaugham, Davi Campos e Lilian Genova que me acolheram para realização das técnicas de biologia molecular, mostrando novas possibilidades de pesquisas. Agradeço por esta conquista.

Ao amigo Jonny que me deu apoio para superar alguns obstáculos do caminho. Agradeço por esta conquista.

À amiga Kátia Torres que me acolheu na iniciação científica no HEMOAM. Agradeço por esta conquista.

Ao Dr. Rolandro Vermehren, por ter permitido a realização deste trabalho na Clínica Renal de Manaus. À toda a equipe da Clínica e especialmente a Selma por sua atenção durante o desenvolvimento da pesquisa. Agradeço a colaboração e atenção de todos.

Ao Felicien Vasquez e Edson Lira por terem ajudado na análise estatística dos dados do trabalho. Muito obrigada.

Ao grupo de pesquisa do HEMOAM, que torceram pela realização desse trabalho. Muito Obrigada.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de concretização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa de Doutorado.

À FAPEAM, HEMOAM e CDC pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A hepatite C representa um importante problema de saúde pública devido à alta prevalência da infecção na população. O HCV apresenta regiões antigênicas que ativam uma intensa resposta imune inata e adaptativa. No entanto ocorrem falhas durante a defesa na fase inicial da infecção e aproximadamente 80% dos pacientes evoluem para uma doença crônica. Somente 15-20% dos pacientes infectados conseguem eliminar o vírus e evoluir para a cura. Os mecanismos pelo qual o HCV evade-se do sistema imunológico são diversificados como: variabilidade dos nucleotídeos, inibição da expressão de HLA, o bloqueio da apoptose e da produção de anticorpos. Este estudo teve como objetivo caracterizar os subtipos do HCV e suas variações (quasispecies) e avaliar a resposta imune em amostras obtidas de pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise. Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as técnicas de EPLD-PCR e 454 sequencing para análise de quasispecies. Foi feita a imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico, através da citometria de fluxo e a dosagem de citocinas por ELISA. Nossos resultados mostraram que entre os paciente RC o genótipo/subtipo com maior prevalência foram 1a,1b e 3a, e que a população viral circulante em cada paciente é constituída em média de 13 quasispecies. A análise filogenética das quasispecies demonstrou casos de transmissão nosocomial, entre dois grupos de pacientes as variantes encontradas sugeriram a mesma fonte de infecção e um terceiro grupo de pacientes apresentaram variantes com uma relação mais próxima. Pacientes RC apresentaram diminuição de LTCD4 quando comparados com os renais crônicos infectados pelo HCV. Pela análise de correlação observou-se que a IL-4 influenciou de forma positiva na formação de quasispecies, enquanto que a IL-10, parece estar relacionada com a diminuição das quasispecies. Os resultados do presente estudo nos sugerem que o procedimento de hemodiálise contribui para induzir o HCV a passar por uma ampla diversidade viral para estimular mecanismos de escape do sistema imune e dessa forma a induzir a infecção crônica e que também pode ser uma via de transmissão nosocomial.

Palavras-chaves: HCV, quasispecies, hemodialisados, resposta imune

ABSTRACT

Hepatitis C is a major public health problem due to the high prevalence of infection in the population. HCV has antigenic regions that activate a strong innate and adaptive immune response. However, failures occur during the defense in the initial infection and approximately 80% of patients develop a chronic disease. Only 15-20% of infected patients can suppress the virus and progress to recovery. The mechanisms by which HCV evades the immune system is very diverse as: nucleotides variability, inhibiting the HLA expression, blocking apoptosis and antibody production. This study aimed to characterize HCV subtypes and its variants (quasispecies) and evaluate the immune response in samples obtained from patients with chronic renal failure on hemodialysis. To develop this work we used the techniques of EPLD-PCR and 454 sequencing for analysis of quasispecies. It was made immunophenotyping of peripheral blood leukocytes by flow cytometry and cytokine ELISA. Our results showed that among patients RC genotype / subtype with the highest prevalence were 1a, 1b and 3a, and the circulating viral population in each patient consists of about 13 quasispecies. The phylogenetic analysis of the quasispecies demonstrated cases of nosocomial transmission, between two groups of patients the variants found suggested the same source of infection and a third group of patients presented variants with a closer relationship. CR patients showed a decrease in LTCD4 when compared to HCV-infected chronic renal patients. Through correlation analysis, it was observed that IL-4 had a positive influence on the formation of quasispecies, while IL-10 seems to be related to the decrease in quasispecies. The results of the present study suggest that the hemodialysis procedure contributes to inducing HCV to undergo a wide viral diversity to stimulate immune system escape mechanisms and thus induce chronic infection and that it can also be a nosocomial transmission route.

Key-words: HCV, quasispecies, hemodialyzed, immune response

LISTA DE ABREVIATURAS

Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
AST	Aspartato aminotransferase
CD	Grupamento de diferenciação ou <i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DST	Doença sexualmente transmissível
DC	Célula dendrítica (Dendritic cell)
E	Proteína do envelope
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático ou <i>enzyme linked immuno assay</i>
EPLD-PCR	<i>End-point limiting-dilution – polymerase chain reaction chain</i>
FWD	<i>Forward</i> ou sense
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HD	hemodiálise
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEM	Hemodialisado
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HTLV	Vírus linfotrópicos de células T humanas
HVR1	Região hipervariável tipo 1
FHEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e estatística
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IRC	Insuficiência renal crônica
ISDR	Região determinante de sensibilidade ao interferon
LTc	Linfócitos T citotóxicos

LTh1	Linfócitos T helper (auxiliar) 1
LTh2	Linfócitos T helper (auxiliar) 2
NK	Células natural Killer
NS	Região não-estrutural
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase de leitura aberta ou <i>Open reading frame</i>
PBS	Solução fisiológica tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PPT	Tubo de preparação de Plasma
RC	Renais crônicos
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase – Transcriptase reversa
RVS	<i>Reverse</i> ou anti-sense
SRB1	Receptor scavenger classe B tipo 1
ssDNA	Ácido desoxirribonucléico fita simples
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
UDI	Usuário de droga injetável
UTR	Região não traduzida

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
L	Litro
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm ³	Milímetro cúbico
Mmol	Milimol
μl	Microlitro
nm	Nanômetro
pg	picograma
%	Porcentagem
RPM	rotações por minuto
S	Segundos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01: Prevalência do vírus da hepatite C em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise no Brasil.....19
- Figura 02: Estrutura do vírus da hepatite C constituída por glicoproteínas, membrana lipídica, core, RNA fita simples positivo e sua associação com uma molécula lipídica.20
- Figura 03: Organização genética do vírus da hepatite C, mostrando as regiões estruturais e não estruturais do vírus com suas respectivas funções.....21
- Figura 04: Árvore filogenética de distribuição dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C.26
- Figura 05: Resposta imune na infecção pelo vírus da hepatite C com envolvimento da resposta inata, através da participação de células dendríticas (DC), macrófagos, natural killer (NK) e a resposta adaptativa com participação de Linfócitos T (LT) auxiliares (H-helper) e citotóxicos (c). Sendo observada uma resposta celular e humoral (através de anticorpos e citocinas).34
- Figura 06: Atividade supressora da resposta imune pelas proteínas do vírus da hepatite C.35
- Figura 07: O ciclo de temperatura da PCR: (1) a temperatura é mantida por cerca de 95°C para desnaturar a fita dupla do DNA (2) a temperatura é reduzida para hibridizar os iniciadores (3) a temperatura é modificada para 72°C para a polimerase estender os iniciadores.....39
- Figura 08: Mecanismo de ação do marcador SYBR GREEN® na PCR em tempo real.....41
- Figura 09: Etapas de execução da tecnologia 454 sequencing.....45
- Figura 10: Fluxograma das técnicas realizadas no Centers for Disease Control and Prevention (CDC/GA/USA).52
- Figura 11: Localização dos iniciadores para a região NS5b no genoma do HCV.55
- Figura 12: Localização dos iniciadores para a região E1-E2 HVR1 no genoma do HCV. Utilizou-se a sequência H77 como referência, depositada no Pubmed com número de acesso NC-004102.57
- Figura 13: Diluições das amostras para a técnica de EPLD-PCR.....58

Figura 14::	Iniciadores modificados utilizados na tecnologia 454 sequencing e sua ligação com a sequência de interesse.	63
Figura 15:	Fluxograma das MIDs de identificação usadas nos iniciadores modificados para o 454 sequencing.....	63
Figura 16:	Fluxograma de processamento das amostras para a região NS5B e HVR1 no grupo de Renais crônicos e grupo controle (pacientes sem problema renal) ambos com sorologia reativa ao vírus da hepatite C.	68
Figura 17:	Árvore filogenética obtida através da amplificação da região NS5b mostrando os subtipos do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.....	71
Figura 18:	Relação evolutiva dos táxons obtidas através da amplificação da região NS5b.....	73
Figura 19:	Árvore filogenética obtida através da amplificação da região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.	74
Figura 20:	Árvores filogenéticas obtidas através da amplificação da região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.	76
Figura 21:	Representação da relação Dn/Ds demonstrando o tipo pressão seletiva observada nas quasispecies encontradas nos pacientes hemodialisados. Os círculos em laranja significam amostras que sofreram pressão negativa, em verde pressão neutra e em azul pressão positiva.	77
Figura 22:	Análise comparativa da distribuição de aminoácidos na região HVR1 do vírus da hepatite C nas quasispecies encontradas em pacientes em tratamento de hemodiálise.....	78
Figura 23:	Análise da distribuição de aminoácidos na região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.	79
Figura 24:	Network das quasispecies dos pacientes renais crônicos em tratamento de hemodialise através da Técnica de EPLD-PCR. Cada círculo indica a presença de uma quasispecies, as cores indicam os pacientes (cada cor representa um paciente) e o tamanho variado indica o número de quasispecies que se repetem no grupo.....	80
Figura 25:	Network das quasispecies distribuídos por ano de soroconversão dos pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise através da Técnica de EPLD-PCR. Cada círculo indica a presença de uma quasispecies e o tamanho	

- variado indica o número de quasispecies que se repetem no grupo.81
- Figura 26: Árvore filogenética obtida através da amplificação da região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.82
- Figura 27: Perfil da resposta imune celular em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise com anti-HCV reativo. Percentual dos linfócitos T CD3+/CD4+ (A) e CD3+/CD8+ (B); Descrição percentual das células ativadas (CD69+): Linfócitos (C), Monócitos (D), eosinófilos (E) e Neutrófilos (F). O (*) significa diferença estatística significativa com $p < 0,05$ através do teste de Kruskal Wallis.....84
- Figura 28: Perfil da resposta imune humoral em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise com anti-HCV reativo. Concentração das citocinas IL4 (A), IL-6 (B); IFN- γ (C), IL-12 (D), IL-8 (E) e IL-10 (F) em dois grupos populacionais controle (doadores de sangue) e pacientes hemodialisados (sendo dividido em três grupos: com anti-HCV-, anti-HCV+/PCR- e anti-HCV+/PCR+).86
- Figura 29: Correlação entre a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 do vírus da hepatite C e o percentual de leucócitos circulantes no sangue periférico dos pacientes em tratamento de hemodiálise. Correlação da diversidade de nucleotídeos com os linfócitos T CD3+/CD4+ (A) e CD3+/CD8+ (B); Correlação da diversidade com as células ativadas (CD69+): Linfócitos (C), Monócitos (D), Neutrófilos (E) e eosinófilos (F).90
- Figura 30: Correlação entre a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 do vírus da hepatite C e a concentração de citocinas circulantes no sangue periférico dos pacientes em tratamento de hemodiálise. Correlação da diversidade de nucleotídeos com as citocinas IL10 (A), IL-4 (B); IFN- γ (C), IL-12 (D), IL-8 (E) e IL-6 (F).....92
- Figura 31: Correlação entre a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 do vírus da hepatite C e a população de Linfócitos T circulantes no sangue periférico dos pacientes em tratamento de hemodiálise infectados com HCV (linha azul) e co-infectados com HBV (linha vermelha). Correlação da diversidade de nucleotídeos com os linfócitos T CD4+ (A) e CD8+ (B).94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação da região NS5b do HCV.....	55
Tabela 2: Iniciadores utilizados para a amplificação da região E1-E2 (HVR1) do HCV.....	57
Tabela 3: Iniciadores utilizados para a amplificação da região E1-E2 HVR1 do HCV pela Tecnologia 454 sequencing.	62
Tabela 4: Distribuição dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise obtidos através da amplificação da região NS5b.	69
Tabela 5: Distribuição dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise que apresentaram co-infecção com o vírus da Hepatite B.....	69
Tabela 6: Média de distância de nucleotídeo para a região NS5B dentro dos subtipos e entre os subtipos.	72
Tabela 7: Análise estatística descritiva do percentual de linfócitos T e sub-populações de leucócitos	87
Tabela 8: Análise estatística descritiva da concentração de citocinas no sangue.	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Epidemiologia	18
2.2 O Vírus da Hepatite C.....	20
2.3 Os genótipos virais	25
2.4 Formas de transmissão	28
2.5 Resposta imune ao vírus da hepatite C.....	30
2.6 Resposta imune em pacientes renais crônicos	35
2.7 Diagnóstico laboratorial	37
2.7.1 Reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	38
2.7.2 Detecção de Quasispecies.....	42
3. OBJETIVOS	46
3.1 Geral	46
3.2 Específicos.....	46
4. METODOLOGIA	47
4.1 Descrição da área de estudo.....	47
4.2 Modelo do estudo	47
4.3 Aprovação do Comitê de ética em pesquisa.....	47
4.4 Populações de estudo e casuística	47
4.5 Coletas das amostras de sangue	49
4.6 Testes laboratoriais para triagem das amostras e análise do perfil da resposta imune	49
4.7 Testes Moleculares realizados no Centers for Disease Control and Prevention (CDC/GA/USA).....	51
4.7.1 Extração do RNA.....	52
4.7.2 Precipitação do RNA	53

4.7.3 Síntese de cDNA.....	53
4.7.4 Genotipagem através da região NS5b por RT-PCR	53
4.7.5 Sequenciamento da Região NS5b	56
4.7.6 Detecção de Quasispecies.....	56
4.8 Análise e tratamento dos dados.....	65
5. RESULTADOS	67
5.1 Análise do subtipo do Vírus da Hepatite C através da região NS5b..	67
5.2 Análise das quasispecies do HCV através da amplificação da região E1-HVR1	73
5.3 Resposta imune celular e humoral contra o vírus da hepatite c em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise.....	82
5.3.1 Análise do perfil celular	83
5.3.2 Análise do perfil de citocinas	85
5.3.3 Análise da correlação de Pearson.....	89
5.3.4 Correlação da concentração de citocinas séricas com a diversidade de nucleotídeos da região HVR1.....	91
6. DISCUSSÃO	95
6.1 Subtipos do vírus da hepatite c.....	95
6.2 Quasispecies do vírus da hepatite C	97
6.3 Resposta imune celular e humoral contra o vírus da hepatite C	102
CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXOS.....	118

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima uma prevalência de 3% na população mundial, representando 180 milhões de pessoas portadoras do vírus da hepatite C (HCV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). A hepatite C constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo (SANTANA et al., 2001) por ser a causa de aproximadamente 20% das hepatites agudas, 80% das hepatites crônicas, 40% das cirroses hepáticas, 70% dos carcinoma hepatocelulares e 30% dos transplantes de fígado (SULOWICZ et al., 2007).

Estudos demonstram que algumas populações estão mais suscetíveis à infecção pelo vírus da hepatite C, como: os hemofílicos onde 60 a 80% dos hemofílicos são anti-HCV positivo (CARMO et al, 2002), 50 a 70% dos usuários de drogas endovenosas (HAHN et al, 2001), 21% dos pacientes talassêmicos politransfundidos (JAISWAL et al, 2001) e 11 a 48% dos pacientes em tratamento prolongado de hemodiálise (BUSEK et al, 2002). Na cidade de Manaus-Amazonas a soroprevalência observada entre a população de hemodializados foi de 13,96%, o que demonstra bem o potencial do sangue de transmitir o vírus da hepatite C (MAIA et al, 2009).

Dos pacientes infectados pelo HCV, apenas 15-20% apresentam eliminação viral (COX et al., 2005), enquanto que quase 90% dos casos progridem para cronicidade de forma silenciosa, por um período de 15 a 25 anos. Após esse período, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem cirrose hepática ou carcinoma hepático. Uma minoria, 5 a 10% dos pacientes com evolução crônica desenvolvem cirrose hepática em período inferior a 10 anos (PARANÁ et al., 1999). Estes fatores parecem estar relacionados às variações genéticas ocorridas no HCV durante a replicação viral, levando a resistência secundária ao tratamento com as drogas preconizadas pelo Ministério da Saúde. De acordo com Barret e colaboradores (2001) a detecção do genótipo viral é imprescindível para a condução do prognóstico e tratamento da infecção.

O HCV sofre variações durante o processo de replicação e assim, sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro, surgem populações heterogêneas do vírus, sendo considerado um mecanismo de escape da resposta imune. Estas populações de vírus, com pequenas diferenças de nucleotídeos em algumas regiões do genoma, designa-se quasispecies e podem surgir simultaneamente no mesmo indivíduo (FARCI et al., 2000; RAMACHANDRAN et al., 2008; KMIECIAK et al., 2009).

As quasispecies podem estar presentes no início da infecção ou surgir no decorrer da mesma como mecanismo de adaptação e escape às defesas do organismo. Esta capacidade do HCV parece facilitar a evolução da infecção aguda para crônica, condicionar a evolução da doença hepática, explicar a resistência às terapêuticas antivirais e tornar difícil o desenvolvimento de uma vacina contra este vírus (CUEVAS et al., 2009).

Para analisar essas quasispecies são utilizadas diversas técnicas como: a reação em cadeia de polimerase (PCR) em Tempo-Real, a reação em cadeia de polimerase com limite de diluição final (EPLD-PCR - end-point limiting-dilution Polymerase chain Reaction) e 454 sequencing (sequenciamento baseado em pirosequenciamento), representam um avanço em relação à prática corrente, onde metodologias diferentes são usadas separadamente para detecção, quantificação e identificação do genótipo e quasispécies virais.

Desta forma é de extrema importância estudar os genótipos, os subtipos virais e as variações genéticas deste vírus, assim como relacionar as variabilidades encontradas com o perfil da resposta imunológica avaliada em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise infectados com o vírus da hepatite C.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2011) estima uma prevalência de 2 a 3% na população mundial, representando 130 a 170 milhões de pessoas portadoras do vírus da hepatite C (HCV), também estima que 3 a 4 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente. A hepatite C constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo por ser a maior causa de hepatite crônica e carcinoma hepatocelular (SANTANA et al., 2001).

Desde 1996 as hepatites virais fazem parte da lista de doenças de notificação compulsória no País, mas somente em 2009 o Brasil reconheceu a magnitude das hepatites virais e iniciou atividades que visassem à prevenção e o controle das hepatites virais no Brasil através da criação do departamento de DST, Aids e hepatites virais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Segundo o Boletim de Hepatites do Ministério da Saúde (2010) entre o período de 1999 e 2009 foram notificados no Brasil 132.950 casos com testes sorológicos reativos para anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) e ao analisar esta população para a presença do RNA do HCV este número reduziu para 60.908 casos, demonstrando uma taxa de detecção de 5,1 casos por 100 mil habitantes.

Ao analisar a distribuição de casos por região, observou-se que a região Sudeste apresentou maior número de casos (n=6.620) e a maior taxa de detecção (8,2%), o que pode estar relacionado ao contingente populacional (80.353,724 habitantes de acordo com o IBGE, 2010) ou há um intenso trabalho de notificação dos casos. Entretanto, o Estado brasileiro com a maior taxa de detecção em 2009 foi o Acre com 22,7 casos por 100 mil habitantes. Observou-se uma maior prevalência entre o sexo masculino com razão de 1,5:1 e entre faixa etária de 40 e 59 anos para ambos os sexos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No Estado do Amazonas, relatos de Torres e colaboradores (2009) demonstram que na triagem sorológica da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), 0,37% (306/82.851) das bolsas são descartadas, devido os doadores apresentaram soropositividade para anti-HCV. No entanto, ao se realizar um acompanhamento destes doadores através de uma nova coleta de sangue, a soroprevalência estimada reduziu para 0,26% através do teste ELISA (anti-HCV reativo) e ao realizar a PCR a soroprevalência diminuiu para 0,15%.

Estudos demonstram que algumas populações estão mais suscetíveis à infecção pelo vírus da hepatite C, como: os hemofílicos onde 60 a 80% dos hemofílicos são anti-HCV positivo (CARMO et al, 2002), 50 a 70% dos usuários de drogas endovenosas (HAHN et al, 2001), 21% dos pacientes talassêmicos politransfundidos (JAISWAL et al, 2001) e 11 a 48% dos pacientes em tratamento prolongado de hemodiálise (BUSEK et al, 2002). Na cidade de Manaus-Amazonas a soroprevalência observada entre a população de hemodializados foi de 13,96%, o que demonstra bem o potencial do sangue de transmitir o vírus da hepatite C (MAIA et al, 2009) (FIGURA 01).

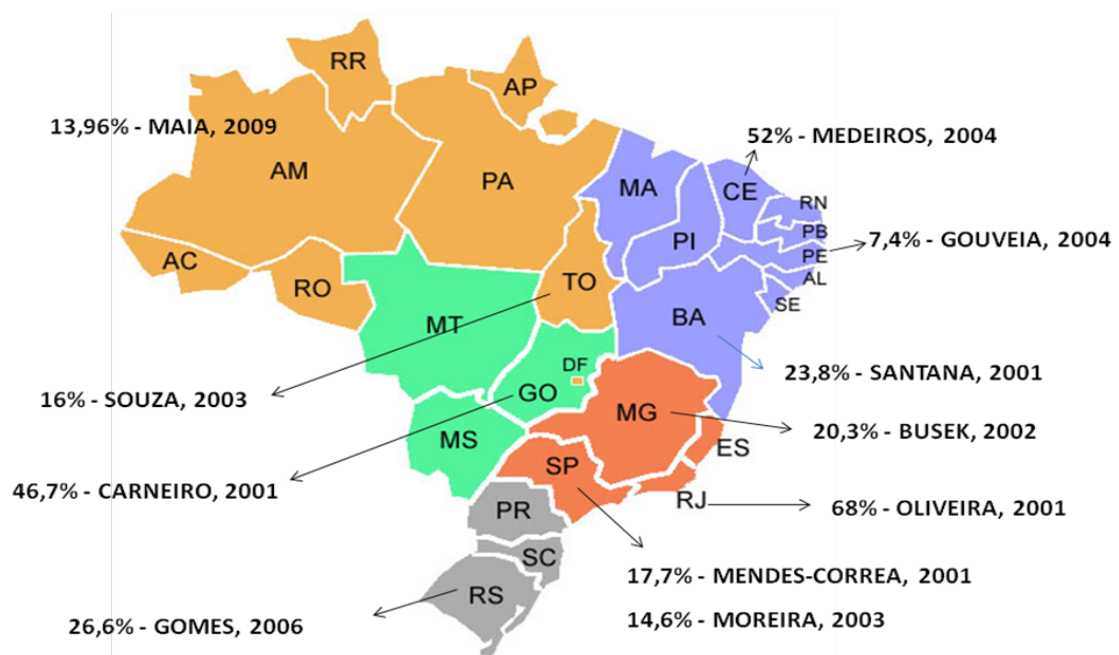


Figura 01: Prevalência do vírus da hepatite C em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise no Brasil.

Fonte: Atlas Geográfico do Brasil (2002), mapa adaptado.

2.2 O Vírus da Hepatite C

O Vírus da hepatite C (HCV) foi identificado por Choo e colaboradores em 1989, através de técnicas de biologia molecular e foi inicialmente chamado de Vírus não A, não B. Através da sua composição estrutural foi classificado como pertencente à família *Flaviviridae* (CHOO et al., 1989) e gênero *Hepacivírus* (SIMMONDS et al., 2005).

A partícula viral tem em média 40-70 nm de diâmetro e é composta por um envoltório derivado da membrana celular do hospedeiro contendo as glicoproteínas virais E1 e E2 inseridas (KHALIQ et al., 2011). O nucleocapsídeo é formado pela proteína C (core) que apresenta estrutura icosaédrica e tem a função de envolver o RNA viral de fita simples de polaridade positiva, formado por aproximadamente 9.500 nucleotídeos (FIGURA 02) (CHOO et al., 1989; KHALIQ et al., 2011).

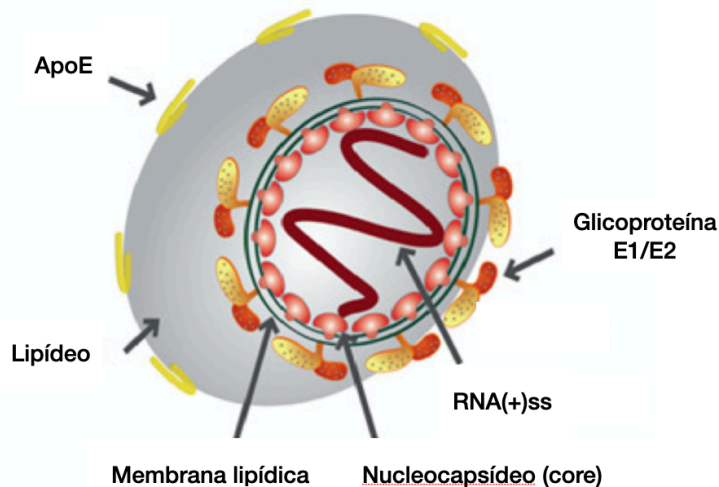


Figura 02: Estrutura do vírus da hepatite C constituída por glicoproteínas, membrana lipídica, core, RNA fita simples positivo e sua associação com uma molécula lipídica.

Fonte: Adaptado de Bartenschlager, 2010.

A região do genoma possui duas regiões não-codificantes em suas extremidades – denominadas de 5'UTR e 3'UTR (UTR- untranslated region). A região 5'UTR representa a sequência mais conservada em relação a diferentes isolados virais, o que sugere cumprir com o papel regulador durante a replicação viral (HOUGHTON et al., 1991; SIMMONDS et al., 2005). Apresenta também

uma única porção codificante, denominada de sequência do gene (ORF - Open Reading Frame), que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3010 a 3033 aminoácidos (dependendo do genótipo), que sob ação autoproteolítica (proteases virais) e proteolítica (proteases celulares da célula hospedeira, ex.: hepatócito), leva a formação das proteínas estruturais (Core, proteína do envelope 1 e 2 e p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (FIGURA 03) (DUARTE, 2006).

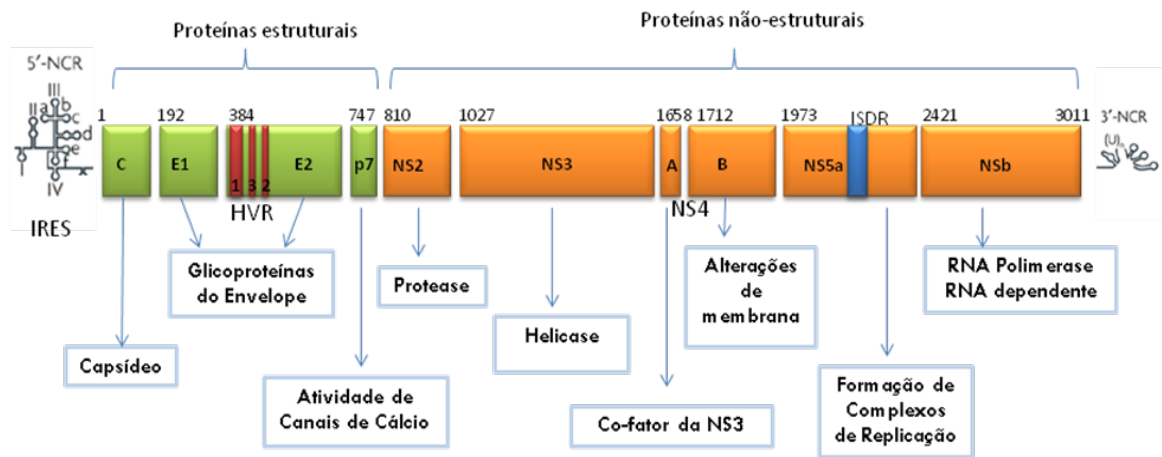


Figura 03: Organização genética do vírus da hepatite C, mostrando as regiões estruturais e não estruturais do vírus com suas respectivas funções.

Fonte: Adaptado de Tan et al., 2002 e Moradpour et al., 2007

A **Região 5' não-traduzida** (5'UTR) é composta por 341 nucleotídeos, e é cerca de 100 nucleotídeos maior que a dos outros flavivírus, aproximando-se dos pestivírus neste aspecto (HAN, 1991). É considerada a região mais conservada entre os diferentes isolados de HCV, em comparação às outras regiões do genoma viral. Esta conservação deriva da necessidade de manter-se uma estrutura secundária fundamental para a ligação ao ribossomo no início da tradução (SIMMONDS et al., 2004). Esta região é composta por 4 domínios, classificados de I à IV. Os domínios II, III e IV, junto com os primeiros 24-40 nucleotídeos que codificam a proteína do core constituem o sítio interno de entrada do ribossomo (Internal Ribosomal Entry Site - IRES) (TSUKIYAMA-KOHARA et al., 1992; NAKATANI, 2008). Os domínios I e II são essenciais para a replicação do RNA viral (MORADPOUR et al., 2007).

A **Região 3' não-traduzida** (3'UTR) está localizada na extremidade terminal do genoma viral, sendo constituída por aproximadamente 230 nucleotídeos, iniciando-se com uma sequência genótipo específica de 30 nucleotídeos, seguida por uma região variável de poli U/UC com 80 nucleotídeos, uma sequência de poli-Us de comprimento variável, um trecho polipirimídico CU e uma região bastante conservada de 98 nucleotídeos (MORADPOUR et al,2007; NAKATANI, 2008).

A **proteína do capsídeo viral**, denominada de core, é processada pelo retículo endoplasmático através da clivagem da poliproteína viral pela ação de uma peptidase celular (NAKATANI, 2008). É uma proteína bastante conservada entre os diferentes isolados de HCV e contém vários epítomos reconhecidos por linfócitos B em sua extremidade N-terminal, sendo altamente imunogênica (NASSOF et al., 1991).

Esta proteína possui na sua superfície resíduos de lipídios que podem afetar o metabolismo dos lipídios, contribuindo para o desenvolvimento da esteatose hepática, observada principalmente em indivíduos infectados com o genótipo 3 (MORADPOUR et al., 2007; NAKATANI, 2008). Ela está presente na formação do nucleocapsídeo (KHALIQ et al., 2011), atua na modulação do gene da transcrição, na proliferação celular, morte celular e nos mecanismos de sinalização celular (MURPHY et al., 2007), mas outras atividades foram detectadas “in vitro”, como a translocação do citoplasma ao núcleo e a interação com proto-oncogenes celulares (RAY et al., 1995), a transformação de fibroblastos murinos (RAY et al., 1996a) e a supressão da morte celular por apoptose (RAY et al., 1996b) sugerindo sua implicação na patogênese do hepatocarcinoma, que ocorre em uma parcela dos indivíduos cronicamente infectados pelo HCV (KHALIQ et al., 2011).

A **proteína P7** é constituída por 67 aminoácidos que geralmente é clivada incompletamente de E2. Não é necessária para a replicação in vitro, mas é essencial para produzir infecção in vivo. Apresenta como função a atividade de canal de cátion podendo ter papel importante na maturação e liberação da

partícula viral. Sugerindo a idéia de ser um alvo para a terapia antiviral (MORADPOUR et al., 2007).

As **glicoproteínas do envelope** (E) - E1 e E2 são responsáveis pela formação do envelope viral, são clivadas no lúmen do retículo endoplasmático e formam um heterodímero E1E2 que participa ativamente no processo de entrada nas células hospedeiras (CHEN et al., 2011). Os vírus envelopados entram nas células por dois caminhos: fusão direta da membrana plasmática e endocitose mediada por receptor. A fusão sofre influência do pH, sendo observado que pH baixo causa mudanças na conformação das proteínas do envelope, facilitando a fusão com a membrana do endossoma (OP DE BEECK et al., 2004).

A proteína E2 interage com o receptor CD81 da célula do hospedeiro (CHEN et al., 2011), medeia a ligação para o SRBI (receptor scavenger de classe B tipo I), um receptor de lipoproteína de alta densidade (HDL), com a manose ligando à lecitinas DC-SIGN e L-SIGN e glicosaminoglicanos (CALLENS et al., 2005, MORADPOUR et al., 2007).

Na região de E2 do envelope foi identificada uma região que pode diferir em mais de 80% entre os diferentes genótipos do HCV e entre os subtipos do mesmo genótipo (NAKATANI, 2008), conhecida como região hipervariável (HVR) e classificadas como 1, 2 e 3.

A região HVR1 é constituída por um segmento longo de 27 aminoácidos (81 nucleotídeos) localizados na região aminoterminal entre os aminoácidos 384-410 da glicoproteína do envelope 2 próxima a glicoproteína do envelope 1, é um importante alvo para a resposta imune do hospedeiro, sofrendo assim uma forte pressão imune (CALLENS et al., 2005; KIMIECIAK et al., 2009). HVR1 é a região responsável por interagir com o CD81 e o SR-B1 com o objetivo de iniciar a entrada do vírus na célula do hospedeiro (CALLENS et al., 2005).

A segunda região hipervariável (HVR2) é constituída por 7 aminoácidos e foi descrita no HCV genótipo 1 (KATO et al., 2001) parece estar envolvida na

interação com o receptor da superfície celular (TORRES PUENTE et al., 2007) e a terceira região descrita é a HVR3 que sugere-se ter papel inicial no processo de ligação com receptores da célula hospedeira e a entrada do vírus na célula (TORRES PUENTE et al., 2007).

Taylor e colaboradores (1999) descreveram uma região na proteína E2 do HCV denominada PePHD (Domínio homólogo de fosforilação/phosphorylation homology domain), apresentando similaridade ao sítio de fosforilação da proteína quinase (PKR) e a subunidade α do fator iniciador da tradução 2 (eIF-2 α). Atuando como pseudo-substrato da PKR e bloqueando o efeito anti-viral do IFN- α em indivíduos infectados com o genótipo 1.

As **regiões não-estruturais** (NS) - NS2 e NS3 formam em conjunto uma serina-protease com função no processamento da poliproteína viral. A NS3 também possui atividade de NTPase e helicase, contidas em sua extremidade C-terminal, acreditando-se portanto, que tenha uma importância fundamental na replicação viral, em analogia ao observado em outros flavivírus (SUZICH et al., 1993).

A **região NS4** codifica duas proteínas chamadas NS4A e NS4B. A NS4A é constituída por 54 aminoácidos, atua como co-fator para a atividade de protease de NS3 e também participa da hiperfosforilação da proteína NS5A (TANJI et al., 1995; DUBUISSON, 2007). A NS4B é uma proteína de membrana que tem como finalidade organizar o complexo de replicação através de alteração de membrana, promove a estabilidade das proteínas do HCV (estruturais e não-estruturais) e do RNA durante a replicação viral (EGGER et al., 2002, NAKATANI, 2008).

A **região NS5** produz duas proteínas nomeadas NS5A e NS5B. A NS5A apresenta algumas regiões que tem sido estudada, como: o sinal de retração citoplasmático (CRS), a região determinante de sensibilidade ao interferon (ISDR), o sítio de ligação com a PKR (PKR-binding), o sinal de localização nuclear (NLS) e a região variável 3 (V3) (MALTA, 2006). Uma região conferindo

sensibilidade ao interferon foi localizada neste domínio (ENOMOTO et al., 1996) e conseguiu-se distinguir as diferenças no nível de aminoácidos entre indivíduos que respondem ou não a esta droga.

O NS5b é uma RNA polimerase RNA dependente (RpRd), pertence à grande família de ácidos nucleicos polimerases, apresentando estrutura de uma mão direita que consiste de dedos, polegar e domínios palmar (DUBUISSON, 2007), é indispensável a replicação do HCV (LOHMANN et al., 1997), sendo considerado um potencial alvo para terapêutica anti-HCV. A proteína do core também se liga ao NS5b e um domínio C-terminal de 97-aminoácido de NS5B é requerida para esta interação. In vitro, a enzima possui dois tipos de atividades sintéticas: iniciação de novo e alongamento de primer de oligonucleotídeos (LEE et al., 2004).

NS5B é constituído por 591 aminoácidos, sendo possível deletar os 60 aminoácidos C-terminais sem perda da função enzimática, e que os últimos 21 aminoácidos, compreendendo um domínio altamente hidrofóbico, são responsáveis pela ligação à membrana da proteína. A região C-terminal, acima do domínio de ligação à membrana, contém uma região reguladora que inibe ligação do RNA e a atividade de polimerase (LEE et al., 2004).

Esta enzima não apresenta atividade revisora e isto está diretamente relacionado à diversidade genética que o HCV apresenta (genótipos, subtipos e as quasispecies) (SIMMONDS et al., 1993). Por tratar-se de uma região com um nível de variabilidade mediano, é utilizada para a tipagem dos isolados virais.

2.3 Os genótipos virais

O HCV apresenta um grande número de variações no genoma, e através de estudos filogenéticos das sequências completamente ou parcialmente conhecidas dos isolados do HCV publicadas indicam que existam pelo menos seis grupos distintos do vírus e mais de 50 subtipos de HCV (Figura 04)(CHAN et al., 1992; SIMMONDS et al., 2005).

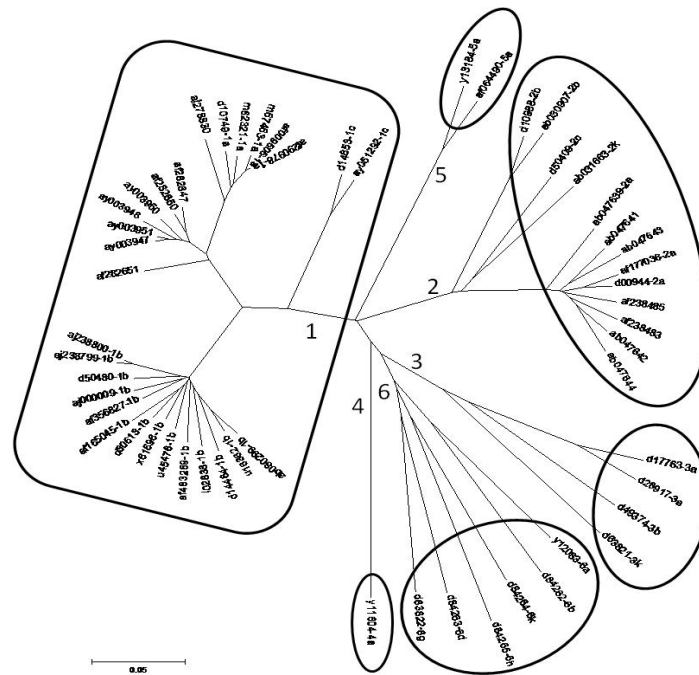


Figura 04: Árvore filogenética de distribuição dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C. Sequências retiradas do GENBANK, as numerações correspondem ao número de acesso.

Os genótipos podem diferir entre si, de 31% a 34% em suas sequências de nucleotídeos e aproximadamente 30% em suas sequências de aminoácidos, enquanto os subtipos diferem em 20% a 23% de suas sequências de nucleotídeos, com importante diferença conforme a região genômica (ROBERTSON et al., 1998; SIMMONDS et al., 2005). Estas variações são resultado da alta taxa de substituição observada ($1,1 \times 10^{-3}$ substituições/sítio/ano) (QUEIROZ, 2010).

A análise da cinética viral do HCV através de infecção experimental de chimpanzés a partir de pacientes com hepatite C que receberam transplante hepático e de pacientes que receberam interferon forneceu informações importantes: a) pacientes com infecção crônica tipicamente têm carga viral de 10^3 a 10^7 genomas por mililitro de plasma, b) cerca de 10^{12} vírus são produzidos por dia, com uma meia-vida estimada em 3 horas, por consequência origina-se uma população com alta variabilidade genética e c) a carga viral, uma vez

atingindo determinado patamar, tende a permanecer constante por anos, o que denota uma produção e destruição do vírus equilibradas (NEUMANN *et al.*, 1998).

O conhecimento da variabilidade genética envolvida nas infecções é importante para compreender a evolução da doença, conduzir tratamento antiviral, monitorar estudos epidemiológicos, além de ter implicações importantes e decisivas no diagnóstico sorológico e molecular da infecção (CARMO *et al.*, 2002).

A distribuição dos genótipos é variável no mundo. Segundo a revisão de Nakatani (2008) os genótipos 1, 2 e 3 estão distribuídos em todos os continentes, o genótipo 4 é mais comum no norte e no leste da África, o genótipo 5 prevalece na África do Sul, enquanto o genótipo 6 na Ásia.

No Brasil existem poucos estudos de genotipagem, mas os dados não diferem muito em relação aos encontrados nos países ocidentais, sendo o genótipo 1 responsável pela maioria das infecções (61 a 77%), seguido do genótipo 3 (25 a 39%) e do 2 (1,6 a 4,6%). Os genótipos 4, 5 e 6 correspondem entre 0,1 a 0,2% dos casos (Levi *et al.*, 2002, VOGLER *et al.*, 2004; CAMPIOTTO *et al.*, 2005).

Relatos de Campiotto e colaboradores (2005), através da análise de pacientes com hepatite C crônica de vários centros de referência nacional, demonstraram que o genótipo 1 é o mais prevalente na região norte, variando de 68 até 78% dos casos, seguido pelos genótipos 3 (22-33%) e 2 (7,1%). Eles concluíram que tal distribuição pode representar uma infecção endêmica de longa data nestas áreas, após a chegada de imigrantes Europeus, quando a prática de transfusão de sangue tornou-se comum e nenhum teste para o vírus era disponível. No estudo de Torres e colaboradores (2009) em doadores de sangue no Estado do Amazonas, observou-se predomínio do genótipo 1, representando uma prevalência de 87,1%, seguida do genótipo 3 (12,9%). Com isso, observou-se semelhança entre os dois estudos citados.

O conhecimento dos genótipos virais existentes é importante, pois diferem na sua agressividade e na resposta sustentada à terapia com interferon- α (negativação da carga viral mantida por seis meses após o término do tratamento). Dados da literatura apontam para uma menor resposta terapêutica do genótipo 1 à terapia com interferon- α do que os genótipos 2 e 3 (PANG et al., 2009).

O HCV sofre variações durante a replicação devido à falta de atividade revisora da enzima RNA polimerase RNA dependente e assim, sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro, surgem populações heterogêneas do HCV, sendo considerado um mecanismo de escape da resposta imune. Estas populações de vírus, com pequenas diferenças de nucleotídeos em algumas regiões do genoma, mas estritamente relacionados, designa-se quasispecies e podem surgir simultaneamente no mesmo indivíduo (FARCI et al., 2000; RAMACHANDRAN et al., 2008; KMIĘCIAK et al., 2009).

As quasispecies podem estar presentes no início da infecção ou surgir no decorrer do mesmo como mecanismo de adaptação e escape às defesas do organismo. Esta capacidade do HCV parece facilitar a evolução da infecção aguda para crônica, condicionar a evolução da doença hepática, explicar a resistência às terapêuticas antivirais e tornar difícil o desenvolvimento de uma vacina contra este vírus (CUEVAS et al., 2009).

2.4 Formas de transmissão

O vírus da hepatite C (HCV) é transmitido por diversos meios, porém é considerado um vírus de transmissão parenteral, tendo como via principal o sangue e hemoderivados contaminados, o vírus já foi isolado de várias secreções orgânicas como medula, bile, mucosa intestinal e oral, líquido (CHOO et al., 1989; CARROZZO et al., 2002), além dos nervos periféricos, substância branca, córtex e gânglio da base (FORTON et al., 2004), representando diferentes meios de transmissão do vírus da hepatite C.

Os principais mecanismos de transmissão são uso de drogas injetáveis (16,1%), transfusão de sangue e derivados contaminados (13,3%), acidentes com materiais perfuro-cortantes (0,6%), e procedimentos invasivos como hemodiálise (0,7%), a realização de tatuagens e colocação de piercing, sem as boas praticas de biossegurança, são responsáveis por mais de 30% dos casos (ALTER et al., 1989; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Enquanto, a transmissão via sexual (8,6%), a transmissão materna ou vertical (0,4%) e a domiciliar (0,4%) são infecções mais raras, sendo responsáveis por menos de 10% de todos dos casos (ALTER et al., 1989; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Usuário de drogas (UD) injetáveis e não-injetáveis tem um fator de risco aumentado para infecção por HCV pelo compartilhamento de materiais de injeção e suprimento para drogas inaladas, e também, prática de sexo insegura. Entre os UD a prevalência de HCV no Brasil varia de 5.8% a 36.2% (LOPES et al., 2009).

Em 1991 com a implementação da triagem dos doadores de sangue diminui os riscos de transmissão do HCV pós-transfusão porém observou-se outra via de transmissão, a transmissão nosocomial (ROSS et al., 2009). A transmissão nosocomial tem sido descrita em diferentes setores médicos, como: procedimentos cirúrgicos e anestésicos (ROSS et al., 2002), centros de hemodíalises (TU et al., 2009), hospitais hematológicos e oncológicos (SEPKOWITZ, 2004), serviços ambulatoriais (PRATI et al., 2006) e exames médicos (GONZALEZ-CANDELAS et al., 2010).

Pacientes com hemofilia são de alto risco para hepatite C pós-transfusão por causa do uso difundido de produtos derivado do plasma (fator VIII e IX), principalmente até meados da década de 80, onde foi introduzido o tratamento de inativação do vírus no plasma que auxiliou na redução de casos de transmissão (CARMO et al., 2002). Um estudo do nosso grupo observou uma prevalência de 30,8% de anti-HCV reativos entre os hemofílicos, demonstrando valores menores que outras regiões do Brasil que variaram de 44,6% a 63,3% (PIMENTEL et al., 2009)

Os pacientes hemodialisados estão expostos a acessos vasculares prolongados ampliando o risco de infecção por patógenos de transmissão sanguíneo, incluindo HBV, HCV e HIV (TU et al., 2009), através de aparelhos, equipamentos e suprimentos contaminados, como reutilização de recipientes entre os pacientes sem descontaminação adequada, tratamento de amostras de sangue nas mesmas áreas adjacentes ou designado para medicamentos ou materiais limpos, e uso de carrinhos móveis dentro das áreas de tratamento para entregar medicamentos e lanches oferece oportunidades para a contaminação cruzada (SHIMOKURA et al, 2011). A transmissão do vírus da hepatite C pode ser reduzida ou prevenida se forem adotadas algumas medidas de segurança e higiene na rotina.

A transmissão vertical pode ocorrer tanto de forma intra-uterina, como por via perinatal, prevalece em aproximadamente 5-10% das crianças nascidas de mães HCV RNA positivo e a eliminação do vírus ocorre em cerca de 30% das crianças infectadas (ISHII et al., 2005). Níveis virêmicos elevados, especialmente acima de um milhão de cópias por mililitro, aumentam o risco de transmissão vertical (GONÇALES et al., 2000).

A transmissão sexual do HCV ainda não apresenta os fatores de riscos completamente esclarecidos. A prevalência está sendo mais relatada entre os pacientes tratados em clínicas de doenças sexualmente transmitidas, entre prostitutas e seus parceiros e entre pacientes co-infectados com HIV-HCV. Observa-se um maior percentual de transmissão homem-mulher que mulher-homem. Casais monógamos demonstram baixo risco de transmissão sexual, entretanto, existe a possibilidade de transmissão intrafamiliar por compartilhamento de materiais de higiene pessoal ou exposição ocasional a sangue contaminado (MARTINS et al., 2011).

2.5 Resposta imune ao vírus da hepatite C

Segundo a revisão de Chaplin (2010) a resposta imune do hospedeiro é constituída pela imunidade inata através das barreiras físicas (ex. pele),

componentes celulares (ex. granulócitos) e componentes solúveis (ex. fatores do complemento) e pela imunidade adaptativa composta da imunidade humoral (anticorpos) e a imunidade celular (linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺).

A resposta imune inata contra o vírus da hepatite C envolve a atuação de células dendríticas plasmocitóides e mielóides, células Natural Killer (NK), Natural Killer T (NKT) e das linhagens fagocíticas, sendo importante na fase inicial da infecção (HIROISHI et al., 2008).

No início da infecção pelo HCV, os hepatócitos e as células dendríticas plasmocitóides infectados produzem Interferon tipo 1 (IFN α e β) que induz a produção de 2'-5' oligoadenilato sintetase com função de inibir a replicação, aumentar a expressão de HLA I nas células apresentadoras de antígenos, reforçando a resposta imune celular e ativar as células NK que destroem hepatócitos infectados. A destruição dos hepatócitos estimula CD mielóides, que junto com as CD plasmocitóides ativam as células NK e NKT promovendo a secreção de grande concentração de IFN- γ que ativam macrófagos hepáticos, aumentando a inflamação local e iniciando a hepatite (HIROISHI et al., 2008).

A ativação das células NK exerce um papel essencial no recrutamento de células T HCV-específicas e eliminação de hepatócitos infectados diretamente por citólise ou indiretamente pela secreção de citocinas, que induzem um estado antiviral nas células do hospedeiro. Assim, elas seriam importantes para limitar a replicação viral nos hepatócitos, contribuir para o dano tecidual hepático durante a resposta imune e na persistência da infecção por HCV (DESSOUKI et al., 2010).

O interferon tipo 1 participa da resposta inata, estimulando a ativação de células NK e maturação de CD, e da resposta adaptativa, estimulando a proliferação de LT memória e prevenindo a apoptose de LT (DESSOUKI et al., 2010).

A hepatite C caracteriza-se por uma importante resposta adaptativa através da imunidade humoral e celular. A resposta imune humoral é fundamental na neutralização de partículas virais livres e para impedir a entrada do vírus nas células do hospedeiro (WESESLINDTNER, 2009). Por outro lado, apesar da existência de anticorpos neutralizantes, como aqueles contra a região E2 HVR, a resposta humoral é muito ineficiente, talvez pela rápida seleção de variantes de escape ou porque estes anticorpos falham em induzir a eliminação viral (HIROISHI et al., 2008). No entanto, a resposta imune celular (LT CD4⁺) é crítica para a geração e manutenção de um estado antiviral, tanto pela secreção de citocinas estimulatórias de linfócitos B, ativação de Linfócitos T CD8⁺ específicos como pela geração de uma memória imune celular (KAPLAN et al., 2007).

Os linfócitos T helper (Th) são fundamentais na coordenação da imunidade celular contra patógenos intracelulares. Essas células reconhecem os peptídeos virais antigênicos ligados aos antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe II na membrana das células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos Th1 favorecem a ativação de linfócitos T citotóxicos (LTc ou LTCD8⁺) específicos responsáveis pela eliminação das células infectadas por vírus, enquanto linfócitos Th2 induzem a proliferação de linfócitos B específicos e a produção de anticorpos anti-HCV (HIROISHI et al., 2008).

Os linfócitos Th1 produzem citocinas (IL-2, IFN- γ) que podem inibir a replicação viral, por induzir a ativação e proliferação de LTc, NK e macrófagos. Os LTc reconhecem os antígenos HCV ligados ao HLA classe I na superfície dos hepatócitos, promovendo a erradicação do HCV por destruição dos hepatócitos infectados (HIROISHI et al., 2008). As respostas dos Linfócitos Th aos diferentes antígenos virais, incluindo o do core, estão associadas a uma evolução benigna da infecção pelo Vírus da hepatite C.

Estudos sugerem que a resposta de linfócitos T CD4⁺ de padrão Th1 contra a fração NS3 do vírus e possivelmente a outras proteínas não estruturais do HCV (NS4 e NS5) contribuem para o sucesso da eliminação viral. Acredita-se

que a eliminação viral está associada a uma forte resposta intra-hepática multiespecífica de linfócitos T CD8⁺ contra o vírus, enquanto que a persistência viral tem sido associada a uma fraca e limitada resposta destes linfócitos (WESESLINDTER et al., 2009).

A patogenia da hepatite C parece estar relacionada à intensidade da resposta dos linfócitos T na fase inicial da infecção, a qual pode ser crítica na evolução da doença (WESESLINDTER et al., 2009). É importante salientar que a reatividade imune celular do hospedeiro, incluindo tanto os linfócitos TCD4⁺ quanto os linfócitos TCD8⁺, encontra-se ativada em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C.

As citocinas são muito importantes na resposta imune contra as infecções, como o Fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α) e IFN- γ . A produção de níveis inadequados de algumas citocinas parece contribuir para a persistência do vírus e, também, influenciar a resposta à terapia antiviral na infecção pelo HCV. Por exemplo, a quantidade de interleucina-10 (IL-10) produzida pode potencialmente influenciar a evolução da doença, uma vez que a IL-10 parece ser capaz de controlar a resposta imune antiviral do indivíduo, sendo que seu declínio precoce pode favorecer uma mudança da resposta imune tipo Th2 para Th1, levando a uma resposta terapêutica sustentada (TORRE et al., 2004).

As células responsáveis pela produção de IL-10 e TGF- β são os LTreg (CD4⁺ CD25⁺), que tem o papel de regular a resposta imune, através da supressão direta de LT. As proteínas NS3 e NS4 estimulam células mononucleares do sangue a produzirem IL-10 em pacientes infectados com HCV (HIROISHI et al., 2010). Segundo Torre e colaboradores (2004) os níveis séricos de IL-10 e de outras citocinas de padrão Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) encontram-se bastante elevados em pacientes com infecção crônica pelo HCV não tratados quando comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo que o desvio do perfil imunológico para um padrão Th2 poderia comprometer a resposta imune do hospedeiro, resultando na infecção crônica pelo HCV. Níveis séricos elevados de

IL-10 também parecem estar associados com persistência da viremia e resistência à terapia antiviral com INF- α .

A persistência da viremia está relacionada à formação de quasispecies durante o processo replicativo, onde favorece a falta de reconhecimento pelos LTc e anticorpos e a tolerância entre os LTc (HIROISHI et al., 2008). As mutações podem promover troca de padrão de resposta como se observa que a troca de um aminoácido do epítipo da região NS3 reconhecidos por células Th1 resulta em mudança na secreção de citocinas de Th1 para Th2. Th2 dominando pode conduzir a diminuição da resposta antiviral (WANG et al., 2003, HIROISHI et al., 2008). A figura 5 demonstra todas as células envolvidas na resposta imune contra o HCV.

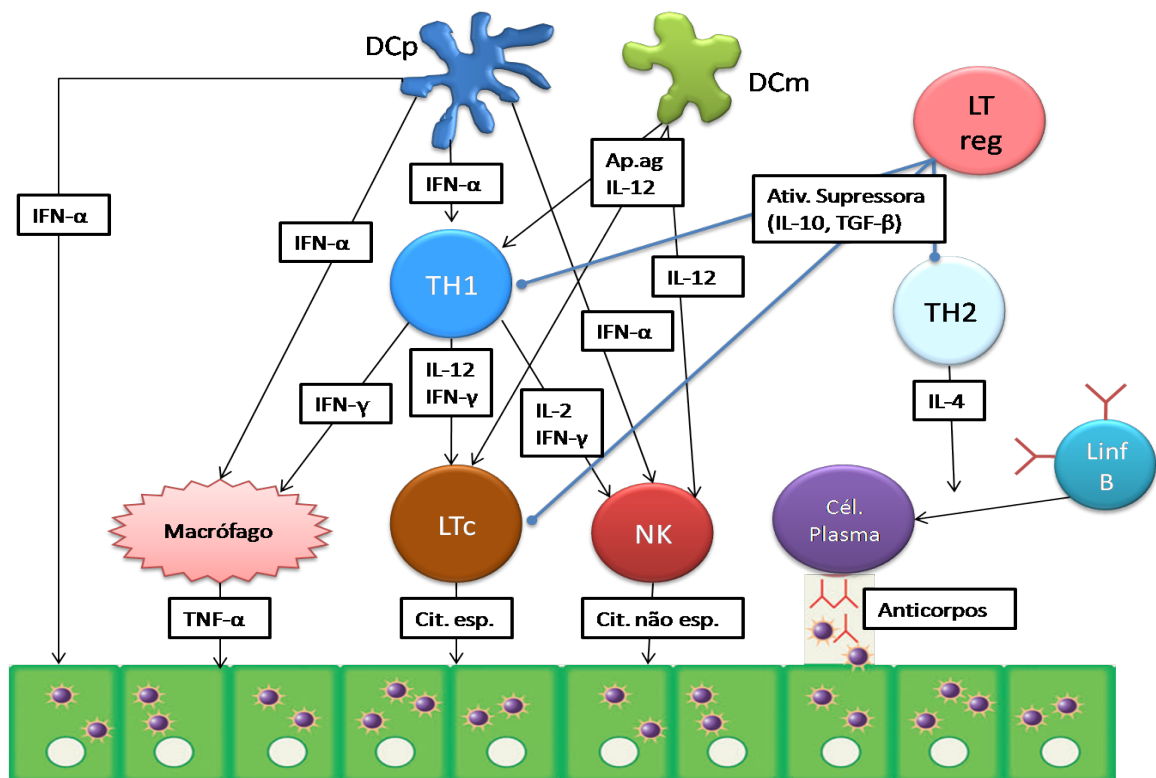


Figura 05: Resposta imune na infecção pelo vírus da hepatite C com envolvimento da resposta inata, através da participação de células dendríticas (DC), macrófagos, natural killer (NK) e a resposta adaptativa com participação de Linfócitos T (LT) auxiliares (H-helper) e citotóxicos (c). Sendo observada uma resposta celular e humoral (através de anticorpos e citocinas).

Fonte: Hiroishi, K; Ito, T e Imawari, M (2008).

O HCV apresenta mecanismos diversos para suprimir a resposta imune através das suas proteínas estruturais e não-estruturais. A proteína do core interage com o gC1qR dos LT inibindo a ativação e proliferação dos LT e a produção de IFN- γ . A proteína NS4A/B bloqueia a expressão do HLA 1 por inibir o tráfico do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. As proteínas do Core, E1 e NS3 inibem a maturação de células dendríticas, prejudicando a resposta imune inata (HIROISHI et al., 2010). A figura 6 demonstra de forma simplificada o mecanismo de inibição da resposta imune pelo HCV.

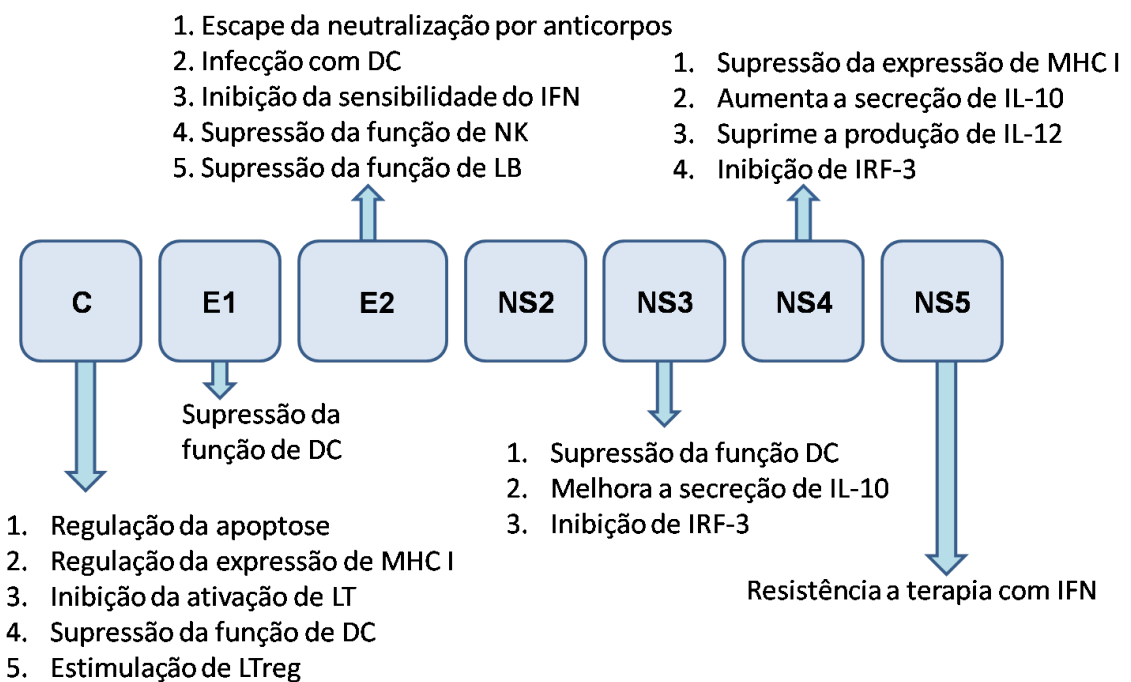


Figura 06: Atividade supressora da resposta imune pelas proteínas do vírus da hepatite C.

Fonte: Hiroishi, K; Ito, T e Imawari, M (2008).

2.6 Resposta imune em pacientes renais crônicos

Okuda e Yokosuka (2004) relataram que a infecção pelo HCV em pacientes renais crônicos apresenta uma história natural diferente do paciente não-renal, com uma atividade menos intensa de doença, assim como uma menor progressão para a cirrose, provavelmente devido à anormalidades na resposta imunológica destes pacientes.

Em um estudo clássico da resposta imune celular e humoral, Giacchino e colaboradores (1982), demonstraram que a imunidade celular estava muito comprometida em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) inicial ou em hemodiálise, e menor comprometimento da imunidade humoral, com contagem de linfócitos B e dosagens de imunoglobulinas normais, e somente uma redução de uma proteína do complemento (C3). Pacientes com IRC possuem uma imunodeficiência caracterizada por complicações mais frequentes às infecções e baixas respostas às vacinações. Esta imunodeficiência é influenciada tanto pela uremia, associação de múltiplas doenças e pela terapia renal substitutiva (TRS) (KAUL et al., 2000). Outros fatores que podem contribuir para diminuir a resposta imune são a anemia e a desnutrição (BARROS & ROMÃO, 1996).

A interferência da biocompatibilidade das membranas dialisadoras nos níveis séricos de citocinas, durante o procedimento da hemodiálise, é assunto controverso. Acredita-se que essas membranas levem à ativação da imunidade humoral, do sistema complemento, causando liberação de C3a e C5a, de neutrófilos (GIACCHINO et al., 1982) e levando os monócitos a gerarem citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α (PASTAN & BAILEY, 1998).

As moléculas médias do soro urêmico são retidas nas membranas, o que pode, teoricamente, contribuir para diminuir a função dos linfócitos T e, conseqüentemente, inibir a estimulação de linfócitos pelos mitógenos, a proliferação de fibroblastos e a atividade fagocítica dos leucócitos. Nota-se, por exemplo, que a HD não parece contribuir para essas alterações; o que se observa nesses pacientes, é a progressiva diminuição da imunidade, que tem relação direta com o tempo de HD (GIACCHINO et al., 1982).

A resposta proliferativa das células mononucleares periféricas tende a ser deprimida nos pacientes urêmicos em relação aos controles não urêmicos, a despeito das controvérsias a esse respeito. Estudos *in vitro* demonstram que a produção do IFN- γ pelos linfócitos, necessário para a ativação de macrófagos, linfócitos B e linfócitos T citotóxicos, é reduzida em pacientes

urêmicos (YOUSEFI et al., 1987), mas não nos pacientes em hemodiálise (DAICHOU et al., 1999).

Também se observa diminuição na produção de Interleucina-2 (IL-2) e, conseqüentemente, há comprometimento da resposta proliferativa e da diferenciação linfocítica dos linfócitos B. Acredita-se que a HD possa remover moléculas e, entre estas, a IL-2. A redução da IL-2 na uremia tem sido um fator fundamental para explicar a imunodeficiência que ocorre em pacientes urêmicos (WALDHERR et al., 1992). Todavia, a função dos macrófagos parece estar preservada em urêmicos (YOUSEFI et al., 1987) e aumentada nos pacientes hemodialisados (DAICHOU et al., 1999). No entanto muitos estudos ainda precisam ser feitos para relacionar a infecção pelo HCV com a imunidade.

2.7 Diagnóstico laboratorial

Somente após identificação do genoma do HCV, foi possível o desenvolvimento de métodos de diagnóstico utilizando-se de polipeptídeos virais derivados de recombinações e expressos em leveduras para realização de ensaios imunoenzimáticos (KUO et al., 1989).

O diagnóstico depende, fundamentalmente, da demonstração dos anticorpos contra o HCV. As técnicas passaram por vários estágios de desenvolvimento. Os testes de primeira geração (EIA I e RIBA I) detectavam anticorpos contra a porção C100-3 e foram abandonados, pois podiam demorar até 24 semanas para positivar na doença aguda, além de apresentar um grande número de falso-positivos. Os testes ELISA de segunda geração detectavam anticorpos contra as partículas c200 (mistura de c33 e c100-3) e c22-3, com sensibilidade e especificidade superior a 90% (BRANDÃO et al., 2001).

Os testes de imunoblot recombinante (RIBA) II detectavam os mesmos antígenos individualizados numa faixa de nitrocelulose. Os testes de terceira geração adicionaram antígenos da porção NS5 do genoma viral, aumentando

significativamente a sensibilidade e especificidade em relação aos métodos de segunda geração (BRANDÃO et al., 2001).

O diagnóstico da HCV é baseado na detecção sorológica de anticorpos anti-HCV por teste imunoenzimático (ELISA) suplementado com teste imunoblot recombinante (RIBA) e detecção do RNA do HCV no soro ou outro líquido corporal por reação em cadeia de polimerase (PCR), porque somente anticorpos anti-HCV não discrimina infecção ativa de passada (BARRET et al., 2001).

A carga viral é um teste complementar ao diagnóstico, devendo ser utilizado para pacientes candidatos à terapêutica antiviral. O RNA-HCV torna-se detectável no soro de sete a 21 dias após a exposição. Os anticorpos anti-HCV aparecem dentro de 20 a 150 dias (em média 50 dias). A elevação das transaminases ocorre de forma oscilante, em geral, após duas a quatro semanas da infecção (ORLAND et al., 2001).

O método mais direto e considerado como padrão para determinar o tipo viral é o sequenciamento do genoma do HCV. A genotipagem analisa as sequências de diferentes regiões do genoma na diferenciação dos tipos e subtipos do HCV podendo ser realizada por técnicas utilizando iniciadores, hibridação com sondas ou digestão enzimática de produtos da PCR (NAKATANI et al., 2008).

2.7.1 Reação em cadeia de polimerase em tempo real

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis em 1984 e foi a base para o desenvolvimento da PCR em tempo real, que prevê a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado (DEEPAK et al., 2007).

A PCR é realizada numa molécula de DNA, que pode ser fita simples ou dupla. Para esta técnica são utilizados dois iniciadores (primers) de oligonucleotídeos, que identificam a sequência de DNA que será amplificada, dNTPs (que são os quatro nucleotídeos – Adenina, Timina, Guanina e Citosina),

uma enzima termo-estável e uma solução tampão com íons de magnésio. A reação é realizada com ciclos de temperatura, primeiro utiliza-se alta temperatura para separar as fitas da dupla hélice de DNA, em seguida a temperatura é reduzida para ligar os iniciadores (primers) na sequência de DNA, (a temperatura de hibridização é calculada de acordo com os nucleotídeos presente nos primers (KUBISTA et al., 2006)), e por último a temperatura sobe um pouco e é mantida em cerca de 72°C (que é ótima para a polimerase que estende os iniciadores por incorporação de dNTPs (Figura 07) (KUBISTA et al., 2006).

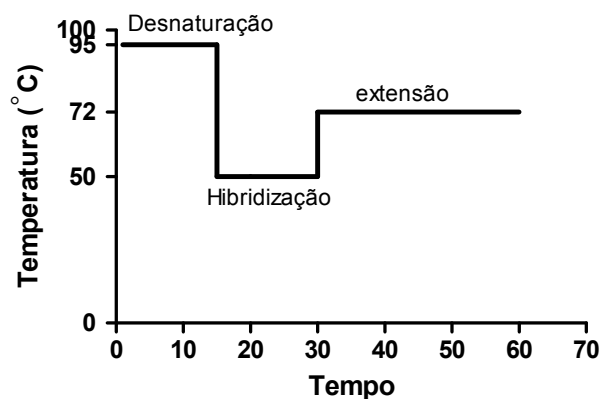


Figura 07: O ciclo de temperatura da PCR: (1) a temperatura é mantida por cerca de 95°C para desnaturar a fita dupla do DNA (2) a temperatura é reduzida para hibridizar os iniciadores (3) a temperatura é modificada para 72°C para a polimerase estender os iniciadores.

A temperatura de desnaturação completa de moléculas de DNA dupla fita, são abreviadas como TD (TD = temperatura de desnaturação = temperatura à qual os amplicons de DNA dupla-fita são desnaturados). E a temperatura de desnaturação pela qual se utilizam sondas híbridas e tem uma sigla de denominação específica - TM (TM = temperatura de desnaturação (temperatura à qual 50% das sondas alvo híbridas se dissociaram) de acordo com a com a sequência, comprimento, e conteúdo de GC, conduzindo assim a um padrão característico de cinética de fluorescência. (WATZINGER et al., 2006).

Perfis de temperatura de desnaturação podem ser usadas para separar amplicons de comprimento longo de produtos mais curtos; diferenciar produtos

de PCR não-específicos que exibem uma sucessão diferente de amplicons específicos, identificar diferenças de bases-únicas, podem ser exploradas para identificar e genotipar vírus homólogos (WATZINGER et al., 2006). Com a análise da curva de desnaturação validada, é também possível determinar a quantidade de amplicons específicos como uma base para o cálculo dos números de cópias da sequencia inicial (DUARTE, 2006; WATZINGER et al., 2006).

A diferença básica entre a PCR tradicional e a PCR em tempo real é a necessidade de uma corrida eletroforética e a revelação do gel de agarose na PCR tradicional e de uma molécula repórter na PCR em tempo real para identificar a amplificação do produto (GASPARIC et al., 2010).

Existem diferentes tipos de repórteres a disposição no mercado, sendo os mesmos classificados de acordo com a maneira que se ligam a molécula alvo, como: sequência inespecífica de ligação ao DNA (SYBR GREEN), tecnologia de primer-base (AmpliFluor, Plexor, Lux primers), técnicas envolvendo sondas de identificação dupla, hibridização comprometida (molecular beacon) e sondas de hidrolises (TaqMan, CPT, LNA, and MGB). Os repórteres mais comuns para a PCR em tempo real são sonda TaqMan e SYBR Green. Os repórteres (moléculas químicas fluorescentes) são apresentados durante o momento de anelamento dos primers e após a extensão, quando as novas fitas de DNA são sintetizadas pela DNA polimerase (GASPARIC et al., 2010).

Os reportéres apresentam mecanismos de ações diferenciados, como por exemplo o SYBR GREEN que liga-se de maneira não-específica as fitas duplas do DNA (dsDNA) e emite fluorescência quando excitado por uma fonte de luz apropriada (HIGUCHI et al., 1993, WATZINGER et al., 2006). Durante a fase de anelamento e extensão, a um aumento na contagem de repórteres ligados a fitas de DNA sintetizadas recentemente conduzindo para emissão de fluorescência máxima até o final da fase de alongamento. Quando o DNA é desnaturado novamente devido ao ciclo da PCR, moléculas de repórteres

intercalantes são liberados na solução resultando em pico de fluorescência (Figura 08) (WATZINGER et al, 2006)

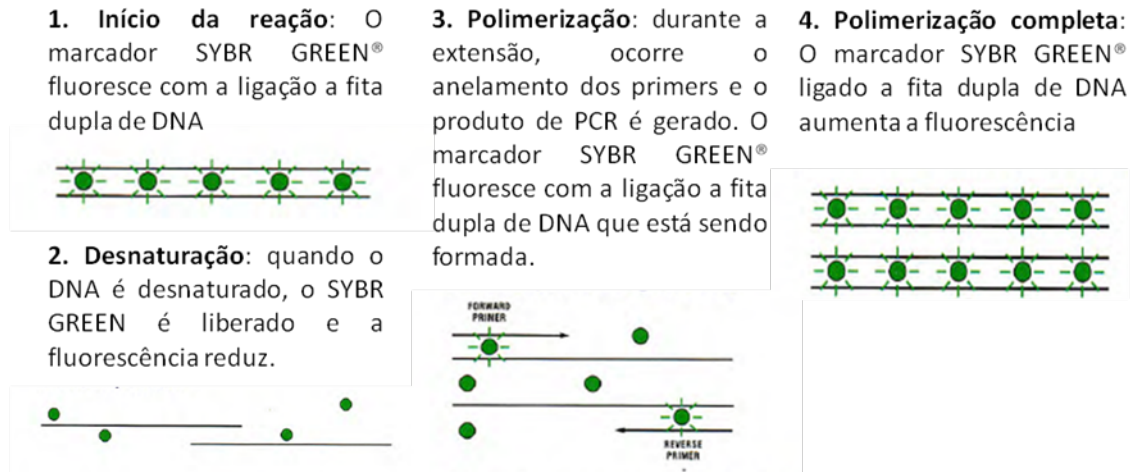


Figura 08: Mecanismo de ação do marcador SYBR GREEN® na PCR em tempo real.

Fonte: adaptado de VAR DER VELDEN et al., 2003.

A fluorescência é registrada depois de cada ciclo ao término da fase de alongamento, e reflete o número de produtos de PCR gerado durante o processo de amplificação. A quantidade de sinal dos produtos acumulados inicialmente aumenta de forma exponencial. É importante considerar que o número de repórteres intercalados é diretamente proporcional a quantidade de sinal de fluorescência emitida que é influenciada fortemente pelo comprimento dos amplicons da PCR. (WATZINGER et al., 2006).

Depois disso, os níveis do sinal param e saturam. O sinal de saturação é exatamente a parada da reação por falta de algum componente crítico, que podem ser iniciadores ou dNTPs. Na PCR a fluorescência desses repórteres aumenta quando ocorre a produção de duplas fitas, mas não é estritamente em proporção porque a fluorescência do repórter depende da relação repórter/bases, que diminui durante o curso da reação (DUARTE, 2006; KUBISTA et al., 2006).

Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge determinado limiar significativamente acima da fluorescência basal da reação e localizado na fase

exponencial da mesma, o *software* do sistema correlaciona o ciclo que isto ocorre com as informações decorrente da curva padrão paralela à reação, o que possibilita a quantificação das amostras (DUARTE, 2006).

Ao final da reação, nos últimos ciclos da PCR, o Delta Rn, variação na fluorescência, que corresponde à quantidade de produto de PCR gerado, tende a convergência (DUARTE, 2006). A análise de curva de desnaturação é finalizada através de plotagem da intensidade de fluorescência contra o gradiente de temperatura em uma escala logarítmica (WATZINGER et al., 2006).

É a propriedade de permitir uma avaliação da reação de PCR em sua fase exponencial que qualifica a PCR em Tempo-Real como metodologia quantitativa. Além disso, não existe comprometimento da sensibilidade original associada à técnica de PCR, o que também a credencia como metodologia qualitativa (DUARTE, 2006).

2.7.2 Detecção de Quasispecies

End-point limiting-dilution real-time PCR assay (EPLD-PCR)

É um método desenvolvido recentemente por Ramachandran e colaboradores (2008) para detecção e sequenciamento de quasispecies de HCV. A técnica tem como base uma reação PCR “Hot-start” nested que é realizada usando o kit LightCycler Fast Start DNA Master Plus SYBR Green (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A análise da curva de desnaturação é realizada após a amplificação (RAMACHANDRAN et al, 2008).

Realiza-se, EPLD-PCR usando 5 diluições seriadas do cDNA para chegar no ponto extremo. Somente o PCR end-point é determinado para cada amostra, as espécimes são diluídas a títulos de diluição limite ou diluição de trabalho da amostra. Moléculas únicas ou clones de variantes virais obtidas na diluição limite são amplificadas utilizando PCRs múltiplos (RAMACHANDRAN et al, 2008).

Com a diluição limite as fitas do DNA alvo são distribuídas de forma Poisson, de modo que muitas reações não carregam moléculas molde, e não gere assim nenhum produto de PCR. Sob tais circunstâncias, reações positivas são mais prováveis de serem iniciadas de uma única molécula molde. Múltiplas amplificações PCR em tempo real e NESTED-PCR são realizadas nesta diluição limite para cada espécime, e cerca de 50-60 amplicons positivos são identificados usando análises da curva de anelamento. Todos os produtos de PCR são sequenciados (RAMACHANDRAN et al., 2008).

Pirosequenciamento 454

Esta tecnologia foi descrita em 2005 pelo grupo Roche como um novo sistema de sequenciamento de DNA. O sistema suporta a análise de amostras de uma grande variedade de materiais, incluindo DNA genômico, produtos de PCR, BACs e cDNA. Amostras como DNA genômico e BACs são fracionados em pequenos fragmentos de 300-800 pares de bases usando um processo mecânico (nebulização). Para fragmentos menores, assim como pequeno RNA não-codificado ou amplicões de PCR, a fragmentação não é necessária. Usando uma série de técnicas de biologia molecular padrão, pequenos adaptadores (iniciadores modificados, denominados A e B) são adicionados para cada fragmento. Os adaptadores são usados para purificação, amplificação e sequenciamento. Fragmentos simples de DNA padrão (sstDNA) com adaptadores A e B compõem a biblioteca de amostras usada para trabalhos subsequentes (DROEGGE & HILL, 2008) (Figura 9).

Durante o seguimento de processo de emulsão da PCR (Figura 9) a biblioteca dos fragmentos simples de DNA [sstDNA] é primeiro misturado com um excesso de beads sepharose que apresenta na sua superfície oligonucleotídeos complementares, por exemplo a sequência do adaptador B da biblioteca de fragmentos. Como resultado a maioria destas beads levam uma única fita simples de DNA da biblioteca de fragmentos. A biblioteca de beads é então emulsificada com reagentes de amplificação em mistura água-óleo. Cada bead é então capturada pelo microreator onde ocorrem amplificações clonais de

sstDNA (10 milhões de moléculas de DNA idênticas por bead) (DROEGGE & HILL, 2008).

Nas preparações para a reação de sequenciamento, as beads da biblioteca de sstDNA são adicionadas no Mix de incubação de beads de DNA (contendo DNA polimerase) e são distribuídas em camada com beads de enzima (contendo sulfúrilase e luciferase) sobre o dispositivo 454 PicoTiterPlate™ (Figura 9). Esta placa de 70mm x 75mm é um dispositivo óptico contendo 1.6 milhões de poços com um diâmetro de 44µm por poço. Somente uma biblioteca de beads (cerca de 30µm) ajusta-se dentro de um poço. A camada de beads enzimáticas assegura que beads DNA permaneçam posicionadas nos poços durante a reação de sequenciamento. O processo de deposição de beads maximiza o número de poços que contem uma biblioteca de bead única amplificada (evitando a deposição de mais de uma biblioteca de beads sstDNA por poço) (DROEGGE & HILL, 2008).

O dispositivo de PicoTiterPlate carregado é colocado no instrumento Genome Sequencer FLX™ (Figura 9). O reagente de sequenciamento (contendo tampões e nucleotídeos) flui do sub-sistema de fluídos pelos poços do dispositivo. Nucleotídeos são transportados sequencialmente em uma ordem fixada pelo dispositivo PicoTiterPlate durante a corrida de sequenciamento. Durante o fluxo de nucleotídeos, 100 de 1000 de cada bead carrega milhões de cópias de uma única fita simples da molécula de DNA que são sequenciadas em paralelo. Se um nucleotídeo complementar para a fita modelo flui dentro do poço, a polimerase estende a fita de DNA existente por adição nucleotídeo(s). Adição de um ou mais nucleotídeos resulta em uma reação que gera um fraco sinal que é capturado pela câmera CCD no instrumento (Figura 9). Em uma corrida limitada, a força do sinal é proporcional para o número de nucleotídeos incorporados em um fluxo de nucleotídeos simples (Figura 9) (DROEGGE & HILL, 2008).

Este procedimento apresenta três características principais: Média do comprimento de leitura de 200-300 bases, a acurácia de uma simples leitura é

maior que 99,5%, erros de substituições são excessivamente raros (menos que 10^{-6}) e apresenta uma grande corrida com mais de 400,000 leituras em média com um comprimento de leitura de 250 bases, 1 gigabase de informações de sequências pode ser gerada em 5 dias (DROEGGE & HILL, 2008).

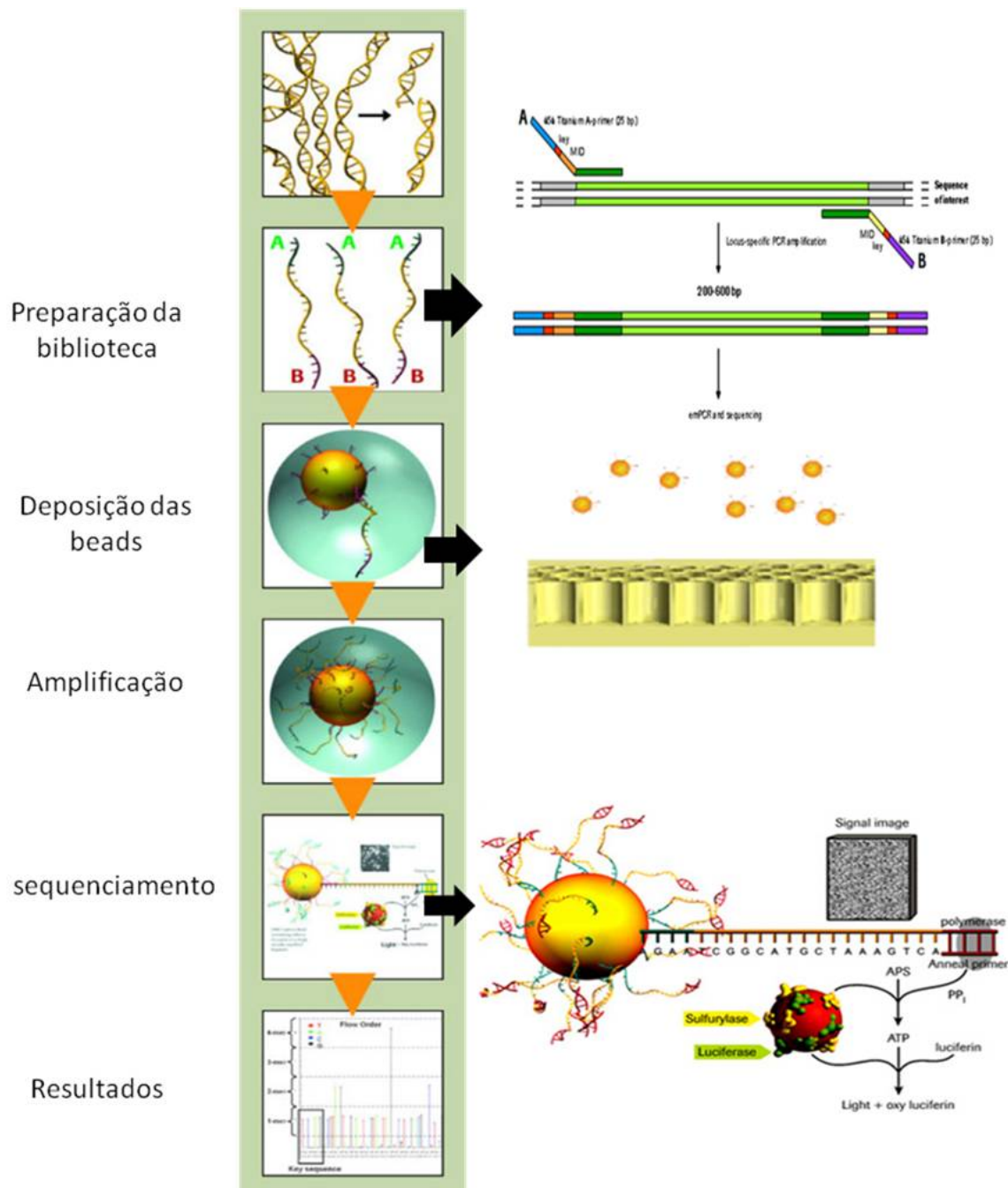


Figura 09: Etapas de execução da tecnologia 454 sequencing.
 Fonte: www.454sequencing.com

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar os diferentes subtipos e quasispécies do vírus da hepatite C, e analisar o perfil da resposta imune em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise na cidade de Manaus-AM.

3.2 Específicos

- Caracterizar os genótipos e os subtipos do HCV de amostras obtidas de pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise.
- Caracterizar a formação de quasispecies do HCV em amostras obtidas de pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise.
- Relacionar as quasispecies encontradas com o perfil da resposta imune celular (Linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ e Leucócitos ativados (CD69⁺) e humoral através da concentração das citocinas Th₁ (IL-12 e IFN- γ), Th₂ (IL-4), supressora (IL-10) e inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- β).

4. METODOLOGIA

4.1 Descrição da área de estudo

O estudo foi realizado na Clínica Renal de Manaus, a qual foi fundada em 1980, sendo o segundo serviço de hemodiálise criado na cidade. A clínica hoje é uma referência em tratamento dialítico em toda região, pois: Atende pacientes oriundos de outros estados: Amapá, Pará, Rondônia, Acre e Roraima; Mantém no quadro efetivo o maior corpo de médicos nefrologista de Manaus; Atende em média 820 pacientes por mês em várias modalidades de tratamento dialítico (Diálise peritoneal e Hemodiálise); as sessões de hemodiálise são geralmente realizadas 3 vezes por semana, com duração de 4 horas e os pacientes são atendidos em horários pré-fixados distribuídos em 3 turnos. Existe uma equipe de profissionais diretamente envolvidos no atendimento dos pacientes em programa de hemodiálise, composta por médicos, enfermeiros, nutricionistas, psicólogos e assistente social.

4.2 Modelo do estudo

Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilístico realizado em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise com anti-HCV reativo.

4.3 Aprovação do Comitê de ética em pesquisa

O estudo teve aprovação do comitê de ética em pesquisa da FHEMOAM (CAAE 0020.0.112.00-08) e do Conselho Nacional em pesquisa – CONEP (342/2009). Sendo seguidas todas as considerações legais preconizadas pelas resoluções CNS 196/96.

4.4 Populações de estudo e casuística

Foram incluídos no estudo pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise e pacientes sem problema renal, ambos reativos para o vírus da

hepatite C e outro grupo negativo para HCV (doadores de sangue e Renais crônicos) . Estes indivíduos participaram anteriormente do estudo desenvolvido pelo grupo de pesquisa do HEMOAM, cujo título foi “Soroprevalência de anticorpos contra o Vírus da hepatite C (HCV) em pacientes em tratamento de hemodiálise” [dissertação] (Laura Patrícia Viana Maia, 2005) e “Avaliação da resposta imune humoral e celular em pacientes com hepatite C com alterações do sono” [dissertação] (Carlos Maurício Oliveira de Almeida, 2006), todos aprovados pelo Comitê de ética em pesquisa (pareceres em anexo). Assim, foram utilizadas as amostras coletadas durante o período de desenvolvimento dos estudos e que foram armazenadas para estudos posteriores.

- Os critérios de elegibilidades

Pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise: Foram incluídos 31 pacientes renais crônicos anti-HCV positivo, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que estavam em tratamento de hemodiálise na Clínica Renal de Manaus. Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa e submetidos a novos testes de diagnósticos para análise do perfil sorológico, bioquímico, celular e humoral. Pacientes HCV positivos co-infectados com outras doenças de transmissão parenteral (HBV, HTLV, Doença de Chagas e sífilis) também foram incluídos na pesquisa. As amostras de sangue foram coletadas em março/2006 e janeiro/2009 e armazenadas a -80°C . Os pacientes que concordaram em participar do mesmo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo).

Foram excluídos os pacientes renais que tiveram resultado negativo na reação em cadeia de polimerase e mulheres gestantes.

Pacientes sem problema renal HCV positivos (Grupo controle): Foram incluídos no estudo 10 pacientes, com mais de 18 anos com diagnóstico confirmatório, compostos de teste ELISA e Imunoblot positivos para o HCV, atendidos no ambulatório de hepatite da Fundação de Medicinal Tropical do Amazonas (FMT-AM) antes do início do tratamento com interferon. Os pacientes que concordaram em participar do mesmo foram convidados a assinar um termo de

consentimento livre e esclarecido (em anexo). As amostras de sangue foram coletadas entre junho/2006 a janeiro/2008 e armazenadas a -80°C.

Doadores de sangue e Pacientes renais crônicos, ambos HCV negativos: Foram incluídos 19 pacientes de cada grupo para serem empregados como grupo controle na análise da resposta imune. Todos apresentavam faixa etária de 18 a 55 anos, de ambos os sexos. Estes indivíduos fizeram parte do estudo anterior “Soroprevalência de anticorpos contra o Vírus da hepatite C (HCV) em pacientes em tratamento de hemodiálise” [dissertação] (Laura Patrícia Viana Maia, 2005), onde também foram empregados como grupo controle. As amostras foram coletadas entre março/2006 a janeiro/2007. Os indivíduos que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo).

4.5 Coletas das amostras de sangue

Foram coletadas através de punção venosa, amostras de 20 mL de sangue periférico, distribuído em três tubos: 10 mL no tubo sem anticoagulante, 5 mL no tubo PPT e 5 mL no tubo com EDTA para processamento e análise dos testes.

Todas as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C do laboratório de sorologia da Fundação HEMOAM. Todas as considerações legais preconizadas pelas resoluções CNS 196/96 e 347/2005 para autorização do armazenamento de amostras biológicas para estudos posteriores foram realizadas conforme Norma institucional (em anexo).

4.6 Testes laboratoriais para triagem das amostras e análise do perfil da resposta imune

Nos estudos anteriores de MAIA e colaboradores (2005) e ALMEIDA e colaboradores (2006) as amostras passaram por uma fase de triagem para HCV através dos testes ELISA e IMUNOBLOT e análise da resposta imune através da

identificação celular (LTCD4⁺, LTCD8⁺ e leucócitos CD69⁺) e dosagem de citocinas (Th1, Th2, supressora e inflamatória) como descrito abaixo.

Teste de triagem: Com o objetivo de selecionar os indivíduos para os estudos, lançamos mão da utilização do método imunoenzimático anti-HCV. Este método consiste na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos do vírus da hepatite C (C, NS3, NS4 e NS5). A reação é considerada positiva quando a absorbância da amostra é superior ao valor do cut off e foi utilizado neste estudo o kit Abbott Murex anti-HCV versão 4.0 (Abbott diagnostic division, RSA) de acordo com as instruções do fabricante. Os testes foram realizados no laboratório de sorologia da Fundação HEMOAM em Manaus (pacientes renais crônicos) e na FMTAM (pacientes sem problema renal).

Imunoblot: Uma vez que as amostras tenham sido selecionadas através da triagem, o próximo passo foi uma análise complementar deste resultado, através da técnica de Imunoblot. Este método baseia-se na pesquisa de anticorpos específicos contra antígenos do vírus da hepatite C. Os antígenos recombinantes purificados do HCV (c100, c33c, c22p e NS5) são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas separadas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroblotting. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram duas ou mais bandas específicas contra os antígenos virais, indeterminadas as que apresentarem uma única banda e negativas quando nenhuma banda foi encontrada.

O teste empregado foi *kit* Chiron® RIBA¹ HCV versão 3.0 SIA (Chiron® Corporation, Emeryville, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os testes foram realizados no laboratório de sorologia da Fundação HEMOAM em Manaus (pacientes renais crônicos) e na FMTAM (pacientes sem problema renal).

Quantificação de Linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ e Leucócitos ativados (CD69⁺): através dos marcadores de superfície celulares: anti-CD8

¹ Recombinant Immunoblot Assay ou Ensaio de Imunoblot recombinante.

(code MHCD0801, marca CALTAG, Caltag laboratories - invitrogen immunodetection, CO, UK) e anti-CD69 (code MHCD6901, marca CALTAG) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) , anti-CD4 (code MHCD0404, marca CALTAG) marcados com ficoeritrina (PE) e anti-CD3 (code MHCD0306, marca CALTAG) marcado com terceira cor, foram identificadas as populações celulares de Linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ e CD3⁺/CD8⁺ e Leucócitos ativados marcados com CD69⁺. A leitura foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo do HEMOAM (pacientes renais crônicos, pacientes sem problema renal, doadores de sangue), no citômetro de fluxo FACScalibur com sistema de detecção de quatro cores (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA).

Dosagem de citocinas circulantes em sangue periférico: Utilizando o método ELISA, realizou-se a quantificação das citocinas do padrão Th1: IL-12 e IFN- γ ; padrão Th2: IL-4; supressora IL-10 e inflamatórias: IL-6, IL-8 e TNF- β empregando anticorpos específicos (purificados e biotinizados) e citocinas padrões. Foi utilizado o *kit* BD OptEIA™ ELISA (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A técnica se baseia no ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sanduíche, utilizando anticorpos monoclonais específicos para citocina a ser pesquisada impregnados em uma placa de 96 poços. Padrões e amostras são adicionados nos poços para que a citocina presente seja ligada ao anticorpo mobilizado. Adiciona-se anticorpo biotinalado anti-citocina e marcado com uma enzima (ex. peroxidase), produzindo o sanduíche (anticorpo-citocina-anticorpo). Os poços são lavados e adicionados o substrato TMB, que produz uma coloração (ex. azul), depois se adiciona uma solução de parada que altera a cor (ex. azul para amarela), realiza-se a leitura no comprimento de onda de 450nm. A intensidade da coloração é proporcional a concentração da citocina.

4.7 Testes Moleculares realizados no Centers for Disease Control and Pevention (CDC/GA/USA)

As amostras anti-HCV positivas (pacientes renais crônicos e sem problema renal) foram enviadas ao CDC para análise molecular. As amostras

foram analisada através da amplificação da região NS5b e E1- HVR1. O Primeiro passo foi identificar o genótipo através da região NS5b, e também, triar as amostras que seriam encaminhadas para análise de quasispecies através da amplificação da região E1-HVR1. Todas as amostras também foram submetidas à técnica de pirosequenciamento 454 para análise das quasispecies, como mostra a figura 10. Em seguida estão descritas as metodologias utilizadas para extração e amplificação das regiões.

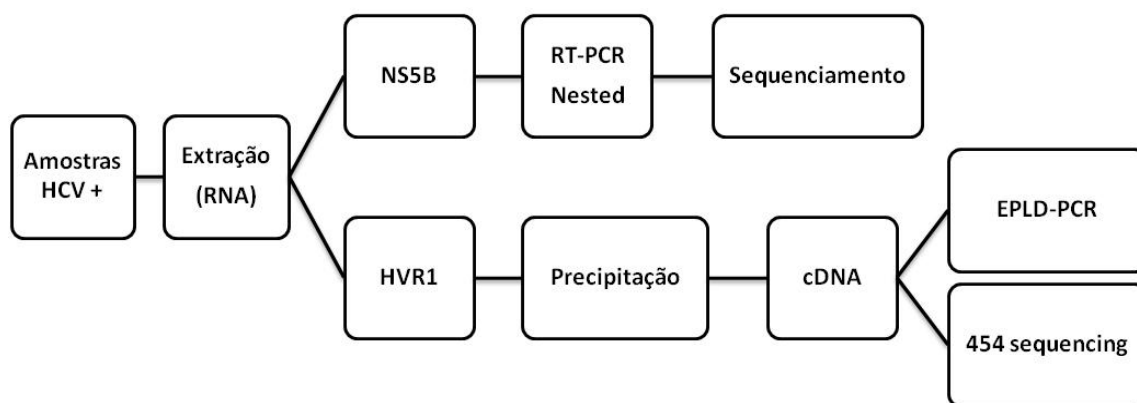


Figura 10: Fluxograma das técnicas realizadas no Centers for Disease Control and Prevention (CDC/GA/USA).

4.7.1 Extração do RNA

O ácido nucléico total de espécies de anti-HCV reativo e Immunoblot reativo ou indeterminado foram extraídos de 100µL soro através do MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) de maneira automatizado através do instrumento Roche MagNA Pure LC, e diluído com 50µl de tampão de acordo com as instruções do fabricante.

A técnica é baseada em beads magnética. As amostras são lisadas por incubação com um buffer especial contendo um sal caotrópico e proteinase K. Partículas de vidro magnéticas (MGPs) são adicionadas e os ácidos nucléicos virais totais contidos na amostra são capturados para sua superfície. Substâncias não capturadas são removidas por lavagens intensivas, e os ácidos

nucléicos virais totais purificados são diluídos em 50µL de tampão de baixa concentração salina.

4.7.2 Precipitação do RNA

A precipitação do RNA extraído foi realizada com o objetivo de se obter uma concentração maior de RNA. O produto da extração (50µL de RNA) foi transferido para um microtubo de 1,5mL, sendo adicionado 50µL de isopropanol e 4µL de glicogênio (ambos gelados) e centrifugados por 30min a 4°C e 14000rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 200µL de etanol 70%, centrifugou-se novamente por mais 30min nas mesmas condições. Desprezou-se o sobrenadante e observou-se a formação de um pellet (RNA precipitado).

4.7.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada usando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). A reação foi realizada com um volume final de 20µL contendo 10µL de 2x first strand reaction Mix, 2µL Superscript enzyme, iniciador 1619R1 (1µM de concentração final) e 6µL água livre de RNA/DNA. Os microtubos foram colocados em um termo-bloco e aquecidos a 50°C por uma hora. Após este processo foi aquecido a 85°C por 15min, para inativação da enzima, estando o cDNA pronto para uso e estocagem a -70°C.

4.7.4 Genotipagem através da região NS5b por RT-PCR

Para determinar o genótipo e subtipo do HCV utilizou-se o segmento da região NS5b, entre as posições 5' 8275-616 3', usando iniciadores bem conservados. As sequências de iniciadores utilizados foram: Iniciadores externos, K1 (fwd) – 5'TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTGA 3' e K2 (rvs) – 5'GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA 3' (ENOMOTO et al., 1990); e iniciadores internos, 122 (fwd)- 5'CTC AAC CGT CAC TGA GAG AGA CAT 3' (SIMMONDS et al., 1993) e R1(rvs) – 5'GCT CTC AGG CTC GCC GCG TCC TC 3' (ALTER et al., 1999) (Tabela 01 e Figura 11). A amplificação da

RT-PCR (Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa) foi realizada com volume final de 10 μ L contendo 5 μ L RNA, iniciador K1 (1 μ M de concentração final) e K2 (1 μ M de concentração final), empregou-se o Kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN Inc., Valencia, CA) utilizando 2 μ L de QIAGEN One Step RT-PCR 5x buffer (1x e 2.5mM MgCl₂), 0.5 μ L do mix de desoxinucleosídeo trifosfato (10mM cada), e 0.5 μ L do mix de enzima One Step (QIAGEN Inc., Valencia, CA). A reação foi realizada no Thermal Cycler (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA). O programa de termociclagem consistiu de transcrição reversa (50°C por 60 min); pré-incubação (95°C por 15min) para ativação, fase de amplificação conduzida por 40 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 30sec); hibridização (58°C por 30sec) e extensão (72°C por 1min); um ciclo final de extensão (72°C por 15min) e resfriamento para 4°C. O produto da PCR foi diluído em água livre de RNase na concentração de 1:5.

O NESTED-PCR foi realizado em PCR real-time com volume final da reação de 20 μ L contendo 2 μ L produto RT-PCR, iniciador 122 (1 μ M), iniciador R1 (1 μ M), 4 μ L água livre RNase e 10 μ L do Perfecta SYBR Green FastMix 2x (1x) [Perfecta SYBR Green FastMix kit, ROX (Quanta Biosciences, Inc., Gaithersburg, MD)]. A plataforma RT-PCR foi Stratagene MX3005P thermocycler (Stratagene Corp, La Jolla, CA). O programa de termociclagem consistiu de pré-incubação a 95°C por 5min para ativar, amplificação da PCR foi realizada em 30 ciclos, consistindo de desnaturação (95°C por 20s), hibridização (56°C por 20s) e extensão (72°C por 1min). Após amplificação, análise da curva de desnaturação (curva melte) foi obtida por elevação da temperatura para 95°C por 1s, 60°C por 1s seguida de 95°C por 1s, e resfriamento para 25°C. O produto do Nested foi diluído em água livre RNase na diluição de 1:10.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação da região NS5b do HCV.

Nome do Iniciador	Sequências	Produto pb	Posição na região	Autor
K1	5'TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGA	342	8253-8274	Enomoto et al (1990)
K2	5'GGCGGAATTCCTGGTCATAGCCTCCGTGAA3		8617-8647	
122	5'CTCAACCGTCACTGAGAGAGACAT3'	295	8283-8307	Simmonds et al (1993)
R1	5'GCTCTCAGGCTCGCCGCGTCCTC3'		8592-8615	Alter et al (1999)

H77 NC_0041021 - Sequência referência utilizada para cálculo da posição na região NS5b.

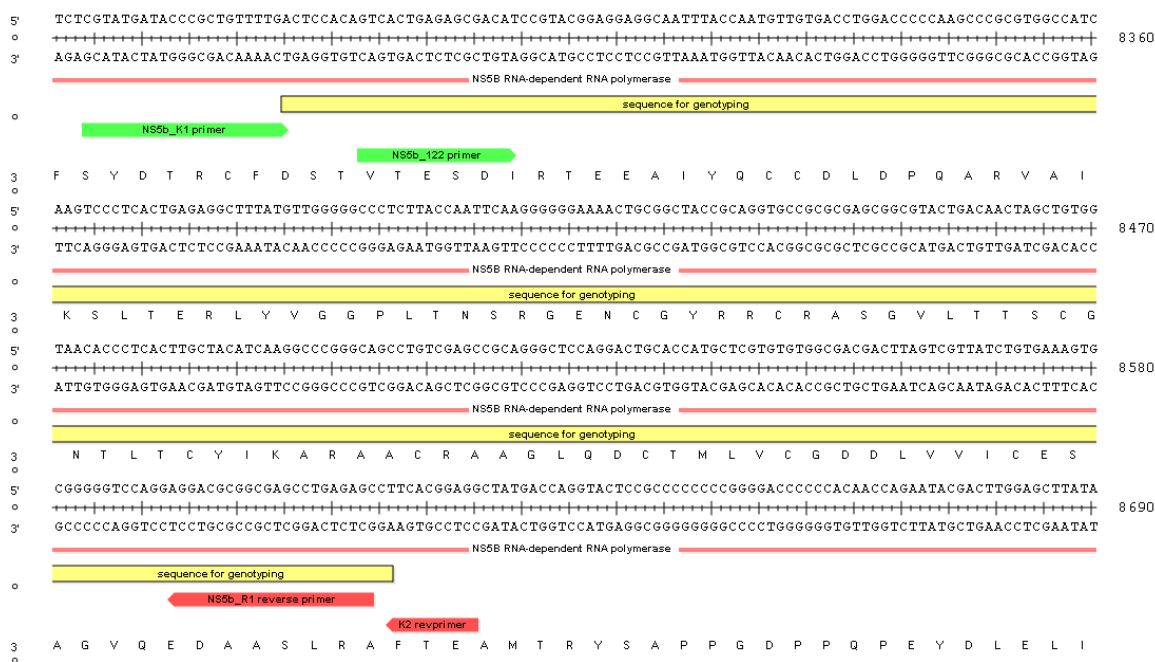


Figura 11: Localização dos iniciadores para a região NS5b no genoma do HCV. Utilizou-se a sequencia H77 como referência, depositada no Pubmed com número de acesso NC-004102.

4.7.5 Sequenciamento da Região NS5b

Para a reação de sequenciamento foi utilizada a região entre as posições 5' 8320-593 3', sendo sequenciada no sentido 5'-3' e 3'-5', para ser criada a sequência consenso. As sequências de iniciadores utilizados foram: 122 (fwd)- 5'CTC AAC CGT CAC TGA GAG AGA CAT 3' (SIMMONDS et al., 1993) e R1(rvs) – 5'GCT CTC AGG CTC GCC GCG TCC TC 3' (ALTER et al., 1999). A reação de sequenciamento da região NS5b foi realizada usando o kit de sequenciamento químico BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A amplificação da PCR foi realizada em 10µL volume de reação final contendo 8µL do produto do NESTED (diluído 1:10), iniciador (1µM de cada) e 1µl Big Dye. A reação foi realizada no Thermal Cycler (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA), o programa de termociclagem consistiu de amplificação conduzida por 25 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (94°C por 10s); hibridização (50°C por 10s) e extensão (60°C por 4min) e resfriamento para 8°C. Os produtos foram sequenciados usando o sequenciador automatizado 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems.

4.7.6 Detecção de Quasispecies

4.7.6.1 End-point limiting-dilution real-time PCR (EPLD-PCR)

Para determinar as quasispecies do HCV utilizou-se o segmento da região E1 e parte da E2 (HVR1), entre as posições 5' 1294-610 3'. A sequência de iniciadores utilizados foram: Iniciadores externos, 1295F1 (fwd) – 5'TGGCTTGGGATA TGATGATGAACT 3' e 1619R1 (rvs) – 5' GCAGTCCTGTTGATGTGCCA 3' e iniciadores internos, 1302F2 (fwd)- 5' GGATATGATGATGAACTGGT 3' e 1610R2 (rvs) – 5' TTGATGTGCCAGCTGCCGTTGGTGT 3' (RAMACHADRAN et al., 2008) (Tabela 02 e Figura 12).

Tabela 2: Iniciadores utilizados para a amplificação da região E1-E2 (HVR1) do HCV.

Nome do Iniciador	Sequências	Produto	Posição na região	AUTOR
1295F1	5' TGGCTTGGGATATGATGATGAACT 3'	281	1294-1317	RAMACHADRA N et al 2008
1619R1	5' GCAGTCCTGTTGATGTGCCA 3'		1599-1619	
1302F2	5' GGATATGATGATGAACTGGT 3'	265	1301-1320	RAMACHADRA N et al 2008
1610R2	5' TTGATGTGCCAGCTGCCGTTGGTGT 3'		1586-1610	

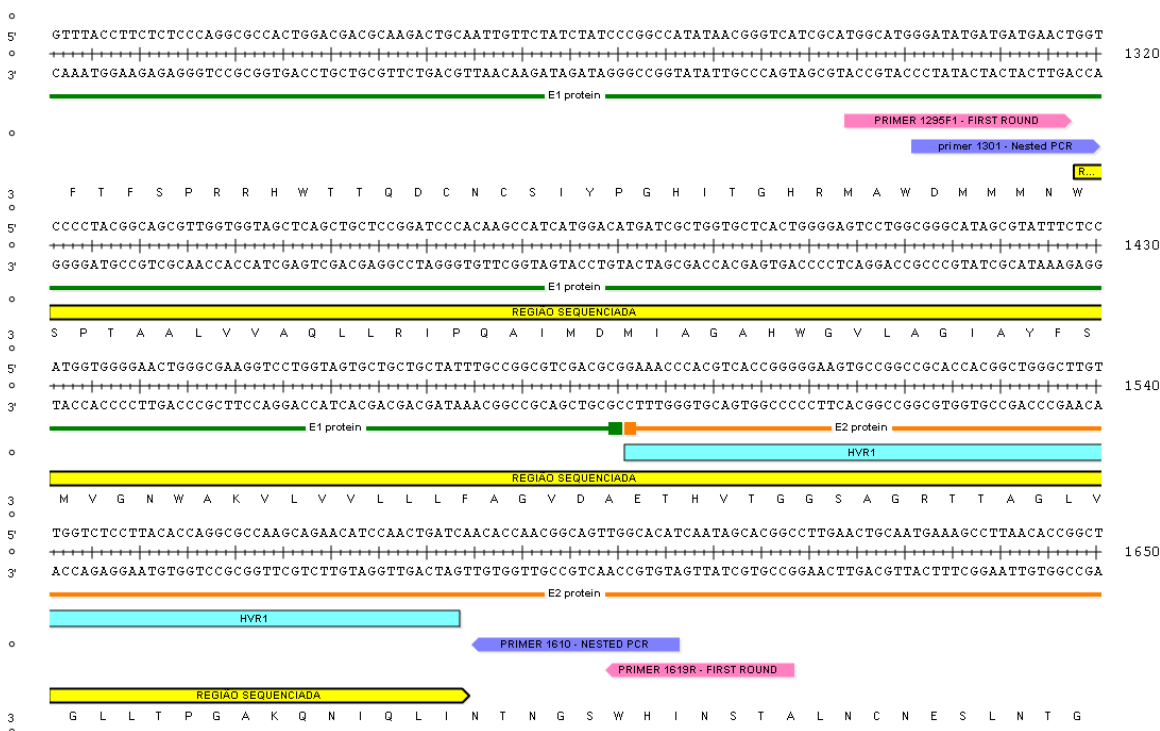


Figura 12: Localização dos iniciadores para a região E1-E2 HVR1 no genoma do HCV. Utilizou-se a sequência H77 como referência, depositada no Pubmed com número de acesso NC-004102.

Esta metodologia é constituída por seis protocolos. O protocolo 1 e 2 tem o objetivo de determinar o limite de diluição a ser utilizado, o protocolo 3 e 4 promove a amplificação dos clones por PCR em tempo real, o protocolo 5 é o momento de seleção dos clones positivos e o protocolo 6 é a reação de sequenciamento dos clones.

Determinação do limite de diluição

Diluição da amostra - adicionou-se 100µL água livre DNA/RNA na placa de diluição (placa de 96 poços), transferiu-se 20µL cDNA para a primeira coluna da placa de diluição e em seguida transferiu-se 20µL do cDNA diluído para a sétima coluna. Fizeram-se diluições seriadas, transferindo 10µL para cada poço (FIGURA 13).

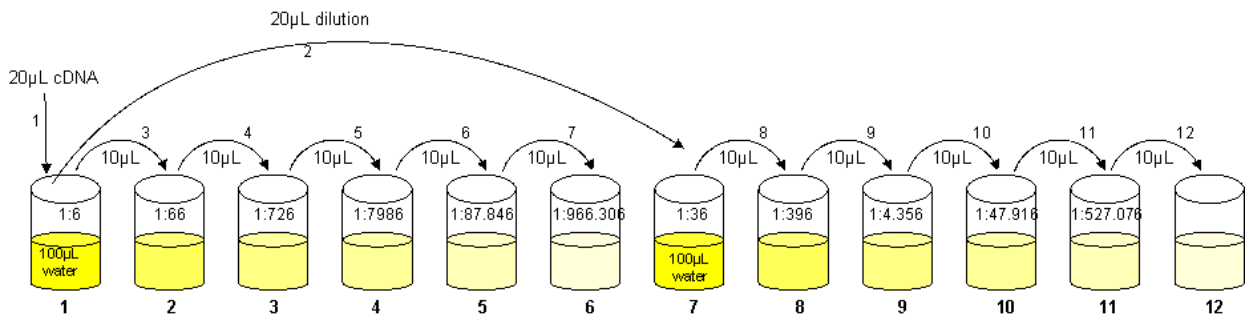


Figura 13: Diluições das amostras para a técnica de EPLD-PCR.

FORNE: MAIA (2009).

Amplificação por PCR - Transferiu-se 2µL cDNA diluído em quadruplicata de cada diluição para a placa de 384 poços. A amplificação da PCR em tempo real foi realizada em 10µL volume de reação final contendo 2µL cDNA diluído, iniciador 1295F1 (1µM) e iniciador 1619R1 (1µM), empregou-se o Kit Quanta PerfeCta™ SYBR® Green FastMix™ (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) utilizando 5 µL de PerfeCta SYBR Green FastMix 2x buffer (1.25x) e 1µL de água livre de RNA/DNA. A reação foi realizada no LightCycler 480 Roche (Roche diagnostics Corporation, Indianapolis, USA), o programa de termociclagem consistiu de pré-incubação (95°C por 5 min) para ativação e fase de amplificação conduzida em 35 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 10s); hibridização (58°C por 20s) e extensão (72°C por 15s); a curva desnaturação foi obtida por aumento da temperatura para 95°C, redução para 78°C e mantida por 1min, sendo as aquisições realizadas a 96°C, seguida de resfriamento para 4°C.

Amplificação por NESTED-PCR - A amplificação da PCR em tempo real foi realizada em 10µL volume de reação final contendo 2µL do produto da primeira PCR, iniciador 1302F2 (1µM) e iniciador 1610R2 (1µM), empregou-se o Kit Quanta PerfeCta™ SYBR® Green FastMix™ (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) utilizando 5 µL de PerfeCta SYBR Green FastMix 2x buffer (1.25x) e 1µL de água livre de RNA/DNA. A reação foi realizada no LightCycler 480 Roche (Roche diagnostics Corporation, Indianapolis, USA), o programa de termociclagem consistiu de pré-incubação (95°C por 5 min) para ativação e fase de amplificação conduzida em 35 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 10s); hibridização (58°C por 20s) e extensão (72°C por 15s); a curva de desnaturação foi obtida por aumento da temperatura para 95°C, redução para 78°C e mantida por 1min, sendo as aquisições realizadas a 96°C, seguida de resfriamento para 4°C. Analisou-se o resultado da diluição, escolhendo-se a diluição que apresentava dois poços positivos e dois poços negativos ou um poço positivo e três negativos. Os picos das amostras positivas ocorreram entre 81°C e 86°C.

Amplificação dos clones por PCR real time com a diluição padronizada

Amplificação por PCR real time - Foi utilizada a placa de diluição do protocolo 1, identificando-se nesta placa a diluição escolhida no resultado do protocolo 2. A amplificação da PCR em tempo real foi realizada em 10µL volume de reação final contendo 2µL cDNA diluído (transferido da placa de diluição do protocolo 1), iniciador 1295F1 (1µM) e iniciador 1619R1 (1µM), empregou-se o Kit Quanta PerfeCta™ SYBR® Green FastMix™ (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) utilizando 5 µL de PerfeCta SYBR Green FastMix 2x buffer e 1µL de água livre de RNA/DNA, este procedimento foi repetido 96 vezes por amostra. A reação foi realizada no LightCycler 480 Roche (Roche diagnostics Corporation, Indianapolis, USA), o programa de termociclagem consistiu de pré-incubação (95°C por 5 min) para ativação e fase de amplificação conduzida em 35 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 10s); hibridização (58°C por 20s) e extensão (72°C por 15s); a curva de desnaturação foi obtida por aumento da temperatura para 95°C, redução para 78°C e mantida por 1min, sendo as aquisições realizadas a 96°C, seguida de resfriamento para 4°C.

Amplificação por NESTED-PCR - A amplificação da PCR em tempo real foi realizada em 10 μ L volume de reação final contendo 2 μ L do produto da primeira PCR, iniciador 1295F1 (1 μ M) e iniciador 1610R2 (1 μ M), empregou-se o Kit Quanta PerfeCta™ SYBR® Green FastMix™ (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA) utilizando 5 μ L de PerfeCta SYBR Green FastMix 2x buffer e 1 μ L de água livre de RNA/DNA. A reação foi realizada no LightCycler 480 Roche (Roche diagnostics Corporation, Indianapolis, USA), o programa de termociclagem consistiu de pré-incubação (95°C por 5 min) para ativação e fase de amplificação conduzida em 35 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 10s); hibridização (58°C por 20s) e extensão (72°C por 15s); a curva desnaturação foi obtida por aumento da temperatura para 95°C, redução para 78°C e mantida por 1min, sendo as aquisições realizadas a 96°C, seguida de resfriamento para 4°C.

Seleção dos clones

Os clones positivos (10 μ L) foram transferidos do protocolo 4 para uma placa de 96 poços.

Reação de sequenciamento

Preparou-se a reação de sequenciamento, sendo realizado o sequenciamento da fita sense e da anti-sense. Transferindo-se 2 μ L clones (quasispecies) e diluindo-se com 20 μ L água livre DNA/RNA. A amplificação da PCR foi realizada em 10 μ L do volume de reação final contendo 2 μ L dos clones diluídos, iniciador sense 1302F2 (1 μ M) ou iniciador anti-sense 1610R2 (1 μ M). Empregou-se o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando 1 μ L de buffer 5x, 1 μ L de BigDye® e 5 μ L de água livre de RNA/DNA. A reação foi realizada no Geneamp® PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O programa de termociclagem consistiu da fase de amplificação conduzida por 25 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 10s); hibridização (50°C por 20s) e extensão (60°C por 4min) e resfriamento para 4°C e as amostras foram

sequenciadas usando o sequenciador automatizado 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA.

4.7.6.2 Análise de quasispecies através do pirosequenciamento 454

Preparo do cDNA

Para analisar as quasispecies do HCV utilizou-se o segmento da região HVR1, entre as posições 5' 1294-1610 3'. A sequência de iniciadores utilizados foram: Iniciadores externos, 1295 (fwd) – 5' TGGCTTGGGATATGATGATGAACT 3' e 1619 (rvs) – 5' GCAGTCCTGTTGAT GTGCCA 3' (descritos por RAMACHADRAN et al., 2008) (Figura 12); e iniciadores internos modificados, 1302 (fwd)- 5' GGATATGATGATGAACTGGT3' e 1610(rvs) – 5' TTGATGTGCCAGCTGCCGTT GGTGT 3' (descritos por RAMACHADRAN et al., 2008) (Tabela 03, Figura 14 e 15) . A amplificação da PCR foi realizada em 22µL volume de reação final contendo 5µL RNA, iniciador 1295F1 (1µM), iniciador 1619R1 (1µM) e 12µl água livre de DNA/RNA, empregou-se o Kit QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN Inc.,Valencia, CA) utilizando 2µL de QIAGEN One Step RT-PCR 5x buffer (1x e 2.5mM MgCl₂), 0.5µL do mix de desoxinucleosídeo trifosfato (10mM cada), e 0.5µL do mix de enzima One Step (QIAGEN Inc., Valencia, CA). A reação foi realizada no Thermal Cycler (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA), o programa de termociclagem consiste de transcrição reversa (50°C por 60 min); pré-incubação (95°C por 15min) para ativação, fase de amplificação conduzida por 40 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 30s); hibridização (58°C por 30s) e extensão (72°C por 1min); um ciclo final de extensão (72°C por 15min) e resfriamento para 4°C.

O NESTED-PCR foi realizado em PCR real-time com volume final de reação de 20µL contendo 2µL produto RT-PCR, 2 µL iniciador 1302F2 modificado (1µM), 2µl iniciador 1610R2 modificado (1µM), 4µl água livre RNase e 10µL do Perfecta SYBR Green FastMix 2x (1x) [Perfecta SYBR Green FastMix kit, ROX (Quanta Biosciences, Inc., Gaithersburg, MD)]. A plataforma RT-PCR foi

Stratagene MX3005P thermocycler (Stratagene Corp, La Jolla, CA). O programa de termociclagem consistiu de pré-incubação (95°C por 5min) para ativação e amplificação da PCR, a qual foi realizada em 45 ciclos, sendo cada ciclo constituído por desnaturação (95°C por 15s), hibridização (58°C por 15s) e extensão (72°C por 32s). Após amplificação, análise da curva desnaturação foi obtida por elevação da temperatura para 95°C por 15s, redução para 70°C por 1s e aumento para 95°C por 1s, finalizando com resfriamento para 25°C.

Tabela 3: Iniciadores utilizados para a amplificação da região E1-E2 HVR1 do HCV pela Tecnologia 454 sequencing.

Nome do Primer	Sequências	Produto pb	Posição na região	Autor
1295F1	5' TGGCTTGGGATATGATGATGAACT 3'	281	1294-1317	RAMACHADRAN ET AL 2008
1619R1	5' GCAGTCCTGTTGATGTGCCA 3'		1599-1619	

Nome do Primer	Primer de Sequenciamento			Primer de amplificação	Produto pb	Posição na região
	Sequenciamento	Chave	MID*			
MID1302A	5'GCCTCCCTCGCGCCA	TCAG	ACGAGTGCCT	GGATATGATGAT GAACTGGT3'	265	1301-1320
MID1610B	5'GCCTTGCCAGCCCGC	TCAG	ACGAGTGCCT	TTGATGTGCCAG CTGCCGTTGGT GT3'		1586-1610

*As MIDs sofrem variações na sequência para serem utilizadas na identificação de cada amostra, podendo ser analisado até 12 amostras agrupadas em um pool para emPCR e sequenciadas. Após o sequenciamento, o GS FLX software identifica automaticamente e separa cada leitura por sequência de MID específica da amostra. Segue as variações das MIDs utilizadas.

MID 1	ACGAGTGCCT	MID 5	ATCAGACACG	MID 9	AGTATCAGC
MID 2	ACGCTCGACA	MID 6	ATATCGCGAG	MID10	TCTCTATGCG
MID 3	AGACGCACTC	MID 7	CGTGTCTCTA	MID11	TGATACGTCT
MID 4	AGCACTGTAG	MID 8	CTCGCGTGTC	MID12	TACTGAGCTA

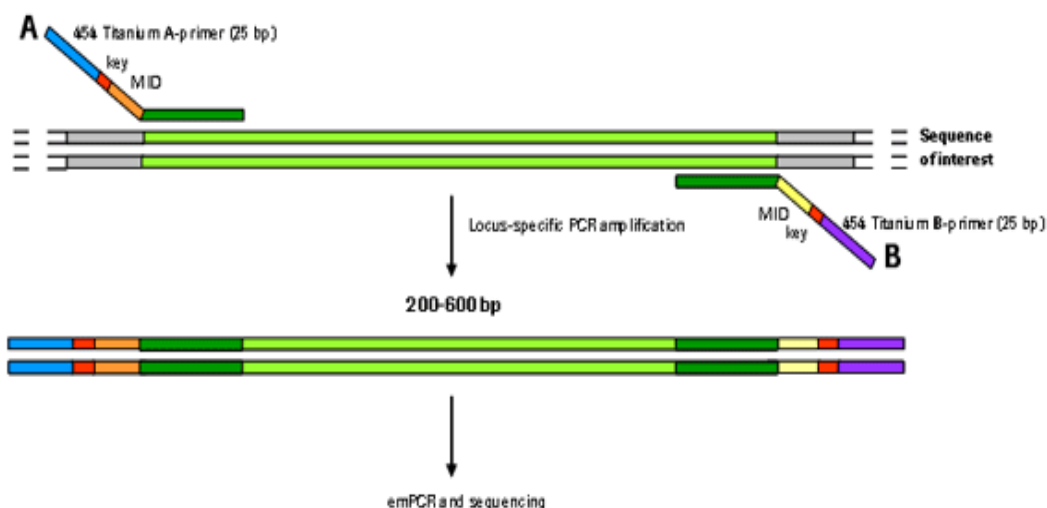


Figura 14: Iniciadores modificados utilizados na tecnologia 454 sequencing e sua ligação com a sequência de interesse.

Fonte: www.454sequencing.com

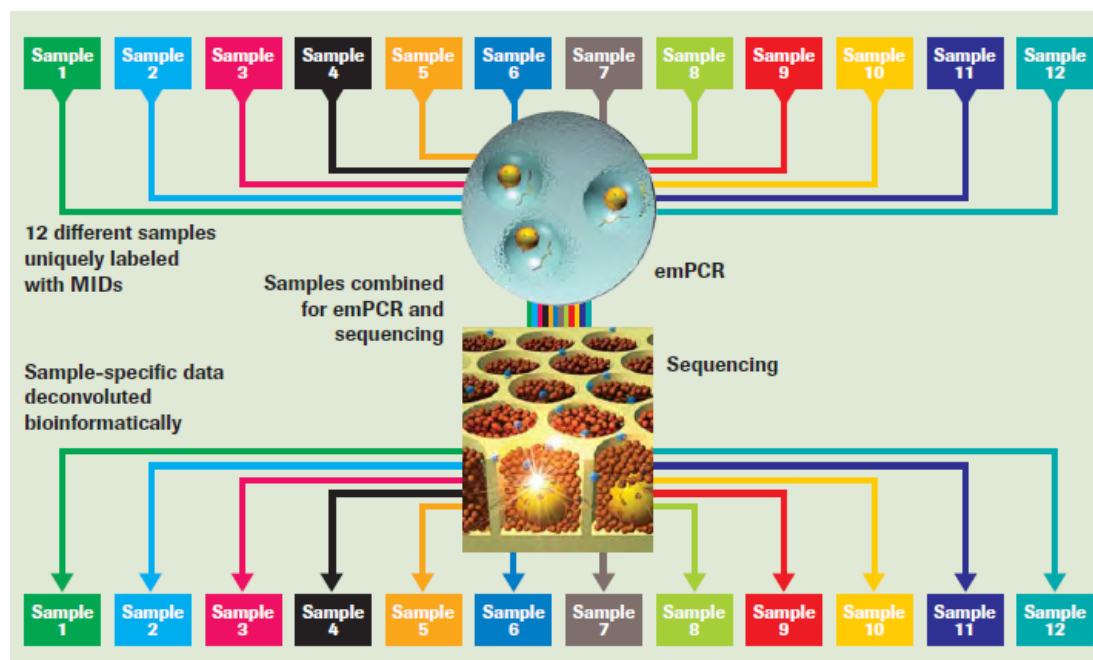


Figura 15: Fluxograma das MIDs de identificação usadas nos iniciadores modificados para o 454 sequencing.

Fonte: www.454sequencing.com

Preparação da Biblioteca de amplicons

A amplificação da PCR foi realizada em 52µL volume de reação final, primeiro preparou-se o mix com 41µl água livre de DNA/RNA, 5 µL de 10x FastStart High Fidelity Reaction buffer with 18mM MgCl₂ (1x e 1.8mM MgCl₂), 1µL do mix de desoxinucleosídeo trifosfato (10mM cada), 1µL primer MID1302A (0,2µM), 1µL primer MID1610B (0,2µM), 1µL do FastStart High Fidelity Enzyme Blend (0,1U/µL) e 2 µL de cDNA. A reação foi realizada no Thermal Cycler (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA), e o programa de termociclagem consistiu de pré-incubação (95°C por 5min) para ativação, fase de amplificação conduzida por 35 ciclos – cada ciclo consistindo de desnaturação (95°C por 30s); anelamento (58°C por 30s) e extensão (72°C por 30s); um ciclo final de extensão (72°C por 7min) e resfriamento para 4°C.

Purificação do produto amplificado

Após a amplificação transferiu-se 45µL do produto para um tubo de microcentrifuga de 1,7mL adicionando-se exatamente 72µL de Ampure SPRI beads. Incubou-se por 5 min a temperatura ambiente. Através do Magnetic Particle Collector (MPC) o sobrenadante foi removido e as beads lavadas duas vezes com 200µL de etanol a 70%. Deixou-se o tubo secar completamente até se observar craquelamento no pellet. O tubo foi removido do MPC, adicionado 15µL de Buffer TE 1x e homogeneizado para ressuspender as beads. O tubo foi colocado novamente no MPC para a retirada do sobrenadante que contém a biblioteca de amplicons.

Ao final deste processo as bibliotecas de amplicons prontas foram encaminhadas para o laboratório co-facility, onde se encontrava o equipamento 454 sequencing (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Ao receberem as amostras, realizaram uma quantificação dos amplicons padronizando aproximadamente 200 cópias/µL, em seguida captura de um amplicon por bead, amplificação por PCR emulsão e sequenciamento (como descrito no item 2.7.2 e representado na figura 9).

4.8 Análise e tratamento dos dados

Análises preliminares das sequências foram conduzidas através do Software SeqMan para criar as sequências consensos e corrigir erros de interpretação entre as fitas. Em seguida as sequências de nucleotídeos foram alinhadas no programa Megalign usando o Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Clustal W produz alinhamentos de múltiplas sequências biologicamente significantes de sequências divergentes. Calcula-se a melhor partida para as sequências selecionadas, e as alinham em ordem para identificar as sequências semelhantes e diferentes.

As sequências de nucleotídeos foram também alinhadas através do programa MUSCLE versão 3.6 (EDGAR et al., 2004). Os genótipos foram classificados baseados na sequência NS5b através da comparação de cada sequência com as sequências referência publicadas no GENBANK (número de acesso: NC004102.1, NC009823.1, NC009826.1 NC009824.1 NC009827.1 NC009825.1, AF009606.1, M67463.1, D10749.1, AJ238799.1, AF483269.1, AB080299.1, U16362.1, D14853.1, AY051292.1, Y13184.1, D10988.1, AB047639.1, D84262.1, Y12083.1, Y11604.1, D49374.1, D28917.1, D17763.1).

A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 5 (TAMURA et al, 2011) através do método de Neighbor-Joining e a substituição de nucleotídeos foi avaliada pelo método de Kimura-2-parâmetro, definido pelo programa JmodelTest versão 0.1 (POSADA et al., 2003). A reprodutibilidade do padrão de ramificação foi determinado, usando análise de bootstrap (500 réplicas). A distribuição das frequências de distância pair-wise entre as sequências de nucleotídeos foram estimadas usando o MEGA 5.

O median-joining network (MJN) para a região HVR1 foi construído usando o programa NETWORK 4.0b através do Median-Joining network (MJN) (BANDELT et al., 1999). O método de MJN inicia a computação de mínimas árvores geradoras (gráfico que conecta todas as sequências com o mínimo comprimento necessário dos ramos), em seguida todos os gráficos construídos são combinados com um único (rede) network. (BANDELT et al, 1999).

Empregou-se o algoritmo de Parcimony, que soma algumas sucessões de consensos subsequentemente (chamando Vetores Medianos) de três sucessões mutuamente íntimas de cada vez. Estes vetores medianos podem ser interpretados biologicamente, como possivelmente, existentes de sucessões de incontáveis ou sucessões ancestrais extintas. A rede resultante regularmente abriga todas as ótimas árvores, como também numerosas ramificações com baixa relação (BANDELT et al., 1999).

Para a análise da razão Dn/Ds foi utilizado o programa Datamonkey (WAYNE et al., 2010). Para a análise da diversidade genética utilizou-se o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005), para a análise da resposta imune foi utilizado o programa GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California, USA) e as análises estatísticas foram realizadas através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

5. RESULTADOS

5.1 Análise do subtipo do Vírus da Hepatite C através da região NS5b

Neste estudo foram inseridos dois grupos populacionais, o grupo de renais crônicos constituído por 31 pacientes que apresentavam anticorpo contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) e estavam em tratamento na Clínica de Hemodiálise em Manaus e o outro grupo, denominado grupo controle, composto de 10 pacientes que não apresentavam problema renal e com sorologia anti-HCV reativa. Para a análise do subtipo do HCV foi escolhida a região NS5B, por ser uma região bem conservada e essencial para a replicação viral. A amplificação da região NS5b também foi utilizada como um fator de triagem das amostras para a realização da técnica de EPLD-PCR que verificou a formação de quasispecies por amplificação da região E1-HVR1, por se tratar de uma técnica com alto custo financeiro.

Entre as 41 amostras inseridas, 19 amostras dos renais crônicos e 9 amostras dos controles apresentaram-se positivas durante a RT-PCR sendo possível realizar a análise filogenética dos subtipos virais; e 12 amostras dos renais crônicos e 1 amostra do controle foram RT-PCR negativas sendo excluídas do estudo porque não foi possível a identificação do subtipo em razão da baixa carga viral ou não detecção do RNA viral. Após a amplificação, estas amostras com RT-PCR positivo seguiram para o estudo de quasispecies através da análise da região E1-HVR1, obtendo como resultado clones de 17 amostras de Renais crônicos e de 7 amostras do grupo controle. Desta análise foram excluídas 2 amostras dos RC e 2 dos controles por se observar baixa qualidade nas sequências obtidas. A figura 16 representa o fluxograma de processamento e resultados obtidos nas amostras.

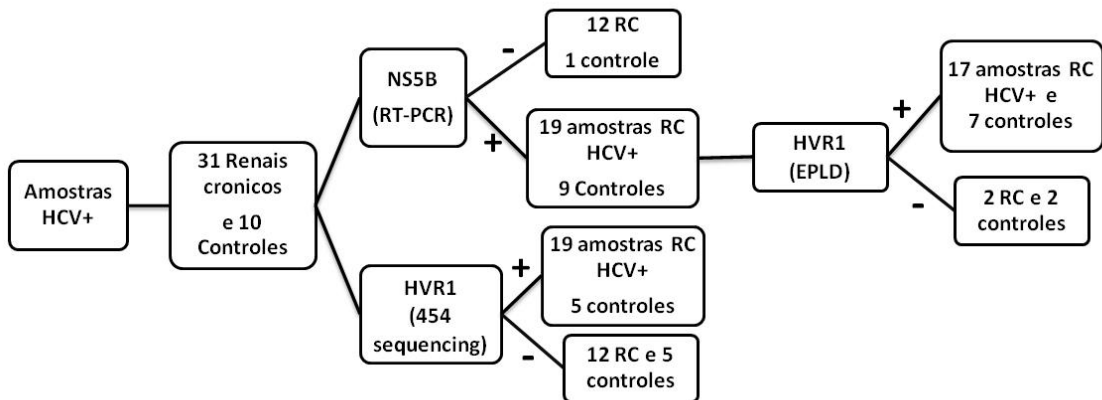


Figura 16: Fluxograma de processamento das amostras para a região NS5B e HVR1 no grupo de Renais crônicos e grupo controle (pacientes sem problema renal) ambos com sorologia reativa ao vírus da hepatite C. Os sinais positivos (+) indicam pacientes que foram mantidos para análise e o sinal negativo (-) indicam os pacientes excluídos do estudo por não ocorrer amplificação da região analisada.

Entre o grupo dos pacientes Renais crônicos observou-se 52,6% (n=10) do sexo masculino com média de idade de $45,5 \pm 14,0$ e 47,4% (n=9) do sexo feminino com média de idade de $44,5 \pm 14,5$. Dando uma razão entre homens e mulheres de 1,1:1. O grupo controle foi formado por 44,5% (n=4) por pacientes do sexo masculino com média de idade de $49,7 \pm 7,9$ e 55,5% (n=5) do sexo feminino com média de idade de $45,2 \pm 11,8$.

A descrição filogenética da região NS5b demonstrou a presença de 3 grupos: 1a, 1b e 3a. O genótipo com maior prevalência foi o genótipo 1, distribuído entre dois subtipos (a e b), o subtipo 1a foi observado em 57,9% (n=11) dos pacientes em tratamento de hemodiálise, onde 26,3% (n=5) eram do sexo feminino e 31,6% (n=6) do sexo masculino. O subtipo 1b esteve presente em 36,8% (n=7), sendo 15,8% (n=3) do sexo feminino e 21% (n=4) do sexo masculino. Detectou-se o genótipo 3a em 5,3% (n=1) das amostras. Os demais genótipos e subtipos não foram observados nas amostras analisadas (TABELA 4).

Tabela 4: Distribuição dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise obtidos através da amplificação da região NS5b.

GENÓTIPO	SUBTIPO	Controle				Renais crônicos			
		F		M		F		M	
		n	%	n	%	n	%	n	%
1	a	1	14,3	1	14,3	5	26,3	6	31,6
	b	2	28,6	-	-	3	15,8	4	21,0
3	a	1	14,3	2	28,6	1	5,3	-	-
Total		4	57,2	3	42,9	9	47,4%	10	52,6%

Como mostra a Tabela 5, 31,6% (n=6) dos pacientes renais crônicos, HCV⁺, também apresentaram reatividade para os marcadores anti-HBc e anti-HBs, sendo 66,7% (n=4) do sexo feminino nos quais foram observados com genótipo 1a (16,7%, n=1) e 1b (50%, n=3) e 33,3% (n=2) do sexo masculino com o genótipo 1a (TABELA 5). E um paciente do sexo feminino HCV⁺, genótipo 1a apresentou co-infecção com HBV e HTLV.

Tabela 5: Distribuição dos genótipos e subtipos do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise que apresentaram co-infecção com o vírus da Hepatite B.

GENÓTIPO	SUBTIPO	Co-infecção HCV e HBV		TOTAL
		sexo		
		F	M	
1	a	1 (16,7%)	2 (33,3%)	3 (50%)
	b	3 (50%)	-	3 (50%)
Total		4 (66,7%)	2 (33,3%)	6 (100%)

A descrição filogenética demonstrou um agrupamento bem definido junto às sequências analisadas comparadas as de referência para os subtipos 1a, 1b e 3a, sendo aplicada a análise estatística de “*bootstrap*” observando-se significância estatística para os nós principais correspondentes a estes subtipos na árvore obtida (100% das replicatas produzidas no “*bootstrap*”).

As sequências pertencentes aos subtipos 1a e 1b se agruparam próximas às sequências de referência dos mesmos, mas não houve suporte estatístico suficiente para as ramificações obtidas dentro do grupo do subtipo. Neste estudo não foram identificadas amostras com os genótipos 2, 4, 5 e 6 (Figura 17).

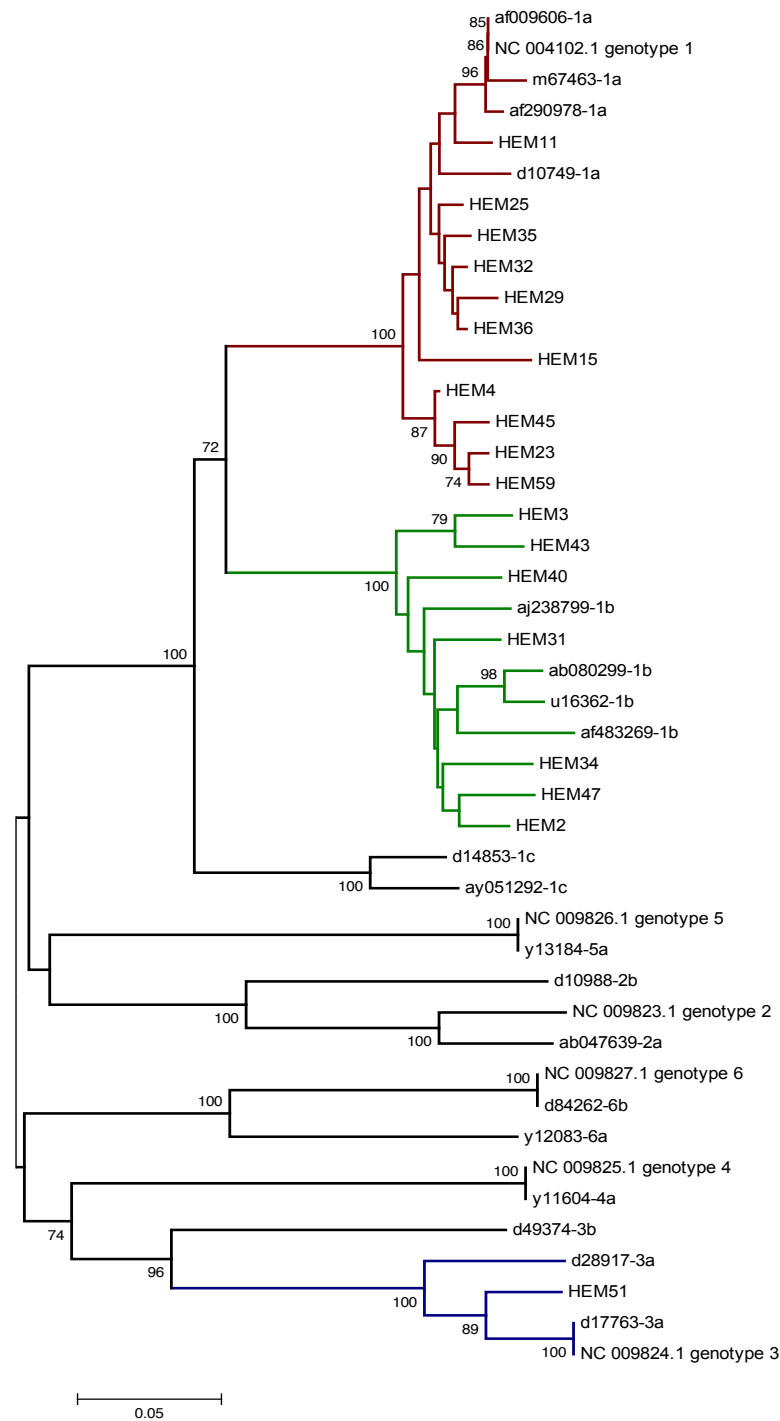


Figura 17: Árvore filogenética obtida através da amplificação da região NS5b mostrando os subtipos do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.

Construída através do método de neighbor joining com aplicação de bootstrap de 500 réplicas e com fator de correção de p-distance. Próximo aos nós estão expostos bootstrap com valores acima de 70. A análise envolveu 44 sequências e foi conduzida no programa MEGA5. A sigla HEM significa os pacientes em tratamento de hemodiálise. As sequências utilizadas como referências foram retiradas do GenBank, de acordo com a numeração de acesso.

Para analisar a relação entre as sequências dos pacientes Renais crônicos (HEM) construiu-se uma árvore filogenética (Figura 18), onde foi possível observar a formação de três grupos monofiléticos que diferenciam os genótipos e subtipos encontrados em 1a, 1b e 3a. Além disso, para confirmar que as sequências analisadas se tratavam de genótipo e subtipos distintos, calculamos a média de distância entre e dentro dos subtipos (Tabela 6). A distância observada do subtipo 3a em relação ao subtipo 1a foi de $0,341 \pm 0,026$ e em relação ao 1b foi de $0,355 \pm 0,027$. Entre os subtipos 1a e 1b foi observado à distância de $0,189 \pm 0,019$. Enquanto que, a distância genética entre as sequências do subtipo 1a foi de $0,043 \pm 0,007$ e do 1b foi de $0,067 \pm 0,009$.

Tabela 6: Média de distância de nucleotídeo para a região NS5B dentro dos subtipos e entre os subtipos.

	1a	1b
1a	$0,043 \pm 0,007^*$	
1b	$0,189 \pm 0,019$	$0,067 \pm 0,009^*$
3a	$0,341 \pm 0,026$	$0,355 \pm 0,027$

Média dentro do subtipo (*) e entre subtipos e \pm desvio padrão da média estimada pelo método de bootstrap com 500 réplicas usando o programa MEGA5.

Também foi possível observar a formação de dois grupos parafiléticos nos subtipos 1a e 1b (evidenciados na árvore filogenética, através de um quadrado tracejado e identificados por números). A distância genética entre os dois grupos formados no subtipo 1a foi de $0,05 \pm 0,01$ e entre as amostras de cada grupo foi de $0,033 \pm 0,006$ (grupo 1) e $0,020 \pm 0,006$ (grupo 2). Em relação ao subtipo 1b a distância entre os grupos foi de $0,079 \pm 0,012$ e entre as amostras de cada grupo foi de $0,043 \pm 0,011$ (grupo 3) e $0,057 \pm 0,009$ (grupo 4).

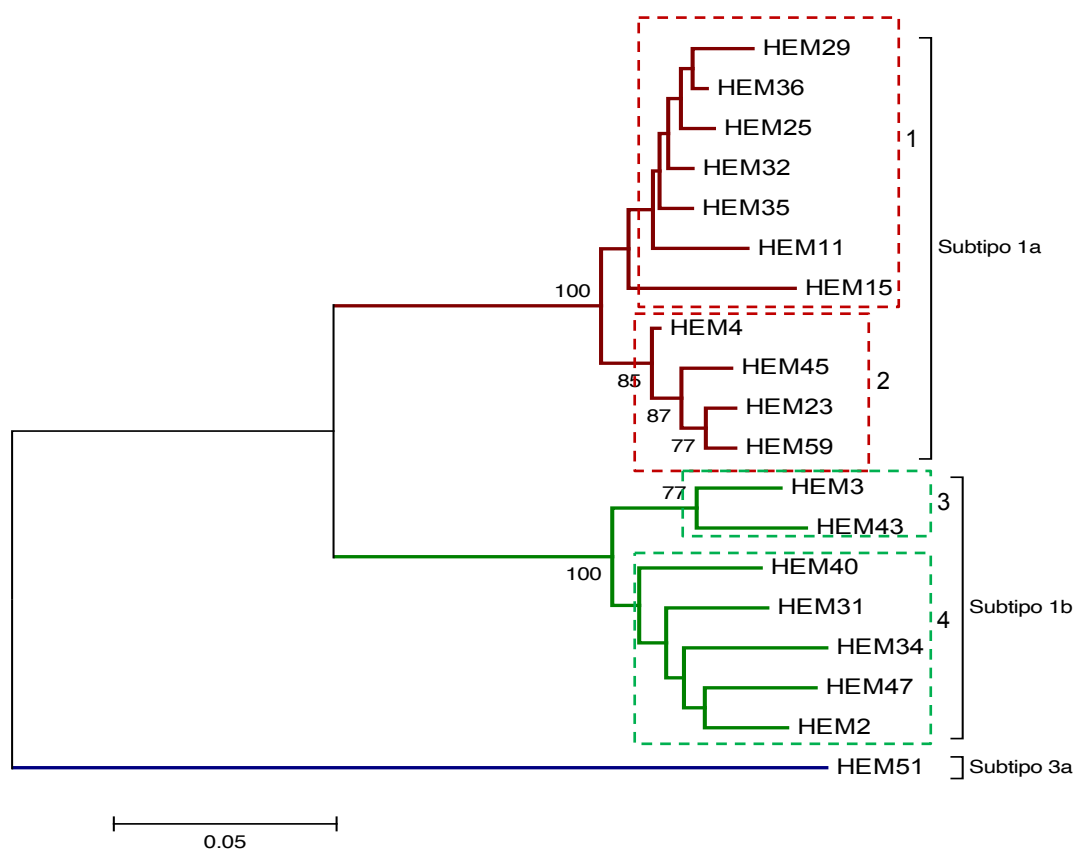


Figura 18: Relação evolutiva dos táxons obtidas através da amplificação da região NS5b.

A história evolutiva foi inferida usando o método de neighbor-joining e foi conduzido o teste de bootstrap (500 réplicas). A distância evolutiva foi calculada usando o método de p-distance. Próximos aos nós estão representados os valores de bootstrap acima de 70. A análise foi conduzida no programa MEGA5.

5.2 Análise das quasispecies do HCV através da amplificação da região E1-HVR1

Para investigar o grau de variabilidade genética do vírus através da formação de quasispecies no grupo de pacientes renais crônicos, empregou-se a técnica de EPLD-RT-PCR (end-point limiting dilution real time – Polymerase chain reaction) com amplificação da região E1-E2 (E1-HVR1), onde foi possível amplificar 17 amostras (n=17/19). A análise das quasispecies revelou muitas variantes (n=283) circulando e uma intra-diversidade no grupo. Obteve-se uma quantidade mínima de 15 clones (15%) e máximo 47 (48%) clones por amostra,

sendo, portanto estes valores esperados para produção de variantes (quasispecies). O número de clones obtidos é limitado pela carga viral presente na amostra, pois quanto maior a carga viral, mais clones são possíveis de serem obtidos durante a distribuição do cDNA.

Com o objetivo de analisar a distribuição dos variantes no grupo dos Renais crônicos construiu-se uma árvore filogenética, revelando que a maioria das amostras formou um grupo distinto com as respectivas quasispecies. Porém observou-se a formação de três grupos mistos (clado), formado pelas quasispecies da amostra HEM25 e HEM32, HEM34 e HEM59 e o outro clado formado pelas amostras HEM45, HEM59, HEM04 e HEM23. Também foi possível observar a presença de dois grupos de quasispecies da amostra HEM59, demonstrando a presença de dois subtipos virais (1a e 1b). A análise estatística de bootstrap com valor maior que 90% foi considerada como forte interação entre os grupos (FIGURA 19).

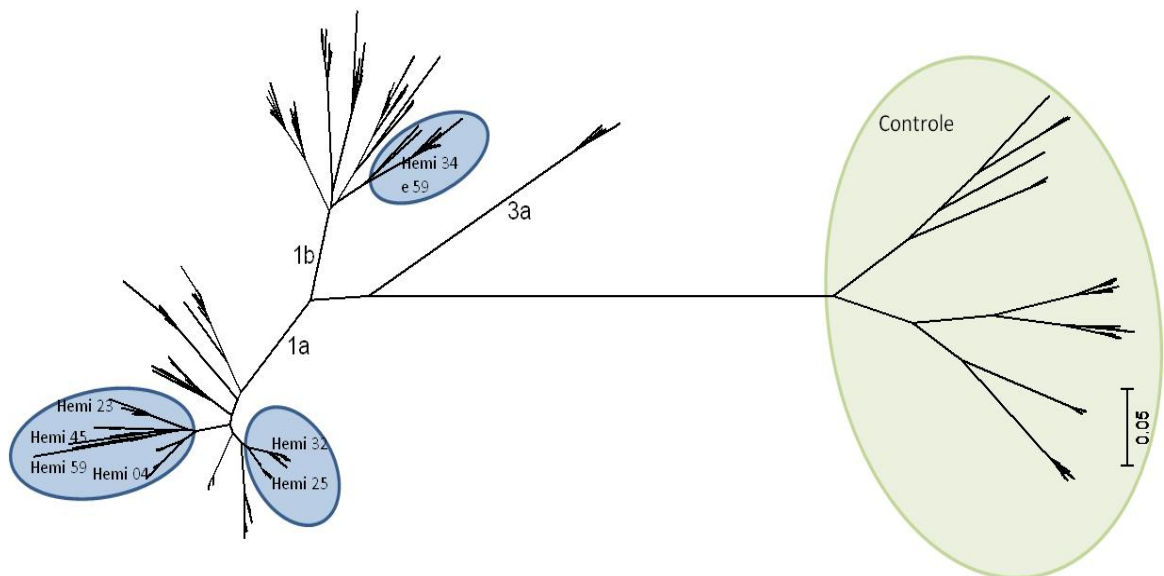


Figura 19: Árvore filogenética obtida através da amplificação da região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise. Construída através do método de Neighbor Joining com aplicação de bootstrap de 500 réplicas. A distância evolutiva foi calculada usando o método p-distance. O grupo controle são os pacientes sem problema renal com HVC positivo. A análise foi conduzida no programa MEGA5.

A Figura 20 representa a análise filogenética dos clados mistos. Através da análise da figura 20a observou-se a formação de quatro grupos sendo um clado monofilético (HEM23) e três clados parafiléticos (HEM04, HEM59 e HEM45), a distância intra-populacional observada entre as sequências do HEM04 foi de 0,078, no HEM23 de 0,011, no HEM45 de 0,141 e no HEM59 de 0,351. Na figura 20b observou-se a formação de dois clados parafiléticos, dos quais amostras HEM59 e HEM34 estão distribuídas de forma mista entre os clados, com distância genética entre as amostras de 0,262 e intra-grupo de 0,141 na amostra HEM34 e 0,326 no HEM59. Também foi observado na figura 20c a formação de dois clados parafiléticos distintos (HEM25 e HEM32) com uma distância genética entre eles de 0,127.

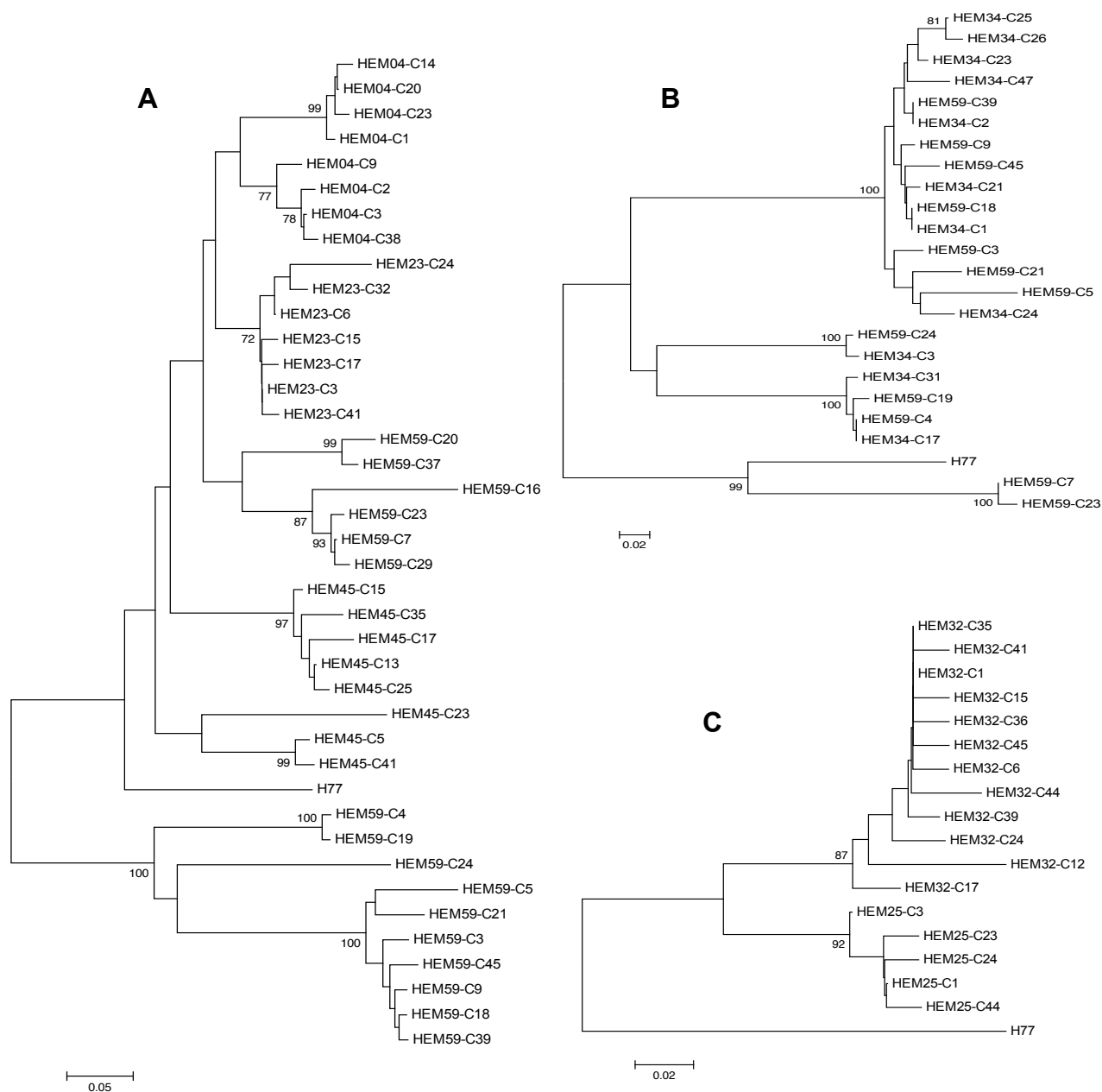


Figura 20: Árvores filogenéticas obtidas através da amplificação da região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise. A) Relação filogenética das amostras Hem59, Hem45, Hem23 e Hem04, B) Relação filogenética das amostras Hem59 e Hem34, C) Relação filogenética das amostras Hem25 e Hem32. Todas as árvores foram Construída através do método de Neighbor Joining com aplicação de bootstrap de 500 réplicas. A distancia evolutiva foi calculada usando o método p-distance. A análise foi conduzida no programa MEGA5.

A circulação contínua de fitas de HCV em um grupo pode conduzir para adaptações de fitas únicas de HCV sobre a ação da pressão de seleção na população. A pressão de seleção pode ser detectada por determinação da relação Dn/Ds (diversidade não-sinônima e sinônima), podendo ser seleção positiva ($Dn/Ds > 1$), seleção negativa ($Dn/Ds < 1$) e seleção neutra ($Dn/Ds = 1$) (QUEIROZ et al., 2010). Análise dos valores Dn/Ds da região E1-HVR1 para cada grupo de quasispecies das amostras mostrou que a evolução dessas variantes de HCV foi direcionada predominantemente por seleção negativa e neutra. As variantes que sofreram seleção negativa ($Dn/Ds < 1$) foram observadas em 8 amostras, seleção neutra ($Dn/Ds = 1$) 9 amostras e 1 amostra apresentou seleção positiva ($Dn/Ds > 1$) (Figura 21).

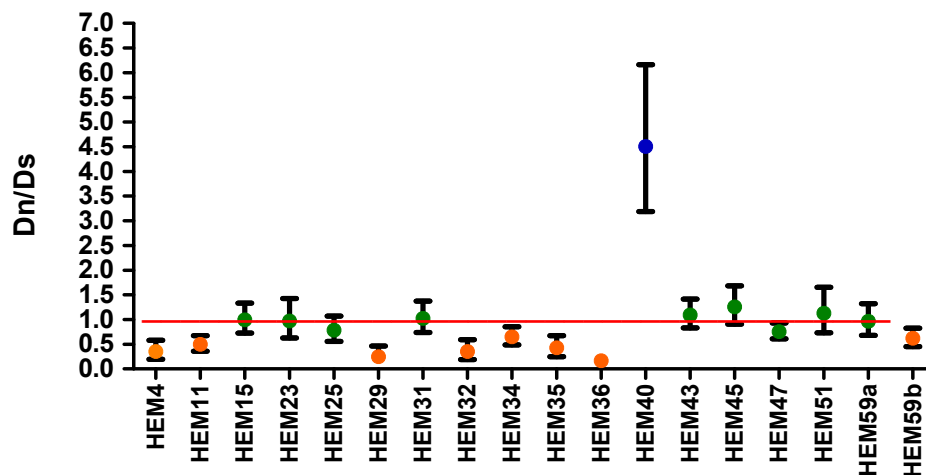


Figura 21: Representação da relação Dn/Ds demonstrando o tipo pressão seletiva observada nas quasispecies encontradas nos pacientes hemodialisados. Os círculos em laranja significam amostras que sofreram pressão negativa, em verde pressão neutra e em azul pressão positiva.

A variabilidade dos aminoácidos da região HVR1 nas quasispecies obtidas de pacientes renais crônicos e grupo controle HCV positivos foi comparada para observar as posições mais conservadas e mais variáveis, como

mostrada na figura 22. Observa-se que os códons 2, 6 e 23 foram 100% conservados nos dois grupos e a posição 7 e 26 foi conservada no grupo controle e parcialmente variável nos Renais crônicos. As posições 3, 14, 17 e 20 apresentaram a maior quantidade de alterações de aminoácidos nos dois grupos. Dos 27 codons analisados o grupo controle apresentou 14 codons com maior número de variação que os renais crônicos.

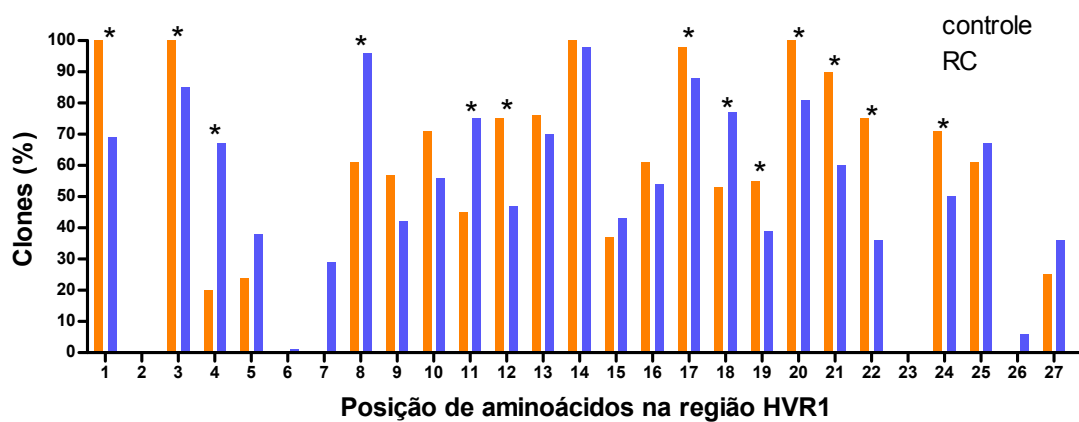


Figura 22: Análise comparativa da distribuição de aminoácidos na região HVR1 do vírus da hepatite C nas quasispecies encontradas em pacientes em tratamento de hemodiálise.

O grupo controle foi formado por pacientes HCV reativos sem tratamento de hemodiálise. Análise das proporções realizadas no programa R. O * significa $p < 0,05$.

A região HVR1 é altamente imunogênica, devido a esta característica realizou-se a análise das características químicas dos 27 aminoácido desta região (Figura 23). Observou-se que as regiões 2, 6 e 23 foram ocupadas exclusivamente por aminoácidos neutros: Treonina (T) e Glicina (G); as regiões 1, 11, 25, 26 e 27 ocupadas por aminoácidos hidrofílicos: Glutamina(Q), asparagina (N), lisina (K), histidina (H), glutamato (E) e arginina (R). As demais posições foram ocupadas por dois ou três tipos de aminoácidos, constituindo posições variáveis.



Figura 23: Análise da distribuição de aminoácidos na região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise.

Os aminoácidos hidrofílicos (KQNHDR) estão representados em azul, os neutros (TSG) em verde e os hidrofóbicos (FIWYLVMP) em vermelho. Para o método de PCA (análise de componentes principais) foi utilizado o programa Weblogo 2.8.2 disponível no site [HTTP://weblogo.berkeley.edu](http://weblogo.berkeley.edu)

Para visualizar a interconexão genética entre as variantes do HCV e demonstrar a frequência de variantes na população foi utilizado o Median Joining network (MJN). A análise dos resultados da árvore filogenética desenhada por network demonstrou o grau de variabilidade (numero de círculos observados) e o quanto ela se repete (tamanho dos círculos) durante o processo de replicação. Demonstrou-se que a amostra de um paciente produziu 7 quasispecies (amostra HEM51 na figura 24) dos 13 clones gerados e que a amostra HEM43 gerou 30 quasispecies dos 38 clones amplificados.

Através desta análise ficou claro a relação das variantes entre dois indivíduos (Hem34 e Hem59) onde se observou a presença de variantes idênticas e muito próximas entre eles.

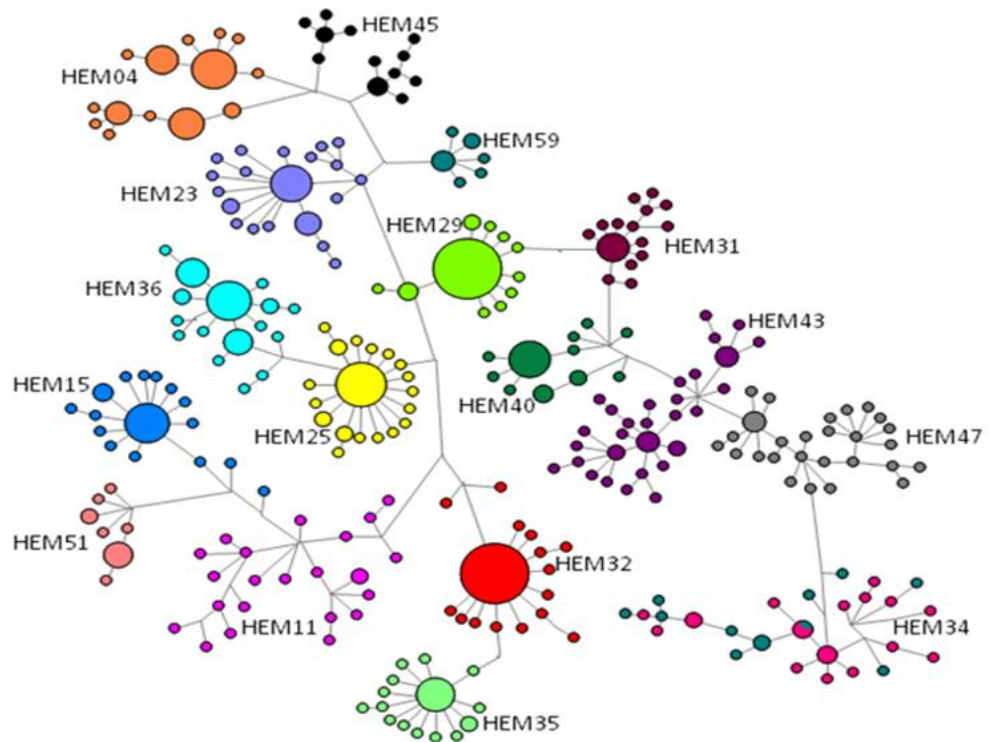


Figura 24: Network das quasispecies dos pacientes renais crônicos em tratamento de hemodialise através da Técnica de EPLD-PCR. Cada círculo indica a presença de uma quasispecies, as cores indicam os pacientes (cada cor representa um paciente) e o tamanho variado indica o número de quasispecies que se repetem no grupo.

A análise da distribuição das quasispecies através da região E1-HVR1 de acordo com o ano de soroconversão demonstrou que o paciente que soroconverteu em 1998 – 8 anos de infecção crônica (amostra HEM11 na figura 25) apresentou 22 quasispecies dos 24 clones obtidos e a amostra do paciente que soroconverteu em 2004 – 2 anos de infecção (amostra HEM25 na figura 25) apresentou 19 quasispecies dos 40 clones obtidos. A análise das variantes de acordo com o tempo de infecção não demonstrou ser um fator relevante para a formação de quasispecies.

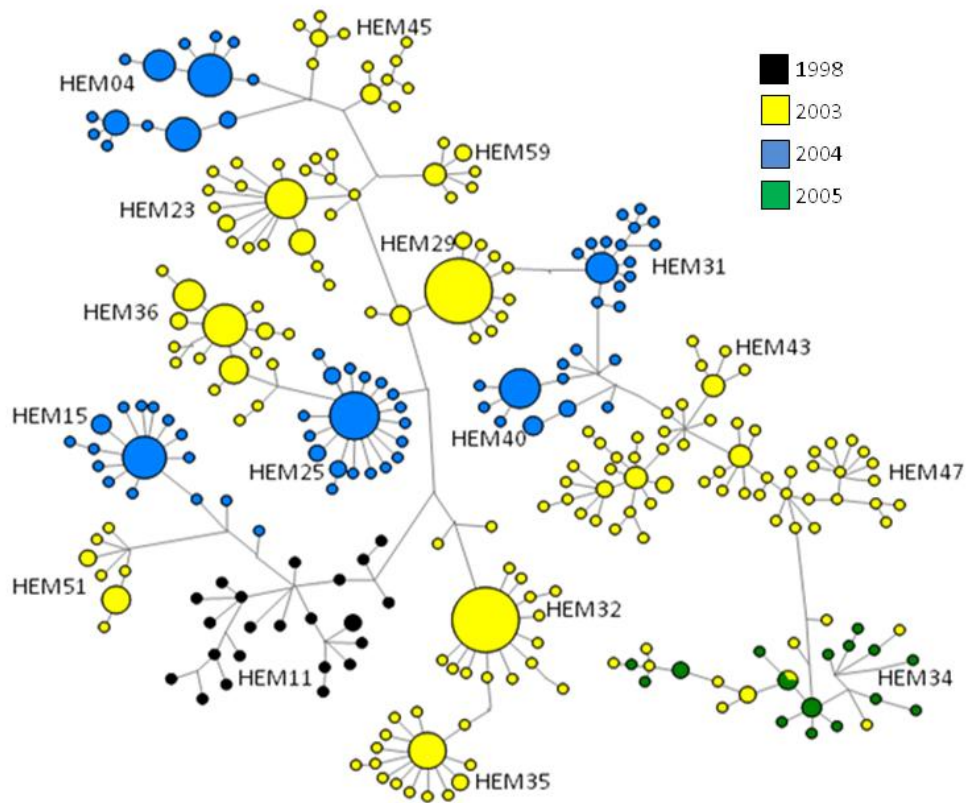


Figura 25: Network das quasispecies distribuídos por ano de soroconversão dos pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise através da Técnica de EPLD-PCR. Cada círculo indica a presença de uma quasispecies e o tamanho variado indica o número de quasispecies que se repetem no grupo.

Durante a análise das quasispecies através da construção da árvore filogenética e do network, duas amostras (HEM39 e HEM34) compartilhavam sequências idênticas ou com alguma semelhança. Para analisar melhor esta relação realizou-se o pirosequenciamento 454 utilizando amostras de dois momentos diferentes, uma coleta em 2006 e outra coletada em 2009. A figura 26a demonstra as quasispecies encontradas na amostra coletada no primeiro momento, e observou-se duas regiões com sequências semelhantes. A figura 26b construída com as quasispecies observadas na amostra coletada em 2009 demonstrou a formação de três grupos distintos não havendo mais o compartilhamento das sequências.

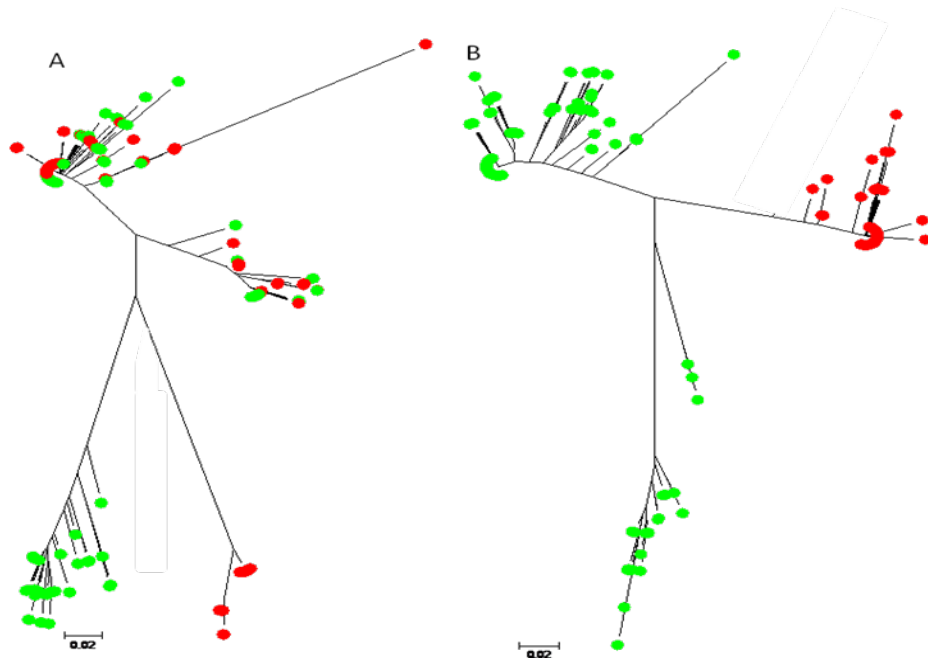


Figura 26: Árvore filogenética obtida através da amplificação da região HVR1 do vírus da hepatite C em pacientes em tratamento de hemodiálise. Foram realizadas duas coletas de amostras: a primeira em 2006 (fig. 26 A) e a segunda em 2009 (fig. 26 B), a técnica para amplificação foi o pirosequenciamento 454. A amostra HEM34 está representada em verde e a HEM59 em vermelho. Todas as árvores foram construídas através do método de Neighbor Joining com aplicação de bootstrap de 500 réplicas. A distancia evolutiva foi calculada usando o método p-distance. A análise foi conduzida no programa MEGA5.

5.3 Resposta imune celular e humoral contra o vírus da hepatite c em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise.

Foram incluídos na análise da resposta imune 5 grupos, sendo denominados de Grupo controle (composto por 19 indivíduos de ambos os sexos, sem problema renal e com sorologia negativa para HIV, HBV, HCV, HTLV, sífilis e Doença de Chagas); Grupo HCV- (19 pacientes de ambos os sexos e em tratamento de hemodiálise com sorologia negativa); Grupo PCR- (10 pacientes de ambos os sexos, em tratamento de hemodiálise com sorologia positiva para HCV e PCR negativo); Grupo Subtipo 1a e 1b (10 e 5 pacientes, respectivamente, em tratamento de hemodiálise com sorologia e PCR positivo para HCV).

5.3.1 Análise do perfil celular

Na figura 27 demonstramos a análise da frequência de populações de linfócitos TCD3⁺/CD4⁺, LTCD3⁺/CD8⁺ e sub-populações de leucócitos ativados. As populações celulares foram identificadas utilizando anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 marcados com fluorocromos distintos (terceira cor, PE e FITC, respectivamente) e anti-CD69 marcado com FITC, as células foram identificadas no sangue periférico dos indivíduos presentes nos grupos.

A Figura 27A mostra que o grupo controle apresenta um percentual de linfócitos TCD4⁺ maior que os grupos dos pacientes hemodialisados. Quando comparamos os grupos através do teste de Kruskal-Wallis encontramos uma diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo de hemodialisados anti-HCV negativo ($p < 0,05$), onde se observou uma diminuição dos LTCD4⁺ nos hemodialisados anti-HCV negativo, entre os demais grupos não houve diferença estatística. Ao analisarmos através do teste de Kruskal-Wallis as médias percentuais de linfócitos TCD8⁺ entre os grupos, observamos que não houve diferença estatística significativa entre os grupos (FIG 27 B). As médias e o desvio padrão estão representados como barras horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está representada na tabela 08.

A média percentual de linfócitos CD69⁺ (FIG 27 C) do grupo controle demonstrou diferença estatística significativa ($P < 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis, quando comparado às médias dos grupos dos hemodialisados anti-HCV negativo, anti-HCV+/PCR negativo e subtipo 1a, e foi observado um valor médio maior nos hemodialisados quando comparados ao grupo controle. A população de monócitos CD69⁺ (FIG 27 D) também demonstrou uma diferença estatística significativa entre o grupo de hemodialisados e o grupo controle, foi observado uma média percentual aumentada no grupo controle. A figura 27E representa o percentual de eosinófilos CD69⁺, ao compararmos os grupos pelo teste de Kruskal-wallis obtivemos um percentual mais alto de eosinófilos ativados no grupo controle quando comparado ao grupo hemodialisado anti-HCV negativo, demonstrando uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$), porém com os

demais grupos não houve diferença significativa. Comparando o percentual de neutrófilos CD69⁺ através do teste Kruskal-wallis observamos um maior percentual de neutrófilos ativados no grupo 1a em relação ao grupo anti-HCV negativo, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (FIG 27 F), entre os demais grupos não foi observada diferença estatística. As médias e o desvio padrão estão representados como barras horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está representada na tabela 08.

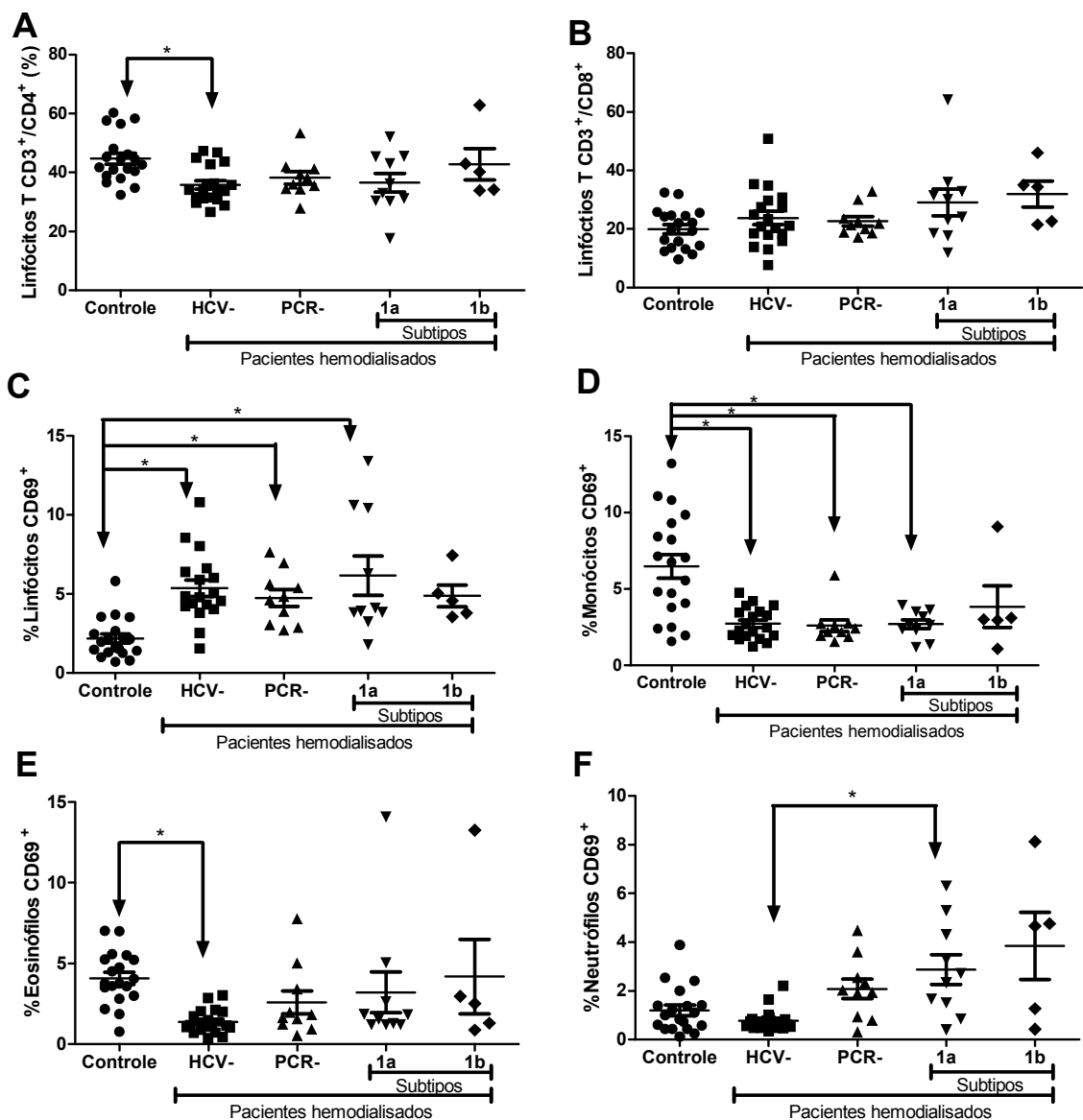


Figura 27: Perfil da resposta imune celular em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise com anti-HCV reativo. Percentual dos linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ (A) e CD3⁺/CD8⁺ (B); Descrição percentual das células ativadas (CD69⁺): Linfócitos (C), Monócitos (D), eosinófilos (E) e Neutrófilos (F). O (*) significa diferença estatística significativa com $p < 0,05$ através do teste de Kruskal Wallis.

5.3.2 Análise do perfil de citocinas

Na figura 28 demonstramos o perfil de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ e IL-12), padrão Th2 (IL-4), pró-inflamatórias (IL-8 e IL-6) e supressora (IL-10). A concentração de citocinas foi avaliada através da técnica imunoenzimática (ELISA) no sangue periférico dos indivíduos presentes nos grupos.

A concentração de IL-4 circulante quando comparada entre os grupos não demonstrou diferença estatística significativa, apesar de o grupo hemodialisado apresentar concentrações mais elevadas que o grupo controle (Fig. 28 A). A figura 28B mostra que os grupos anti-HCV negativo e 1b apresentam níveis de citocinas IL-6 maior que os grupos controle. Quando comparamos os grupos através do teste de Kruskal-Wallis encontramos uma diferença estatística significativa entre os grupos controle com o grupo de hemodialisados anti-HCV negativo e 1b ($p < 0,05$), onde se observou uma diminuição de IL-6 no grupo controle, entre os demais grupos não houve diferença estatística.

Ao analisarmos através do teste de Kruskal-Wallis a concentração média de IFN- γ entre os grupos, observamos que não houve diferença estatística significativa entre eles (FIG 28 C). A concentração média IL-12 (FIG 28 D) do grupo controle demonstrou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) quando comparado as médias dos grupos dos hemodialisados anti-HCV+/PCR-, subtipo 1a e 1b, e se observou um valor médio maior no grupo controle quando comparado ao grupo hemodialisado. As médias e o desvio padrão estão representados como barras horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está representada na tabela 07.

A média da concentração de IL-8 (FIG 28 E) também demonstrou uma diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo anti-HCV negativo, observando uma média percentual aumentada no grupo anti-HCV negativo. Também houve diferença estatística entre o grupo anti-HCV negativo com anti-HCV+/PCR negativo, subtipos 1a e 1b, e o grupo anti-HCV negativo se

manteve com concentração média superior aos demais grupos. A figura 28 F apresenta a concentração de IL-10, ao compararmos os grupos observamos uma concentração média maior no grupo dos hemodialisados quando comparados ao controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o grupo controle e o subtipo 1a. As médias e o desvio padrão estão representados como barras horizontais nos gráficos e a análise estatística descritiva está representada na tabela 08.

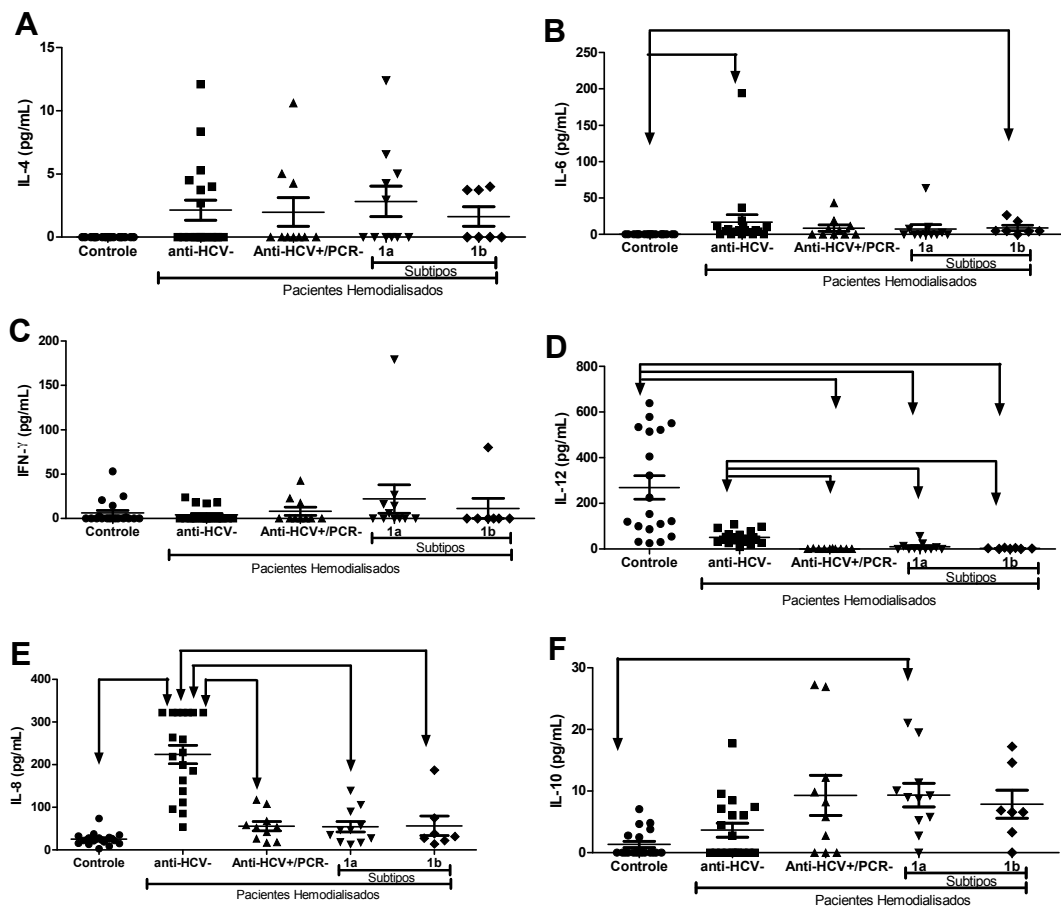


Figura 28: Perfil da resposta imune humoral em pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise com anti-HCV reativo. Concentração das citocinas IL4 (A), IL-6 (B); IFN- γ (C), IL-12 (D), IL-8 (E) e IL-10 (F) em dois grupos populacionais controle (doadores de sangue) e pacientes hemodialisados (sendo dividido em três grupos: com anti-HCV-, anti-HCV+/PCR- e anti-HCV+/PCR+).

Tabela 7: Análise estatística descritiva do percentual de linfócitos T e sub-populações de leucócitos .

VARIÁVEIS	GRUPO														
	Controle			Anti-HCV -			Anti-HCV+ e PCR -			Subtipo 1a			Subtipo 1b		
	Me	DP	Md	Me	DP	Md	Me	DP	Md	Me	DP	Md	Me	DP	Md
LTCD3+/CD4+	44,7	8,1	42,6	35,7	6,0	34,0	38,2	6,6	37,1	36,5	10,1	34,7	42,8	11,8	40,2
LTCD3+/CD8+	19,9	6,7	19,7	23,7	9,8	21,0	22,6	5,0	21,5	29,1	14,5	27,2	31,9	10,1	34,4
Linfócito CD69+	2,16	1,2	1,9	5,3	2,2	4,8	4,7	1,7	4,7	6,1	3,9	4,0	4,8	1,5	4,6
Monócito CD69+	6,48	3,4	6,7	2,7	1,0	2,5	2,6	1,2	2,3	2,7	0,9	2,7	3,8	3,0	3,0
Neutrófilo CD69+	1,19	0,9	1,0	0,7	0,4	0,6	2,1	1,3	1,9	2,8	1,9	3,8	3,8	3,1	4,6
Eosinófilo CD69+	4,08	1,6	3,7	1,3	0,7	1,1	2,6	2,2	1,7	3,2	4,0	1,7	4,2	5,1	2,5

Tabela 8: Análise estatística descritiva da concentração de citocinas no sangue.

VARIÁVEIS	GRUPO														
	Controle			Anti-HCV -			Anti-HCV+ e PCR -			Subtipo 1a			Subtipo 1b		
	Me	DP	Md	Me	DP	Md	Me	DP	Md	Me	DP	Md	Me	DP	Md
IL-4	0,0	0,0	0,0	2,1	3,4	0,0	1,9	3,5	0,0	2,8	4,0	0,0	1,6	2,0	0,0
IL-6	0,0	0,0	0,0	16,9	43,8	5,4	8,7	13,7	2,7	7,6	18,9	0,0	8,9	9,5	4,7
IFN- γ	6,17	13,7	0,0	4,0	8,1	0,0	8,3	14,7	0,0	22,1	52,9	0,0	11,4	30,2	0,0
IL-12	269,7	222,7	153,4	50,7	27,2	45,2	0,5	1,1	0,0	9,4	17,3	0,0	2,3	2,4	2,5
IL-8	24,83	14,7	23,30	223,8	94,5	228,2	55,5	34,3	52,6	54,1	40,8	46,6	56,0	60,8	31,2
IL-10	1,35	2,2	0,0	3,6	4,8	0,0	9,2	10,3	7,0	9,3	6,3	9,0	7,8	6,0	6,6

5.3.3 Análise da correlação de Pearson

Correlação da população de Leucócitos com a diversidade de nucleotídeos da região HVR1.

Ao correlacionarmos a população de linfócitos T CD4⁺ (Fig. 29 A) e neutrófilos CD69⁺ (Fig. 29 E) com a diversidade de nucleotídeos (eixo vertical) pela correlação de Pearson observamos correlação positiva, isto é, quanto maior o número de células mais variações o vírus sofre, promovendo a formação de novas quasispecies

E a correlação entre a população de linfócitos T CD8⁺ (Fig 29B) e de eosinófilos (Fig. 29 F) demonstrou uma correlação negativa, ou seja, quanto maior a população celular menor a diversidade de nucleotídeos.

A população de linfócitos CD69⁺ não apresentou correlação com a diversidade de nucleotídeos (Fig. 29 C). E os monócitos CD69⁺ apresentaram fraca correlação negativa com a diversidade de nucleotídeos, onde se observa que o aumento de monócitos diminui a diversidade (Fig. 29 D).

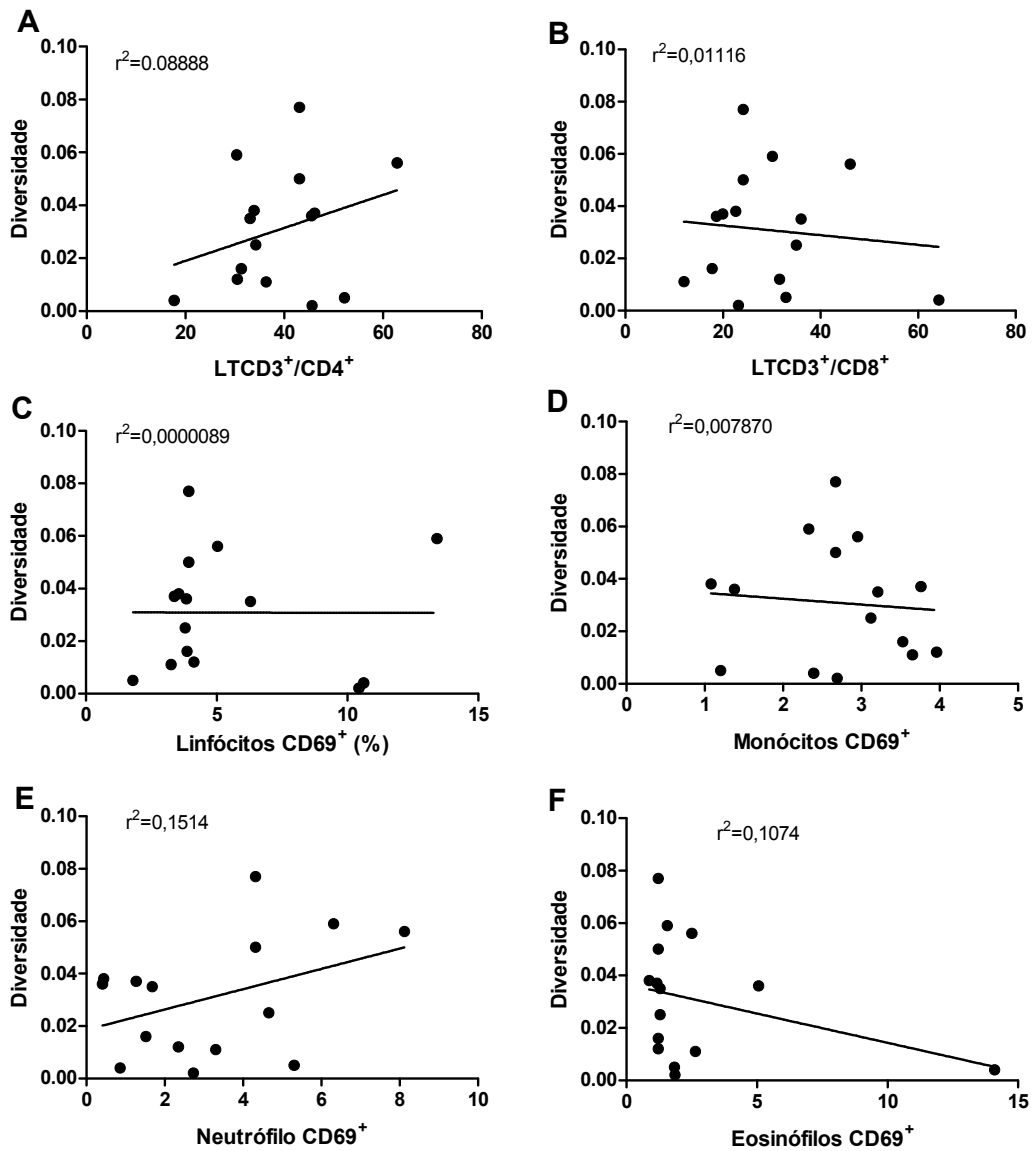


Figura 29: Correlação entre a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 do vírus da hepatite C e o percentual de leucócitos circulantes no sangue periférico dos pacientes em tratamento de hemodiálise. Correlação da diversidade de nucleotídeos com os linfócitos T CD3⁺/CD4⁺ (A) e CD3⁺/CD8⁺ (B); Correlação da diversidade com as células ativadas (CD69⁺): Linfócitos (C), Monócitos (D), Neutrófilos (E) e eosinófilos (F).

5.3.4 Correlação da concentração de citocinas séricas com a diversidade de nucleotídeos da região HVR1.

Ao correlacionarmos a concentração de citocinas IL-10 com a diversidade de nucleotídeos pela correlação de Pearson observamos correlação negativa, isto é, quanto maior a concentração de IL-10 menor a diversidade (Fig. 30A).

Ao realizarmos a correlação de Pearson entre a concentração de IL-4 (Fig. 30B) e de IFN- γ (Fig 30C) com a diversidade de nucleotídeos observamos uma correlação negativa, isto é, quanto maior a concentração da citocina menor a diversidade. A concentração de IL-12, IL-8 e IL-6 não apresentaram correlação com a diversidade de nucleotídeos (Fig. 30 D, 30E e 30F, respectivamente), não mostrando influencia da dinâmica viral.

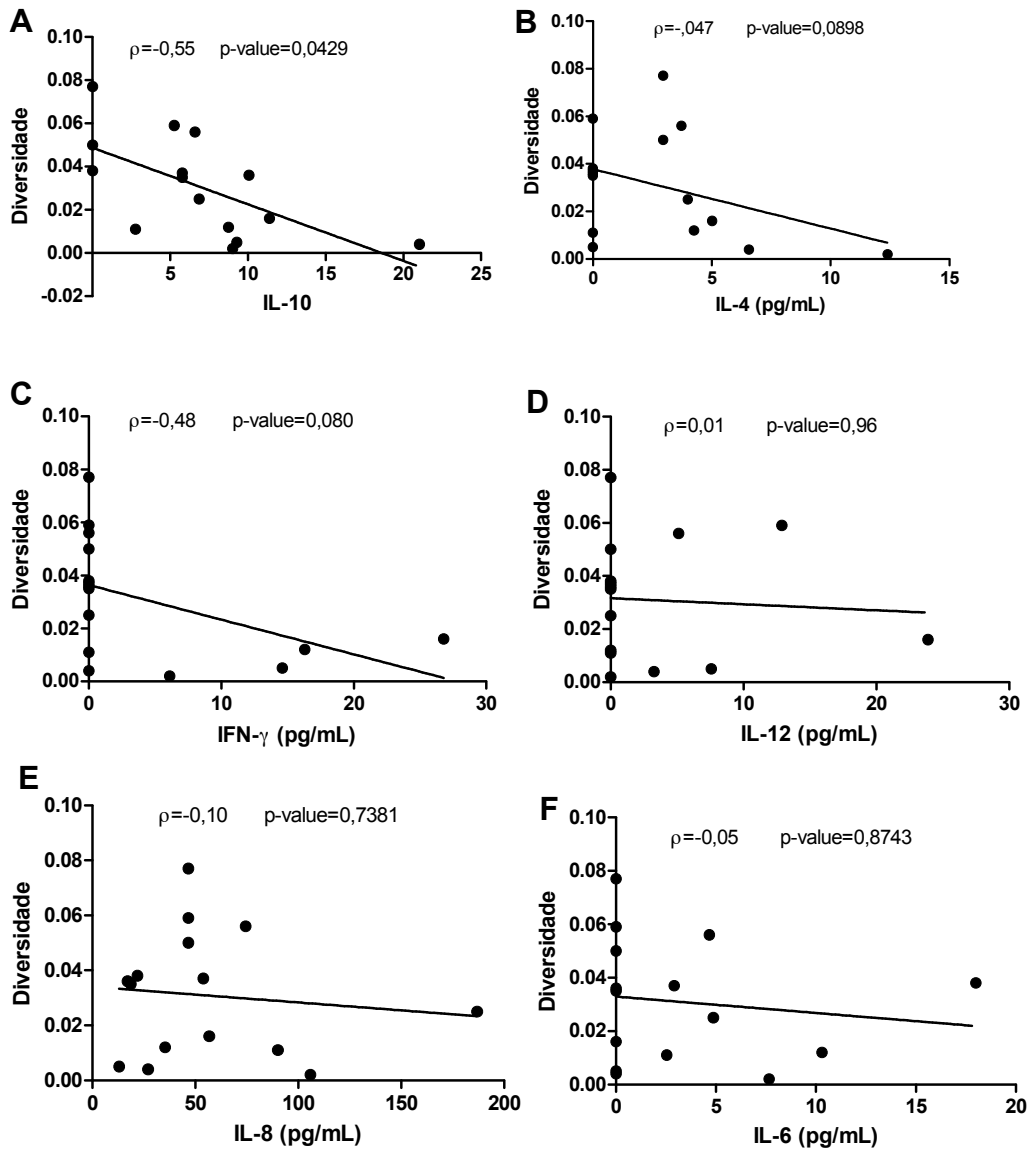


Figura 30: Correlação entre a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 do vírus da hepatite C e a concentração de citocinas circulantes no sangue periférico dos pacientes em tratamento de hemodiálise. Correlação da diversidade de nucleotídeos com as citocinas IL10 (A), IL-4 (B); IFN- γ (C), IL-12 (D), IL-8 (E) e IL-6 (F).

Correlação da população de Linfócitos T com a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 em pacientes HCV positivo e co-infectados (HCV+HBV).

De acordo com literatura, a co-infecção HCV com HBV está associada com reatividade de anticorpos reduzida, sugerindo que a co-infecção possa provocar um aumento do efeito imunossupressor sobre os pacientes (DEVESA et al, 1997), por esta razão decidimos analisar o perfil de resposta imune nestes pacientes e verificar se a co-infecção influenciava na resposta imune e na dinâmica viral.

Ao correlacionarmos a população de linfócitos T CD4⁺ (eixo horizontal da figura) com a diversidade de nucleotídeos (eixo vertical) pela correlação de Pearson foi observada correlação positiva, isto é, quanto maior o número de linfócitos T CD4⁺ mais variações o vírus sofre, promovendo a formação de novas quasispecies (Fig. 31 A) na população de pacientes co-infectados (HCV e HBV linha vermelha) e na população mono-infectada pelo HCV (linha azul) não apresentou correlação.

Para a população de linfócitos T CD8⁺ observou-se uma correlação negativa, ou seja, quanto maior a população de LTCD8⁺ menor a diversidade de nucleotídeos, na população mono-infectada (linha azul) e o inverso foi observado na população co-infectada, da qual se observou uma correlação positiva, demonstrando que quanto maior a população de LTCD8⁺ maior a diversidade viral.

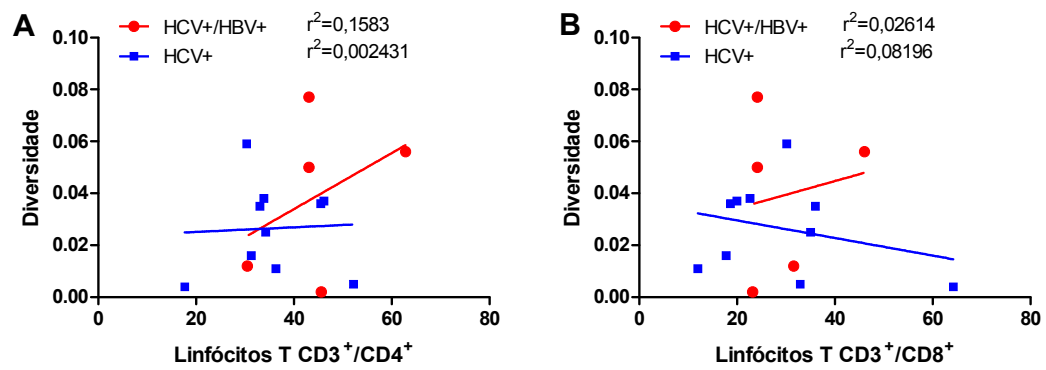


Figura 31: Correlação entre a diversidade de nucleotídeos da região HVR1 do vírus da hepatite C e a população de Linfócitos T circulantes no sangue periférico dos pacientes em tratamento de hemodiálise infectados com HCV (linha azul) e co-infectados com HBV (linha vermelha). Correlação da diversidade de nucleotídeos com os linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B).

6. DISCUSSÃO

6.1 Subtipos do vírus da hepatite c

Os hemodialisados junto com os hemofílicos e usuários de drogas ilícitas são considerados grupos de alto risco para infecção por HCV e outras doenças de transmissão parenteral (HIV, HBV, HTLV etc) (SULOWICZ et al., 2007), por estarem exposto ao contato com sangue e matérias perfurocortantes. Os principais fatores de risco observados entre os pacientes hemodialisados são a duração do tratamento de hemodiálise, o número de transfusão de sangue, falta de separação eficaz de pacientes infectados e o número de procedimentos intravenosos (MAIA et. al., 2009, SULOWICZ et. al., 2007).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a soroprevalência de anti-HCV observada entre os hemodialisados foi de 13,9%, a soroconversão ocorreu em 78,2% dos pacientes durante o tratamento de hemodiálise e 9,3% soroconverteram antes de 2 anos de tratamento, tendo o maior percentual de soroconversão após 8 anos de tratamento (MAIA et al., 2009).

Através dos dados observados no estudo de Maia e colaboradores (2009), observou-se a necessidade de empregar a biologia molecular e a investigação epidemiológica para avaliar os casos de suspeita de transmissão do HCV de um indivíduo para o outro durante o tratamento de hemodiálise.

A região NS5b é uma região bem conservada do genoma viral e é amplamente utilizada para a determinação do genótipo (SIMMONDS et al.; 1993), outras regiões conservadas podem ser utilizadas como 5'UTR (INAMULLAH et al., 2011), CORE e E1 (MURPHY et al., 2007a). A região 5'UTR é a região com maior conservação, limitando portanto, a habilidade de discriminar os genótipos, como por exemplo o genótipo 6 do 1 e subtipos dentro dos genótipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (MURPHY et al., 2007a). A região NS5b é

a região mais utilizada mundialmente para a caracterização dos isolados, por ser uma região não totalmente conservada, e permitir detectar pequenas variações que auxiliam na classificação de novos genótipos e subtipos.

A identificação do genótipo do HCV isolado é de interesse clínico, sendo um marcador de probabilidade da resposta a terapia combinada de interferon e ribavirina e serve como um guia para o tempo de tratamento, sendo também empregado para investigações de infecções, assim como para compreender a epidemiologia e características virais (MURPHY et al., 2007a).

No presente estudo, através da amplificação da região NS5b, foi observado a presença de dois genótipos (1 e 3) entre os hemodialisados, com a presença de três subtipos. O subtipo 1a foi o de maior prevalência, seguido do subtipo 1b e 3a. Estes dados confirmaram estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo, em doadores de sangue e pacientes com hepatite C crônica, mostrando que o genótipo 1 do HCV é o de maior prevalência no Estado do Amazonas, seguido dos genótipos 2 e 3 (TORRES et. al., 2009, ARAÚJO et al; 2011).

Campiotto e colaboradores (2005) realizaram um estudo abrangendo todas as regiões do Brasil e observaram a frequência de 64.9% para o genótipo 1, 4.6% para o genótipo 2, 30.2% para o genótipo 3, 0.2% para o genótipo 4 e 0.1% para o genótipo 5, sendo que os genótipos 4 e 5 foram descritos somente na região sudeste. Assim como descrito por Campiotto et. al., (2005), no presente estudo os genótipos 4, 5 e 6 não foram encontrados na nossa região. Os genótipos 1, 2 e 3 são encontrados em todos os continentes, mas na África e sudeste da Ásia, isolados virais são altamente divergentes e predominam genótipos e subtipos particulares (CAMPIOTTO et al., 2005). O genótipo 4 é mais prevalente na África do Norte e Oriente Médio, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 em Hong Kong (ALI et al., 2010). Estimava-se a presença de 6 genótipos, entretanto Murphy e colaboradores (2007b)

descreveram a presença de um novo genótipo, classificado como 7 e subtipo a, circulando entre a população da África Central.

6.2 Quasispecies do vírus da hepatite C

Com o objetivo de estudarmos mutações do HCV e sua relação com a resposta imune, lançamos mão da amplificação da região E1-HVR1 através da técnica de EPLD-PCR e extensivo sequenciamento dos clones obtidos, a partir destes realizou-se a análise da relação entre as variantes encontradas nos pacientes.

A região HVR1 é usada para discriminar entre isolados relacionados e não relacionados do mesmo subtipo do HCV (SMITH & SIMMONDS, 1997). Esta região sofre mudanças de nucleotídeos o que gera a formação de quasispecies em resposta a pressão imune. Dados da literatura indicam que uma forte resposta humoral direciona a evolução do vírus e pode permitir que o HCV se adapte ao hospedeiro e escape da neutralização dos anticorpos. Estima-se que esta variação esteja relacionada à persistência da infecção, onde a redução da diversidade genética promova o aumento de uma população homogênea e a sua consistência associada à eliminação do vírus (THI et al., 2011).

Devido a esta característica do HCV de promover mutações e escapar do sistema imune e associado ao fato de pacientes renais crônicos serem submetidos a diversas transfusões de sangue ao longo da vida, no presente estudo observou-se a presença de possíveis casos de transmissão nosocomial entre estes pacientes, como mostrado na Figura 19. Detectou-se que no ano de 2003 ocorreram 11 casos de soroconversão, em 2004, 5 casos e em 2005, 1 caso. Entre os 17 indivíduos analisados 10 indivíduos formaram clados individuais sem apresentar relação com os demais e 7 formaram três clados mistos. Os clados mistos demonstraram que estes indivíduos foram infectados com variantes do HCV próximas, mostrando uma possível origem comum (ROSS et al., 2009, GONZÁLES-CANDELAS et al., 2010).

Na análise do clado formado por Hem 45, 59, 23 e 04 a soroconversão ocorreu em 2003, no clado de Hem59 e 34 em 2005 e no clado do Hem25 e 32 em 2004, sugerindo que a infecção tenha ocorrido de a partir de uma mesma origem. Além disso, foi observado uma proximidade maior entre as variantes de hem23 e hem04, sugerindo uma possível transmissão de hem23 para hem04. Além disso, as variantes de hem25 e 32 apresentaram uma relação de proximidade entre si, sugerindo transmissão de Hem32 que soroconverteu em 2003, para hem 35, da qual a soroconversão ocorreu em 2004, ou ainda, ambos poderiam apresentar a mesma origem de infecção.

Também se observou uma forte relação entre as variantes encontradas no clado dos pacientes hem34 e 59, o primeiro iniciou o tratamento em 2005 com sorologia anti-HCV reativa e o segundo já apresentava sorologia reativa desde 2003. A análise das variantes mostrou o compartilhamento de sequências idênticas entre os indivíduos. O compartilhamento das variantes pode ser considerado como uma comprovação de transmissão (FORBI et al.; 2010). Observou-se também a presença de dois subtipos virais (1a e 1b) no paciente Hem59. De acordo com a literatura, por sequenciamento direto somente as espécies predominantes da complexa população de HCV circulante em todos os indivíduos infectados é detectada (ROSS et al; 2002, GONZALES-CANDELAS et al, 2010). Isto explica o fato de se detectar o subtipo 1a através do sequenciamento direto da região NS5b e por clonagem através da região HVR1 detectar-se os subtipos 1a e 1b. Portanto, estes dados demonstram que o sequenciamento direto não reflete com acurácia a complexidade do genótipo da população do HCV no indivíduo infectado.

Por ser uma região que apresenta epítomos para os linfócitos B, a HVR1 é a posição que mais modifica a genética do HCV, e desta forma, substituições de aminoácidos nestes epítomos ocorrem como um mecanismo de escape do reconhecimento por anticorpos anti-HVR1 durante o curso clínico da doença. (KATO et al., 1994).

Os vírus de RNA possuem uma alta e rápida taxa de substituições como resultado da interação de quatro fatores: taxa de mutação basal do genoma viral, tempo de geração do vírus, tamanho populacional e a rápida fixação de mutações não sinônimas em relação às mutações sinônimas. Mutações são as alterações que ocorrem no gene sendo classificadas em sinônimas (Ds), sem alteração da proteína, e não sinônimas (Dn) que alteram a proteína (QUEIROZ et al., 2010).

Considerando-se estes parâmetros uma forma para se analisar a pressão seletiva nas populações é através da razão Dn/Ds, podendo observar uma seleção positiva, negativa ou neutra entre elas. A seleção positiva significa que as variantes apresentam mutações favoráveis e se proliferam, já a seleção negativa significa que as variantes apresentaram mutações deletérias e são eliminadas (QUEIROZ et al., 2010). E na ausência de pressão do sistema imune, seleção neutra, o vírus se mantém estático ou retorna ao consenso do seu genótipo (COX et al., 2005). No nosso estudo observamos que apenas um paciente renal crônico apresentou seleção positiva, significando que novas variantes têm um valor adaptativo maior do que os outros tipos existentes na população viral, sugerindo uma falha do sistema imune em neutralizar e/ou eliminar as partículas virais. Por outro lado, os demais pacientes apresentaram seleção negativa (8 pacientes) e neutra (9 pacientes), sugerindo que o sistema imune conseguiu neutralizar o vírus, impedindo sua replicação e levando a uma provável eliminação viral ou uma provável estabilidade genética do vírus, onde o paciente não produz anticorpos capazes de neutralizar as partículas virais, sendo a resposta imune ineficiente.

Ao compararmos as substituições de aminoácidos na região de HVR1 entre os pacientes renais crônicos e o grupo controle, observamos que o grupo controle apresentou maior percentual de clones com variação de aminoácidos que os renais crônicos. Estes dados sugerem uma pressão da resposta imune contra o vírus. Em estudos anteriores observamos que os pacientes que estão em tratamento de hemodiálise apresentam um estado de imunossupressão ao

compararmos com a população saudável (sem infecção por HCV), porém ao apresentarem infecção por HCV o percentual celular de linfócitos se equivalem ao da população saudável (MAIA et al., 2009). Esta imunossupressão observada parece estar relacionada diretamente com o processo de hemodiálise (WESESLINDTNER et al 2009).

Ao analisarmos o tipo de aminoácido em cada região, observamos quatro regiões conservadas entre as espécies [posição 2 (T), 6 (G), 23 (G) e 26(Q)], sendo este resultado de acordo com o descrito por Kato e colaboradores (1994), sugerindo que estas regiões podem estar relacionadas com a conformação da proteína, para interagir com os receptores celulares ou para manter a interação com o restante da proteína E2 (PENIN et al., 2001).

Kato e colaboradores (1994) relataram que mutações de aminoácidos em regiões do HVR1 podem fazer com que os anticorpos percam a afinidade de ligação com as partículas virais, como por exemplo, a mutação de glutamina(Q) para arginina (R) na posição 8 do HVR1. Kato e colaborador (1994) descreveram dois epítomos constituídos de 11 aminoácidos cada, epítomo 1 da posição 11 a 21 e epítomo 2 da posição 14 a 24, e que podem ocorrer de 1 a 12 substituições em HVR1 durante um ano de infecção. Considerando estes dados da literatura, podemos concluir que se trata de uma região que apresenta muitas substituições de aminoácidos e por isso, de acordo com a pressão imune o vírus escapa da ação dos anticorpos pré-formados.

De acordo com Penin e colaboradores (2001) posições do HVR1 que possuem resíduos hidrofóbicos e neutros podem desempenhar um papel tanto na ligação do HVR1 ao núcleo da glicoproteína E2 quanto na manutenção da conformação do HVR1. Baseado nestes dados, o próximo passo do presente estudo foi analisar as características hidropáticas. Os dados observados demonstraram que 7 regiões eram constituídas somente por uma classe de aminoácido: hidrofóbica, hidrofílica ou neutra e 7 com duas classes. Esses

dados foram semelhantes ao descrito por Penin e colaboradores (2001), sendo que estes autores demonstraram que duas regiões apresentavam variações das três classes de aminoácidos, enquanto que no presente estudo, encontramos doze regiões apresentando estas variações. De acordo com o observado, sugere-se um mecanismo de adaptação desenvolvida pelo vírus ao longo do tempo, para melhor adaptação ao organismo do indivíduo e evasão do sistema imune. Sabe-se que durante a infecção crônica a pressão seletiva favorece a geração contínua de variantes de escape da imunidade humoral e celular (HIROISHI et al.; 2008), permanecendo somente aquelas que sofreram variação para escapar dos anticorpos e Linfócitos T citotóxicos.

Como demonstrado na figura 26, após 4 anos de infecção observou-se uma alteração na distribuição das variantes, onde foram eliminadas as variantes que sofreram seleção negativa e permaneceram as mais resistentes. Em pacientes com Hepatite C Crônica, a seleção negativa favorece mudanças sinônimas e restringe o processo de diversificação, mantendo a população mais homogênea (FIGLEROWICZ et al.; 2010), e assim, contribuindo para a ação dos anticorpos e linfócitos T citotóxicos, que atuam na eliminação das variantes. Estudos com múltiplas infecções demonstram que frequentemente somente uma fita de HCV domina após exposição a múltiplas fitas, e que infecções mistas com diferentes fitas podem ocorrer temporariamente (NAINAN et al.; 2006). Estudos de transmissão seletiva relatam que durante uma transmissão as variantes em maior quantidade são neutralizadas parcialmente ou completamente pelos anticorpos e as variantes em menor número tem uma replicação seletiva porque não são inibidas pelos anticorpos neutralizantes (CODY et al., 2002, NAINAN et al., 2006).

A análise através do network demonstrou a interconexão genética e a frequência de variantes ao mesmo tempo. A análise revelou uma complexa transmissão do HCV, que pode ser relacionada com infecções frequentes com mais de uma variante ou uma extensiva superinfecção com diferentes variantes (FORBI et al.; 2010). Neste estudo observou-se o compartilhamento de

variantes entre hem34 e hem59, que de acordo com a literatura pode ser considerado como prova de transmissão (ROSS et al., 2009).

É difícil identificar o mecanismo exato de transmissão nosocomial do HCV. Entretanto, sabe-se que o sangue e seus principais componentes (plasma, soro etc) são as principais fontes de infecção (SULOWICZ et al.; 2007). A inoculação de pequeno volume de sangue pode ser suficiente para causar infecção pelo HCV (ROSS et al.; 2009). Com isto, todas as manipulações parenterais e todos os procedimentos com potencial de exposição a sangue contaminado impõem um risco de infecção nosocomial que pode ser exacerbada por falta de técnicas assépticas (ALTER et al.; 2008, ROSS et al.; 2009).

A literatura descreve algumas vias de infecção, como: mãos infectadas dos profissionais de saúde, máquinas de hemodiálise, outros equipamentos médicos (esfingomanômetro), objetos circulando entre os pacientes como por ex. gaze, ataduras, garrafas de desinfecção, bandejas, etc. (SULOWICZ et al.; 2007). A simples medida de separar os pacientes em turnos e em grupos poderia reduzir o índice de transmissão, porém observa-se que esta medida ainda não foi capaz de reduzir, precisando ser complementada pelas práticas seguras de manipulação. Baseados no nosso estudo e na literatura, concluímos que a transmissão nosocomial ocorre em diversos setores médicos como, hemodiálise, colonoscopia, procedimentos cirúrgicos, cuidados médicos, intradomiciliar entre outros, porém não se determinando o mecanismo exato de transmissão.

6.3 Resposta imune celular e humoral contra o vírus da hepatite C

A infecção pelo HCV na fase inicial pode apresentar dois tipos de resposta imune; uma forte resposta LTCD4⁺ Th1 que induzirá a eliminação do vírus, e ao contrário um padrão de resposta Th2, que poderia levar a infecção

crônica (CHEIKHOUHOU et al., 2011). Isto nos sugere que uma eficiente resposta imune celular é o mecanismo principal para o controle do HCV, enquanto um defeito nesta resposta leva a cronicidade, ocasionando um aumento no número de novas variantes (quasispecies) e aumento da heterogenicidade (KMIECIAK et al., 2005).

A análise da população de LTCD4⁺ demonstrou um percentual equivalente entre os pacientes renais crônicos HCV⁺ e o grupo controle, porém observamos um percentual menor destas células nos renais crônicos HCV⁻ quando comparados ao grupo controle, sugerindo, como citado anteriormente, um estado de imunossupressão, sem infecção pelo HCV, e quando infectados pelo HCV o percentual destas células é restaurado, assemelhando-se ao da população saudável. O aumento destas células foi concomitante com o aumento da concentração de IL-4 e IL-10. Estes dados demonstram que a infecção pelo HCV, induziu a polarização da resposta imune para o perfil Th2 com supressão da resposta Th1. A supressão da resposta Th1 foi confirmada pela baixa concentração de IFN- γ nesta população de pacientes. Assim como para o IFN- γ , também não foi observado aumento da concentração da IL-12. A baixa de IL-12, com o aumento da IL-4, sugere mais uma vez um mecanismo de escape desenvolvido pelo HCV para se evadir do sistema imune e permanecer no organismo humano. Dados da literatura demonstram que as proteínas E2/NS1 inibem a ação do IFN- γ nas células alvo e que a NS4 suprime a produção de IL-12 por células dendríticas (HIROISHI et al., 2008).

Por outro lado, foi observado aumento de LTCD8⁺, nos pacientes renais crônicos infectados pelo HCV quando comparados ao controle e aos demais grupos de hemodialisados estudados. Este aumento de LTCD8⁺ sugere uma resposta imune protetora por efeito citotóxico (MAIA et al., 2009), o que exerceria forte pressão sobre o vírus, no entanto devido as baixas concentrações de IFN- γ e IL-12, esta resposta parece não ser sustentada e eficiente para a eliminação do HCV. A literatura descreve que as células T citotóxicas desempenham um papel fundamental na eliminação dos hepatócitos infectados pelo HCV, podendo representar um fator determinante

da evolução da doença e na patogênese da doença, sendo a especificidade de $LTCD4^+$ e $CD8^+$ correlacionados com a atividade da doença (ALMEIDA et al., 2011).

Para comprovarmos a ação do sistema imune sobre a diversidade do HCV, analisamos a correlação entre os linfócitos $TCD4^+$, $TCD8^+$ e o número de mutações geradas nas quasispecies. Os dados demonstraram que houve correlação positiva de $LTCD4^+$ com a diversidade do HCV. Este dado sugeriu que devido à ação destas células o vírus produz novas variantes para evadir da resposta imune. Esta correlação não foi observada em relação aos $LTCD8^+$, demonstrando que as mutações induzidas pelo sistema imune ocorrem diretamente pelos $LTCD4^+$ e poderiam estar relacionadas à produção de diferentes citocinas, Th2 ou antiinflamatórias, como citado anteriormente.

As mutações em regiões imunogênicas resultam na ignorância de LTC e anticorpos, induzindo a tolerância da infecção por estas células (HIROISHI et al., 2008). Quando correlacionamos o aumento de IL-10 com a diversidade, foi observado que esta tendeu a diminuir, sendo um achado esperado, por se tratar de uma citocina supressora do sistema imune. Por outro lado, o aumento de IL-4 foi correlacionado com a diminuição da diversidade, fortalecendo nossa hipótese de que o HCV, induz mecanismos de escape para se proteger da ação imune. Segundo Torre e colaboradores (2004) os níveis séricos de IL-10 e de outras citocinas de padrão Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) encontram-se bastante elevados em pacientes com infecção crônica pelo HCV não tratados quando comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo que o desvio do perfil imunológico para um padrão Th2 poderia comprometer a resposta imune do hospedeiro, resultando na infecção crônica pelo HCV.

Diversos mecanismos imunes são descritos contra a infecção pelo HCV. Cheikhrouhou e colaboradores (2011) descreveram que um dos mecanismos de ação dos $LTCD8^+$ é induzir a apoptose de hepatócitos através do sistema

Fas, contribuindo para a eliminação de células infectadas. Na infecção pelo HCV, a expressão de Fas em hepatócitos é regulada de acordo com a gravidade da inflamação do fígado. Quando células T citotóxicas HCV específicas migram para os hepatócitos e reconhecem o antígeno viral através do receptor de células T, tornam-se ativadas e expressam ligante Fas que pode converter o sinal de morte por apoptose dos hepatócitos. Acredita-se que o HCV seja um vírus não citopático, e a resposta imune está envolvida no dano hepático e fibrose que ocorre durante a infecção crônica (MORISHIMA et al., 2006). Entretanto o vírus, através da proteína do core, previne a apoptose dos hepatócitos infectados (HIROISHI et al, 2008).

Dados da literatura relatam que a co-infecção do HCV com HBV está associada com reatividade de anticorpos reduzida, sugerindo que a co-infecção pode provocar um aumento do efeito imunossupressor sobre os pacientes (DEVESA et al., 1997). Estes dados estão de acordo com a observação encontrada em nosso estudo, que demonstrou aumento de LTCD4⁺ concomitante com o aumento da diversidade nos pacientes co-infectados, diferente do observado nos pacientes monoinfectados. Esta correlação também foi observada quanto aos LTCD8⁺, mostrando que a diversidade aumenta de acordo com o aumento de LTCD8⁺ nestes pacientes, ao contrário do observado nos monoinfectados. Estes dados sugerem que a infecção pelo HBV influencia na evolução da infecção pelo HCV.

Desta forma podemos concluir que o entendimento da variabilidade viral e da resposta imune, associada a maior compreensão dos determinantes da eliminação viral e dos elementos necessários para o desenvolvimento de imunidade, assim como o maior correlações imunológicas poderá favorecer a busca de novas estratégias imunoterapêuticas eficazes contra o Vírus da hepatite C.

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

- A análise filogenética da região NS5b do HCV confirmou a prevalência do genótipo 1 subtipo a e b, seguido do genótipo 3 subtipo a, entre os pacientes infectados pelo HCV;
- A caracterização das quasispecies do HCV através da região HVR1 nos pacientes renais crônicos demonstrou um grande número de quasispecies circulando entre os pacientes, significando uma ampla diversidade viral.
- Através das quasispecies detectamos a presença de transmissão nosocomial confirmada entre dois indivíduos e outros casos sugestivos desta transmissão durante o tempo de tratamento de hemodiálise.
- Os dados demonstraram que a pressão imune, com predomínio de LTCD4⁺ e padrão Th2 em pacientes RC infectados pelo HCV induz maior diversidade do vírus, gerando um mecanismo de escape.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A., AHMED, H., IDREES, M. Molecular epidemiology of Hepatitis C virus genotypes in Khyber Pakhtoonkhaw of Pakistan. **Virology Journal**, v.7, p.203, 2010.

ALMEIDA C. M. O. et al. Immunological Virological Peripheral Blood Biomarkers and Distinct Patterns of Sleeping Quality in Chronic Hepatitis C Patients. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.73, p. 486–495, 2011.

ALTER MJ. Healthcare should not be a vehicle for transmission of hepatitis C virus. **J Hepatol**. V.48, p.2–4, 2008.

ALTER, H.J. et al. Clinical outcome and risk factors associated with hepatitis C in the United States. **Hepatology**, v. 10, p. 581, 1989.

ALTER, MJ. et al. The prevalence of hepatitis c virus infection in the united states, 1988 through 1994. **The New England Journal of Medicine**. v. 341, n. 8, p. 556-562, 1999.

ARAUJO, A.R. et al. Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: genótipos no Estado do Amazonas, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v.44, n.5, p. 638-640, 2011.

ARAUJO, A.R. et al. Resposta virológica sustentada em pacientes com co-infecção pelos genótipos 1 e 2 do vírus da hepatite C, com apenas nove semanas de terapêutica antiviral: relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. vol.43, n.5, p. 605-607, 2010.

BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Mol. Biol. Evol**. v.16, n.1, p.37–48, 1999.

BARRET, S. et al. Intrahepatic hepatitis C viral RNA status of serum polymerase chain reaction-negative individuals with histological changes on liver biopsy. **Hepatology**, v. 33, n. 6, p. 1496-1502, 2001.

BARROS, M T; ROMÃO Jr, J.E. Resposta Imunológica na Uremia. In: CRUZ, JENNER. **Atualidades em Nefrologia**. São Paulo: Sarvier, v.4, cap 30, p. 230-240, 1996.

BRANDÃO, A.B.M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Rev Panam Salud Publica**. v.9, n.3, p. 161-168, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais**. n. 1, Brasília-2010.

BUSEK, S. U. et al. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 775-778, 2002.

CALLENS, N; et al. 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, 2005.

CAMPIOTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz. J. of Med Biol. Res.** v. 38, p.41-49, 2005.

CARMO, R. A. et al. Hepatitis C virus infection among Brazilian hemophiliacs: a virological, clinical and epidemiological study. **Braz. J. Med Biol. Res.** v. 35, n. 5 p. 589-598, 2002.

CARNEIRO M. A. S. et al. Hepatitis C Prevalence and Risk Factors in Hemodialysis Patients in Central Brazil: a Survey by Polymerase Chain Reaction and Serological Methods. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 96, n. 6, p. 765-769, 2001.

CARROZZO, M. et al. Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa. **J Hepatol**. v.37, p.364-369, 2002

CHAN, S.W. et al. Analysis of a new hepatitis C virus and its phylogenetic relationship to existing variants. **J. Gen. Virol.** v. 73, p. 1131-1141, 1992.

CHAPLIN, D.D.. Overview of the Immune Response. **J Allergy Clin Immunol**. v. 125, n.2 Suppl 2: S3–23. 41 páginas, 2010.

CHAYAMA, K. & HAYES, C.N. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v.26, Suppl. 1, p. 83–95, 2011.

CHEIKHROUHOU, L.K. Cytokine and apoptosis gene polymorphisms influence the outcome of hepatitis C virus infection. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** v. 10, p. 280-288, 2011.

CHEN, Z. et al. Hepatitis C Virus Protects Human B Lymphocytes from Fas-Mediated Apoptosis via E2-CD81 Engagement. **PLoS ONE**. v.6, n. 4, e18933, 10 páginas, 2011.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. v.244, p. 359-362, 1989.

CODY, S.H. et al. Hepatitis C virus transmission from an anesthesiologist to a patient. **Arch. Intern. Med.** v.162, p.345-350, 2002.

COX, A.L., et al. Comprehensive Analyses of CD8+ T Cell Responses During Longitudinal Study of Acute Human Hepatitis C. **Hepatology**. v. 42, n.01, 2005.

CUEVAS, J.M. et al. Combined Therapy of Interferon Plus Ribavirin Promotes Multiple Adaptive Solutions in Hepatitis C Virus. **Journal of Medical Virology**. v. 81, p.650–656, 2009.

DAICHO, Y, et al. Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients. **Nephron**. v.83, n.3, p.237-245, 1999.

DEEPAK, S.A. et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. **Current Genomics**. v.8, p. 234-251, 2007.

DESSOUKI O. et al. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 393, p.331–337, 2010.

DEVESA M. et al. Reduced Antibody Reactivity to Hepatitis C Virus Antigens in Hemodialysis Patients Coinfected with Hepatitis B Virus. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**. v. 4, n. 6, p. 639–642,1997.

DIEPOLDER, H. M., et al. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. **Lancet**. v. 346, n.14, p.1006-1007, 1995.

DROEGE, M & HILL, B. The genome sequencer FLX™ system – Longer reads. More applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. **Journal of biotechnology**. v. 136, p. 3-10, 2008.

DUARTE, C A B. Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em tempo-real [Dissertação]. Curitiba: Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, **Universidade Federal do Paraná**, 2006, 58p.

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World J Gastroenterol**. v.13, n. 17, p. 2406-2415, 2007.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**. v.32, n.5, p.1792-1797, 2004.

EGGER D, WOLK B, GOSERT R, BIANCHI L. Expression of hepatitis c virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. **J virol**. v. 76, n. 12, p. 5974-5984, 2002.

ENOMOTO, N.; SAKUMA I, ASAHINA Y, KUROSAKI M. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. **N england J Med**. v. 334, n. 2, p.77-81, 1996.

ENOMOTO, N; TAKADA, A; NAKAO, T; DATE, T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. **Biochemical and Biophysical research communications**. v. 170, n. 3, p. 1021-1025, 1990.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G. and SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**. v. 1, p. 47-50, 2005.

FARCI, P. et al. The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. **Science**. v. 288, p. 339-344, 2000.

FIGLEROWICZ, M. et al. Hepatitis C virus quasispecies in chronically children subjected to interferon-ribavirin therapy. **Arch. Virol**. v.155, p. 1977-1987, 2010.

FORBI, J.C. et al. Epidemic History and Evolutionary Dynamics of Hepatitis B Virus Infection in Two Remote Communities in Rural Nigeria. **PLoS ONE**. v. 5, n. 7, e11615, 14 páginas, 2010.

FORTON, D.M.; et al. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain,liver ,and serum variants. **J Virol**. v.78, n.10, p.5170-5183, 2004.

GASPARIC, MB et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Anal Bioanal Chem**. v. 396, p. 2023–2029, 2010.

GIACCHINO, F. et al. The immunological state in chronic renal insufficiency. **Int J Artif Organs**. v.5, n.4, p. 237-42, 1982.

GOMES M. et al. Prevalência da soropositividade do anti-HCV em pacientes dialisados. **Rev Saúde Pública**. v. 40, n. 5. p. 931-934, 2006.

GONÇALES Jr, F. L, et al. Hepatitis C virus in monozygotic twins. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. v. 42, n. 3, p. 163-165, 2000.

GONÇALES, N.S.L. et al. Diagnosis of hepatitis C vírus in Brazilian blood donors using a reverse transcriptase nested polymerase chain reaction: comparison with enzyme immunoassay and recombinant protein immunoblot assay. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 42, n. 5, p. 263-67, 2000.

GONZÁLES-CANDELAS, F. et al. Patient-to-patient transmission of Hepatitis C virus (HCV) during colonoscopy diagnosis. **Virol journal**. v. 7, p. 217, 2010.

GOUVEIA, E. C. et al. Identificação de ponto de corte no nível sérico da alanina aminotransferase para rastreamento da hepatite C em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 37, p. 18-21, 2004.

HAHN, J. A. et al. Hepatitis C virus infection and needle exchange use among young injection drug users in San Francisco. **Hepatology**, v. 34, n.1, p. 180-187, 2001.

HAN, J.H. et al. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly (A) tails at the 3' end. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 88, p. 1711-15, 1991.

HIGUCHI, R. FOCKLER, C, DOLLINGER, G e WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**. v.11, p. 1026-1030, 1993.

HIROISHI, K. et al. Immune Response of Cytotoxic T Lymphocytes and Possibility of Vaccine Development for Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. ID. 263810, 10 páginas, 2010.

HIROISHI, K., ITO, T. & IMAWARI, M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 23, p. 1473–1482, 2008.

HOUGHTON, M. et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: Implications for diagnosis, development and control of viral disease. **Hepatology**, v. 14, n. 2, p. 381-388, 1991.

IBGE- Instituto brasileiro de geografia e estatística. Censo 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1766>. Acesso em: 27 de novembro de 2011.

INAMULLAH et al. Hepatitis C virus genotypes circulating in district Swat of Khyber Pakhtoonkhaw, Pakistan. **Virology Journal**. v. 8, n. 16, 5 páginas, 2011.

ISHII, T. et al. Evolution in the hypervariable region of the hepatitis C virus in two infants infected by mother-to-infant transmission. **Pediatrics International**. v. 47, p. 278–285, 2005.

JAISWAL, S. P. B. et al. Prevalence of hepatitis viruses among multi-transfused homogenous thalassaemia patients. **Hepatol Res.**, v. 19, n. 3, p. 247-253, 2001.

KAPLAN D E. et al. Discordant Role of CD4 T-Cell Response Relative to Neutralizing Antibody and CD8 T-Cell Responses in Acute Hepatitis C. **Gastroenterology**. v. 132, n. 2, p. 654–666, 2007.

KATO, N. et al. Genetic Drift in Hypervariable Region 1 of the Viral Genome in Persistent Hepatitis C Virus Infection. **Journal of virology**. v. 68, n. 8, p. 4776-4784, 1994.

KATO, T. et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. **J. Med. Virol.** v. 64, p. 334–339, 2001.

KAUL H. et al. Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T-cell activation in patients with end-stage renal disease. **Am J Kidney Dis**. v. 35, n. 4, p. 611-6, 2000.

KHALIQ, S. JAHAN, S. & PERVAIZ, S. Sequence variability of HCV Core region: Important predictors of HCV induced pathogenesis and viral production Infection. **Genetics and Evolution**. v. 11, n. 3, p. 543-556, 2011.

KMIECIAK, D; MIGDALSKI, P; JUSZCZYK, J; JAGODZIŃSKI, PP, TRZECIAK WH. Identification of a hepatitis C virus mutant lacking the hypervariable region 1 in a chronically infected patient non-responding to PEG-interferon- α /ribavirin therapy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 28, p. 211–213, 2009.

KRISHNADAS, D.K. et al. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. **International Immunology**. v. 22, n. 6, p. 491–502, 2010.

KUBISTA M et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 95–125, 2006.

KUO, G. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A, non B hepatitis. **Science**. v. 244, p. 362-364, 1989.

LAMPE, E.; ESPIRITO-SANTO, M.P.; MARTINS, R.M.B.; BELLO, G. Epidemic history of hepatitis C virus in Brazil. **Infect. Genet and Evol**. v.10, p.886-895, 2010.

LEE,H; SHIN, H; WIMMER, E; PAUL, AV. *cis*-Acting RNA Signals in the NS5B C-Terminal Coding Sequence of the Hepatitis C Virus Genome. **Journal of virology**. v. 78, n. 20, p. 10865–10877, 2004.

LEVI, J. E. et al. Three cases of infection with hepatitis virus genotype 5 among Brazilian hepatitis patients. **J. Clin. Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2645-2647, 2002.

LOHMANN V, ROOS A, KORNER F. Biochemical and structural analysis of the NS5B RNA dependent RNA-polymerase of the hepatitis C virus. **J virol hepat**. v.7, n.3, p.167-174, 1997.

LOPES, C.L.R. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. **Rev Saúde Pública**. v. 43, Supl. 1, 7 páginas, 2009.

MAIA, LPV et al. Hepatitis C virus screening and clinical monitoring of biomarkers in patients undergoing hemodialysis. **J. Med. Virol**. v. 81, p.1220-1231, 2009.

MALTA, FM. Sequenciamento da regio NS5a do genoma do virus da hepatite C, genotipo 3, de pacientes brasileiros com infecção crônica (Dissertação). **Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo** – mestrado em ciências. 118 páginas, 2006.

MARTINS, T., NARCISO-SCHIAVON, J.L. & SCHIAVON, L.L. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Rev Assoc Med Bras**. v. 57, n. 1, p.105-110, 2011.

MEDEIROS, M. T. G. de et al. Prevalência e fatores associados à hepatite C em pacientes de hemodiálise. **Rev. Saúde Pública.** v. 38, n. 2, p.187-193, 2004.

MENDES-CORRÊA M C, BARONE A A, GUASTINI C. Hepatitis c virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. **Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo.** v.43, n.1, p. 15-19, 2001.

MORADPOUR, D., PENIN, F. & RICE, C.M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews – Microbiology.** v. 5, p. 453-463, 2007.

MOREIRA, R. et al. Prospective study of hepatitis C virus infection in hemodialysis patients by monthly analysis of HCV RNA and antibodies. **Can J Microbiol.** v. 49, p. 503-507, 2003.

MORISHIMA, C. et al. Hepatitis C Virus–Specific Immune Responses and Quasi-Species Variability at Baseline Are Associated with Nonresponse to Antiviral Therapy during Advanced Hepatitis C. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 193, p. 931–40, 2006.

MULLIS KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Ann Biol Clin (Paris).** v.48, n. 8, p. 579-82, 1990.

MURPHY, DG; et al. Use of Sequence Analysis of the NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. **Journal of clinical microbiology.** v. 45, n. 4, p. 1102–1112, 2007a.

MURPHY, D., CHAMBERLAND, J., DANDAVINO, R., SABLON, E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatology.** v.46, p. 623a–623a, 2007b.

NAINAN, O.V. et al. Selective transmission of hepatitis C virus genotypes and quasispecies in humans and experimentally infected chimpanzees. **J.Gen. Virol.** v. 87, p. 83-91, 2006.

NAKATANI, SM. Genotipagem do vírus da Hepatite C por PCR em tempo real com base na análise da região NS5b [Tese]. São Paulo: **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, Doutorado em ciências. 195p, 2008.

NEUMANN, A. U. et al. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science.** v. 282, p.103–107, 1998.

OKUDA, K; YOKOSUKA, O. Natural history of chronic hepatitis C in patients on hemodialysis: case control study with 2-23years of follow-up. **World J Gastroenterol,** v.10, n.15, p. 2209-2212, 2004.

OLIVEIRA, J. M. de et al. Differences in HCV antibody patterns in hemodialysis patients infected with the same virus isolate. **Journal of medical virology**, v. 63, p. 265-270, 2001.

OP DE BEECK, A; et al. Characterization of Functional Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. **Journal of virology**. v. 78, n. 6, p. 2994–3002, 2004.

ORLAND, J. R.; WRIGHT, T. L. & COOPER, S. Acute hepatitis C. **Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 321-326, 2001.

PANG, P.S., PLANET, P.J. & GLENN, J.S. The Evolution of the Major Hepatitis C Genotypes Correlates with Clinical Response to Interferon Therapy. **PLoS ONE**. v. 4, n. 8, e6579, 12 paginas, 2009.

PARANÁ, R.; LYRA, L.G. et al. Hepatite crônica pelo vírus C. **Manual de Diagnóstico e tratamento das Doenças Hepáticas no paciente adulto e pediátrico**. v.1 p.51-59. 1999.

PASTAN, S.; BAILEY, J. Dialysis Therapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 20, p. 1428-37, 1998.

PENIN, F. et al. Conservation of the Conformation and Positive Charges of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Hypervariable Region 1 Points to a Role in Cell Attachment. **Journal of virology**, v. 75, n. 12, p. 5703–5710, 2001.

PIMENTEL, JPD. Hepatite C em pacientes hemofílicos: perfil imunológico e caracterização dos diferentes genótipos virais (dissertação). Mestrado em Patologia Tropical. **Universidade Federal do Amazonas - UFAM**, 86p. Ilust, 2009.

POSADA D. In press. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. Guindon S and Gascuel O. "A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". **Systematic Biology**. v. 52, p. 696-704, 2003.

PRATI, D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusion and other medical procedures: A global review. **Journal of Hepatology**. v. 45, n. 4, p. 607-616, 2006.

QUEIRÓZ, ATL. Seleção natural no vírus da hepatite C: Influencia do sistema imune na resposta ao tratamento (TESE) Programa interunidades em bioinformática - **Universidade de São Paulo**. 77 páginas, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2011. Disponível em: <http://www.R-project.org/>

RAMACHANDRAN, S. et al. End-point limiting-dilution real-time PCR assay for evaluation of hepatitis C virus quasispecies in serum: Performance under

optimal and suboptimal conditions. **Journal of Virological Methods**. v. 151, p. 217–224, 2008.

RAY RB, LAGGING LM, MEYER K, STEELE R, RAY R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. **Virus Res**. v. 37, p. 209-220, 1995.

RAY RB, LAGGING LM, MEYER K, RAY R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. **J Virol**. v. 7, p. 4438-4443, 1996a.

RAY RB, MEYER K, RAY R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. **Virology**. v. 226, p. 176-182, 1996b.

ROBERTSON, B. et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. **Arch Virol**. v. 143, n.12, 1998.

ROSS, R.S. et al. Transmission of Hepatitis C virus in an orthopedic hospital ward. **J. Med. Virol**. v. 81, p. 249-257, 2009.

ROSS, R.S.; VIAZOV, S.; ROGGENDORF, M. Phylogenetic analysis indicates transmission of Hepatitis C virus from an infect orthopedic surgeon to a patient. **J. Med. Virol**. v.66, p. 461-467, 2002.

SANTANA, G. O. et al. Anticorpo contra o vírus C da hepatite em pacientes sob programa de hemodiálise em Salvador, BA, Brasil. **Arq Gastroenterol**, v. 38, n.1, p. 24-31, 2001.

SEPKOWITZ, KA. Risk to cancer patients from nosocomial hepatitis C virus. **Infection Control and hospital epidemiology**. v. 25, n. 7, p. 599-602, 2004.

SHIMOKURA, G. et al. Patient-Care Practices Associated With an Increased Prevalence Of Hepatitis C Virus Infection among Chronic Hemodialysis Patients. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 32, n. 5, p. 415–424, 2011.

SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. **Journal of General Virology**. v. 85, p. 3173–3188, 2004.

SIMMONDS, P. et al. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**. v. 42, n. 4, p. 962-973, 2005.

SIMMONDS, P.; HOLMES, E.C. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J. Gen. Virol**. v. 74, p. 2391-99, 1993.

SMITH, D.B. & SIMMONDS, P. Molecular epidemiology of hepatitis C virus. **J gastroenterol Hepatol**. v. 12, p. 522–527, 1997.

SOUZA K P et al. Hepatitis B and C in the Hemodialysis Unit of Tocantins, Brazil. Serological and Molecular profiles. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 98, n. 5, p. 599-603, 2003.

SULOWICZ, W.; RADZISZEWSKI, A.; CHOWANIEC, E. Hepatitis C virus infection in dialysis patients. **Hemodialysis International.** v.11, p. 286-295, 2007.

SUZICH, J.A. et al. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide-stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with related pestivirus and flavivirus enzymes. **J Virol,** v. 67, p. 6152-8, 1993.

TAMURA K, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution.** v. 28, p. 2731-2739 , 2011.

TAN, SL, et al. Hepatitis C therapeutics: current status and emerging strategies. **Nature reviews-drug discovery.** v. 1, p. 867-881, 2002.

TANJI Y, HIJIKATA M, SETOH S, KENKO T, SHIMOTOHNO K. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. **J virol,** v.69, n.3, p. 1575-1581, 1995.

TAYLOR, D.R. et al. Inhibition of the Interferon- Inducible Protein Kinase PKR by HCV E2 Protein. **Science.** v. 285, p.107-110, 1999.

THI, VLD, DREUX, M. and COSSET, F. L. Scavenger receptor class B type I and the hypervariable region-1 of hepatitis C virus in cell entry and neutralization. **Expert reviews in molecular medicine.** v. 13, n.13, 20 páginas, 2011.

THOMPSON, J. D.; et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** v.25, n.24, p.4876-4882, 1997.

TORRE, F. et al. Kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF)-alpha receptors and cytokines in the early phase of treatment for chronic hepatitis C: comparison between interferon(IFN)-alpha alone, IFN-alpha plus amantadine or plus ribavirin. **Clin. Exp. Immunol.,** v. 136, n. 3, p. 507-12, 2004.

TORRES, KL; et al. Hepatitis C virus in blood donors, Brazil. **Emerging Infectious Diseases.** v. 15, n. 4, p. 676-678, 2009.

TORRES-PUENTE, M., et al. Contribution of insertions and deletions to the variability of hepatitis C virus populations. **Journal of General Virology.** v. 88, p. 2198–2203, 2007.

TSUKIYAMA-KOHARA, K.; IIZUKA, N.; KOHARA, M.; NOMOTO, A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. **J Virol.** v. 66, p. 1476-1483, 1992.

TU, A. W. et al. Prevalence and incidence of hepatitis C virus in hemodialysis patients in british Columbia: Follow-up after a possible breach in hemodialysis machines. **Can. J. infect. dis. med. microbiol.** v. 20, n. 2, p. e19-e23, 2009.

VAN DER VELDEN, VHJ et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches and laboratory aspects. **Leukemia.** v.17, p.1013-1034, 2003.

VOGLER, I.H.et al. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** v. 46, n. 6, p. 303-308, 2004.

WALDHERR, R; EBERLEIN-GONSKA, M; NORONHA, I L. Citocinas e Rim In: CRUZ, JENNER. **Atualidades em Nefrologia**, Sarvier, São Paulo, v. 2, p.1-20, 1992

WANG. C. et al. Alpha interferon induces distinct translational control programs to suppress hepatitis C virus RNA replication. **J. virol.** v.77, p.3898-3912, 2003.

WATZINGER, F, EBNER, K, LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 27, p. 254–298, 2006.

WAYNE, D. et al. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. **Bioinformatics.** 2010 [PMID: 20671151]

WESESLINDTNER, L. et al. Acute infection with a single hepatitis C virus strain in dialysis patients: Analysis of adaptive immune response and viral variability. **Journal of Hepatology.** v. 50, n. 4, p. 693-704, 2009.

WHO - World Health Organization: Media centre. Hepatitis C. Fact sheet N°164 June 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 27 de novembro de 2011.

YOUSEFI S, VAZIRI ND, CARANDANG G, Evaluation of the in vitro production of interferon gamma and other lymphokines in uremic patients. **Proc Soc Exp Biol Med.** v.184, n.2, p.179-85, Feb. 1987.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Soroprevalência de anticorpos contra o vírus da Hepatite C (HCV) em pacientes em tratamento de hemodiálise.

Justificativa/objetivos: Conhecer o número de casos de pessoas que passam a apresentar resultado positivo nos testes para hepatite C durante o tratamento de hemodiálise através da análise laboratorial de amostras dos participantes.

Procedimentos: Para este estudo será coletada amostra de 20ml de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus, a confirmação do diagnóstico e o acompanhamento laboratorial da infecção. Todos os testes serão realizados no HEMOAM em Manaus.

Riscos e desconfortos: Não existem riscos associados à sua participação neste estudo. O único desconforto é a picada da agulha para a coleta de amostra de sangue.

Benefícios: A sua participação neste estudo não implica em nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a). O estudo, contudo, proporcionará maiores esclarecimentos sobre a prevenção e infecção pelo vírus da hepatite C.

Acompanhamento assistencial: Sendo o senhor(a) participante deste estudo terá, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à doença em estudo, podendo entrar em contato com Dr^a Adriana Malheiro e Laura Maia (HEMOAM Tel: 3655-0111) e o Dr. Wornei S. Braga (FMTAM). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do HEMOAM.

Voluntariedade: A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor(a) pode retirar sua participação a qualquer momento, o senhor(a) não terá qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da Instituição onde faz o tratamento.

Confidencialidade, privacidade e anonimato: Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

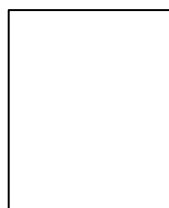
Uso de material biológico coletado do participante/ metodologia: O sangue coletado (20ml) será utilizado para o que se propõe neste estudo e será armazenado para estudos posteriores. Neste caso, podendo ser realizados estudos dos tipos de vírus HCV presente no sangue.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo. O Sr.(a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras para o estudo dos tipos de vírus? () sim ou () não

Assinatura do participante
dactiloscópica

Assinatura do pesquisador



Impressão

Manaus, ___/___/___

QUESTIONÁRIO / DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Título do projeto: Soroprevalência de anticorpos contra o Vírus da Hepatite C (HCV) em pacientes em tratamento de hemodiálise.

PARTE I: ENTREVISTA COM O PACIENTE

Dados pessoais/ demográficos:

Nº Ident.:

Nº Ident. na clínica renal :

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: F M

Estado civil: Casado Solteiro Outros _____

Profissão: _____ ☎ : _____

Local do tratamento de hemodiálise: Clínica Renal Outro: _____

Dados complementares do caso antes do tratamento de hemodiálise:

Tem vacinação contra: Hepatite A Hepatite B

Paciente tem história anterior: cterícia alcoolismo

O paciente foi submetido ou exposto a:

transfusão de sangue/derivados

parto normal

Quando: _____

acunputura

drogas injetáveis

tatuagem

transplante

piercing

3 ou mais parceiros sexuais

tratamento dentário

medicamentos injetáveis

tratamento cirúrgico

Contato com paciente de Hepatite B ou C, ou com portador dos VHB ou VHC:

sexual

domiciliar (não sexual)

ocupacional

PARTE II: DADOS OBTIDOS A PARTIR DA FICHA MÉDICA DO PACIENTE

Dados clínicos:

Doença de base: _____

Data do início do tratamento por hemodiálise: ___/___/___ Freqüência/semana: _____

Sala e turno de diálise: _____

Sintomatologia associada ao HCV

cterícia

Dor abdominal

Hepatopatia diagnosticada

Hepatocarcinoma Hepatomegalia outros _____

Está em tratamento para HCV? Não Sim

Qual? _____

Co-infecção:

HIV data do diagnostico: ___/___/___

HBV data do diagnostico: ___/___/___

Sífilis data do diagnostico: ___/___/___

Doença de chagas data do diagnostico: ___/___/___

HTLV data do diagnostico: ___/___/___

Testes laboratoriais para HCV:

Sorologia **antes** da hemodiálise: Negativa positiva

Marcadores anti-HCV

Marca: _____

Data do teste : ___/___/___

Local da realização do teste: Clínica Renal Outro _____

Do: _____ Cut off: _____

Observações: _____

Sorologia **durante** a hemodiálise :

Primeira sorologia reativa para HCV:

anti-HCV Marca: _____

Data do teste: ___/___/___

Local da realização do teste: Clínica Renal Outro _____

Do: _____ Cut off: _____

Acompanhamento laboratorial na **Clínica Renal:**

Testes sorológicos

anti-HCV Marca: _____

Data do teste: ___/___/___

Local da realização do teste: Clínica Renal Outro _____

Do: _____ Cut off: _____

anti-HCV Marca: _____
Data do teste: ___/___/___
Local da realização do teste: Clínica Renal Outro _____
Do: _____ Cut off: _____

anti-HCV Marca: _____
Data do teste: ___/___/___
Local da realização do teste: Clínica Renal Outro _____
Do: _____ Cut off: _____

Outros testes para HCV? Não Sim

HCV RNA

Data: ___/___/___

Resultado: Negativo Positivo

Local da realização do teste: _____

Genotipagem:

Data: ___/___/___

Resultado: _____

Observações: _____

PARTE III: Acompanhamento laboratorial no HEMOAM

Registro LAP: _____

Testes sorológicos ELISA

Marca: _____

DATA	TESTE	DO	CUT OFF	RESULTADO

Teste complementar Imunoblot

Marca: _____

DATA	BANDAS				
	c100	c33c	c22(p)	NS5	hSOD

Observações: _____

Testes bioquímicos

Aspartato aminotransferase: _____
 Data do teste: ___/___/___ Concentração: _____

Alanina aminotransferase: _____
 Data do teste: ___/___/___ Concentração: _____

Bilirrubina direta: _____
 Data do teste: ___/___/___ Concentração: _____

Bilirrubina total: _____
 Data do teste: ___/___/___ Concentração: _____

Testes de análise da resposta imunológica

Resultado do teste de citocinas

Citocina	Data do teste	DO	Concentração	OBS
IL-10				
IL-4				
IL-12				
INF- γ				

O resultado do teste de citometria de fluxo será anexado a esta ficha de acompanhamento clínico e laboratorial

_____ pesquisador responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Soroprevalência de anticorpos contra o vírus da Hepatite C (HCV) em pacientes em tratamento de hemodiálise.

O estudo visa conhecer como é a defesa dos pacientes renais crônicos em tratamento de hemodiálise contra o vírus da hepatite C, para se obter este conhecimento é necessário a comparação com pacientes em tratamento de hemodiálise que não estejam infectados com o vírus da hepatite C.

Para este estudo será coletada amostra de 10mL de sangue. Serão feitos testes para avaliar a defesa do organismo contra o vírus da hepatite C. Todos os testes serão realizados no HEMOAM em Manaus.

Não existem riscos associados à sua participação neste estudo. O único desconforto é a picada da agulha para a coleta de amostra de sangue.

A sua participação neste estudo não implica em nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a). O estudo, contudo, proporcionará maiores esclarecimentos sobre a prevenção e infecção pelo vírus da hepatite C.

Sendo o senhor(a) participante deste estudo terá, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, podendo entrar em contato com Dr^a Adriana Malheiro e Laura Maia (HEMOAM Tel: 3655-0111).

A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor(a) pode retirar sua participação a qualquer momento, o senhor(a) não terá qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da Instituição.

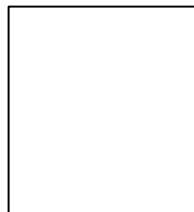
Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

O sangue coletado (10mL) será utilizado apenas para o que se propõe neste estudo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo.

Assinatura do participante



Impressão
dactiloscópica

Assinatura do pesquisador ou colaborador

Manaus, ____/____/____