



Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada



Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de voluntários anti-HCV reativos do município de Iranduba, região metropolitana de Manaus

Midiã Barbosa Pimentel de Andrade

Manaus-AM

2013

Midiã Barbosa Pimentel de Andrade

Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de voluntários anti-HCV reativos do município de Iranduba, região metropolitana de Manaus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Cristina Melo Rocha

Co-orientadores: Dr. Felipe Gomes Naveca

Dra. Adriana Malheiro

Manaus-AM

2013

Midiã Barbosa Pimentel de Andrade

Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de voluntários anti-HCV reativos do município de Iranduba, região metropolitana de Manaus

Presidente da banca:

Profa. Dra. Cristina Melo Rocha

Banca examinadora:

Prof. Dr. Juan Miguel Villalobos- Salcedo

Prof. Dr. Luis André Morais Mariúba

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

A553c Andrade, Midiã Barbosa Pimentel de
Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de voluntários anti-HCV reativos do município de Iranduba, região metropolitana de Manaus / Midiã Barbosa Pimentel de Andrade. - Manaus: UFAM, 2013.
123 f. : il. color.
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) —
Universidade Federal do Amazonas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Melo Rocha.
Co-orientadores: Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca; Prof^a. Dra^a. Adriana Malheiro.

1. Hepatite C – Diagnóstico – Iranduba (AM) 2. Hepatite C – Tratamento – Iranduba (AM) 3. Hepatite C – Transmissão – Iranduba (AM)
I. Rocha, Cristina Melo (Orient.) II. Naveca, Felipe Gomes (Orient.) III. Malheiro, Adriana (Orient.) IV. Universidade Federal do Amazonas V.
Título

CDU (2007): 616.36-002(811.3)(043.3)

Ao Deus da minha vida.
Aos meus queridos pais, Joaquim e Ila.

Ao meu querido e amado esposo Denísio.

E a minha linda filha Rebeca.

Agradecimentos

À minha orientadora, Cristina Melo Rocha, pela oportunidade de crescimento profissional, que com muita atenção e dedicação deu suporte e instruções necessárias para a conclusão dessa dissertação. Pelo incentivo científico e pelos valiosos ensinamentos.

À minha co-orientadora, Adriana Malheiro, pelo incentivo e suporte técnico dispensados.

Ao meu co-orientador, Felipe Gomes Naveca, pela disposição e incansável transmissão de seu conhecimento.

À Secretaria de Saúde Municipal de Iranduba, pelo interesse e parceria estabelecida com nossa equipe de trabalho.

À equipe de enfermagem e agentes comunitários de saúde do município de Iranduba, pelo companherismo diante das dificuldades enfrentadas, dedicação e apoio técnico indispensáveis na realização deste trabalho.

Ao companheiro de laboratório de virologia, George Allan Villarouco da Silva, pelos esclarecimentos de dúvidas e pelo auxílio incansável.

Aos alunos da Liga de medicina das Universidades Estadual e Federal, Valter Coelho, André Patrício, Lígia Heinrichs, Gabriel Reis, Mayara da Silva, Juliana Maria, Carolina Pires da Silva, Renata Fróes e Sanmya Vitória pelo enorme apoio que recebi ao longo do período de coleta de dados.

Aos meus irmãos, Marília, Júnior e Eliaquim, e amigos pelos incentivos, convívio e “troca de conhecimentos”.

Aos amigos, Victor, Val e Leka, pela contribuição científica.

Abreviaturas e siglas

ALT- Alanina aminotransferase

ANTI-HCV- Anticorpo contra o HCV

°C- Graus Celsius

CD25- Marcador de células T ativadas, células B e monócitos

CD81- Proteína receptora que se associa a CD19 e CD21 para formar correceptor de célula B

cDNA- Ácido desoxirribonucléico complementar

DCs- Células dendríticas

DC-SIGN- Lectina tipo C, frequentemente co-expresso com o receptor de manose

DNA- Ácido desoxirribonucléico

et al. - e colaboradores

FOXP3- Fator de transcrição expresso em células T reguladoras

HAV- Vírus da hepatite A

HBV- Vírus da hepatite B

HCV- Vírus da hepatite C

HCV-RNA RNA do vírus da hepatite C

HDL- Lipoproteína de densidade alta

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

IFN- Interferon

IL- Proteína Interleucina

LDL- Lipoproteína de densidade baixa

L-SIGN- Lectina tipo C que auxilia na captura de patógenos

mL- Mililitro

ng- Nanograma

NK- Células natural killer

NKT- Células natural killer T

p- p valor

pb- Pares de bases

PCR- Reação em cadeia da polimerase

Primer- Oligonucleotídeo iniciador

qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou em tempo real

RIG-1- Ácido retinóico induzível gene 1

RNA- Ácido ribonucléico

SINAN- Sistema de Informação de Agravos e Notificação

STAT-5- Proteína Transdutora de Sinal e Ativador da Transcrição 5

TCD4- Linfócitos T auxiliar

TCD8- Linfócitos T citotóxicos

TGF- Fator de crescimento tumoral

Th1- Linfócito T auxiliar 1

Th2- Linfócito T auxiliar 2

TLRs- Receptores Toll like

TNF- Fator de necrose tumoral

TREG- Células T reguladoras

UTRs- Regiões terminais conservadas e não codificadoras

µg- Micrograma

VLDL- Lipoproteína de densidade muito baixa

Lista de figuras

Figura 1. Relatório elaborado pelo Ministério da Saúde através Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.

Figura 2. Prevalência da positividade para o anti-HCV, em doadores de sangue, nos diferentes estados brasileiros.

Figura 3. Esquema do genoma do vírus da hepatite C.

Figura 4. Distribuição Global do HCV por Genótipo.

Figura 5. Árvore evolutiva dos principais genótipos do HCV que são encontrados em países industrializados e suas principais associações epidemiológicas com os diferentes genótipos.

Figura 6. Resposta imune ao HCV.

Figura 7. Fluxograma metodológico

Figura 8. Etapas da realização do teste rápido anti-HCV Bioeasy®.

Figura 9. Resultado positivo do teste rápido anti-HCV Bioeasy®.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose da amostra da voluntária 379, apresentando um amplicon de 400 pares de base (pb).

Figura 11. Análise filogenética da região NS5B do HCV da amostra da voluntária 379. Árvore de máxima verossimilhança, implementado no programa Geneious 5.6.5.

Figura 12. Regressão linear da curva padrão do caso HCV soropositivo.

Figura 13. Quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A da paciente 379, realizadas pela técnica de citometria de fluxo CBA, utilizando o Kit T_H1, T_H2 e T_H17.

Lista de tabelas

Tabela 1. *Primers* e sonda do genoma do HCV utilizados nos ensaios moleculares.

Tabela 2. Reagentes do PCR em tempo real.

Tabela 3. Reagentes da PCR convencional.

Tabela 4. Reagentes da reação de sequenciamento.

Tabela 5. Reagentes utilizados na curva padrão.

Tabela 6. Análise das variáveis sóciodemográficas, Iranduba-AM, 2013.

Tabela 7. Variáveis relativas aos fatores de risco e vulnerabilidade para a infecção pelo HCV na população estudada, Iranduba-AM, 2013.

Resumo

A hepatite C é uma doença caracterizada pela inflamação do fígado, sendo o vírus HCV transmitido, principalmente, através de sangue contaminado. Estima-se que 170 milhões de pessoas, cerca de 3% da população mundial, sejam portadores de hepatite C. Ao contrário dos demais vírus que causam hepatite, o HCV não gera resposta imunológica adequada no organismo, o que faz com que 15 a 20% das pessoas infectadas curem espontaneamente, enquanto 80% evoluem para cronificação da doença. No Brasil ocorre grande variação na prevalência da infecção, isso se deve principalmente, as distintas características epidemiológicas entre as populações e a região geográfica estudada, além de restritas informações sobre a doença. Não existe vacina contra a hepatite C, assim o diagnóstico precoce amplia a eficácia do tratamento. O objetivo deste trabalho consistiu em caracterizar o perfil epidemiológico, virológico e imunológico anti-HCV na população geral, residente no município de Iranduba, região metropolitana de Manaus. Participaram da pesquisa 700 voluntários. Foi detectado um caso positivo no teste rápido anti-HCV, apesar da presença dos clássicos fatores de risco para a infecção nos voluntários soronegativos. A realização do teste molecular, reação em cadeia da polimerase, confirmou o diagnóstico da infecção e através da análise filogenética da região NS5B do genoma viral foi constatado o genótipo 2b. Dentre as citocinas quantificadas, no caso anti-HCV positivo, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-17A foram mais prevalentes. O estudo apontou soroprevalência anti-HCV de 0,14%, classificando o município de Iranduba como local de baixa endemicidade para o HCV e reforçando a caracterização heterogênea do Amazonas para a hepatite C.

Palavras-chave: Epidemiologia; diagnóstico para HCV; transmissão da hepatite C; Iranduba.

Abstract

Hepatitis C is a disease characterized by the inflammation of the liver with HCV transmitted primarily through infected blood. It is estimated that 170 million people, about 3% of the world population, is infected with hepatitis C. Unlike other viruses that cause hepatitis, HCV does not generate adequate immune response in the body, which makes 80% of the infected to evolve into chronicity, whereas 15 to 20% of infected people heal spontaneously. In Brazil there is a significant variation in the prevalence of infection, the main cause of this epidemiological distinction is the characteristics differences between populations and geographic that each region studied has, and the limited epidemiological data about the disease. There is no vaccine against hepatitis C virus, thus early diagnosis increases the effectiveness of treatment. The aim of this study was to characterize the epidemiological, virological and immunological anti-HCV general population living in the city of Iranduba, metropolitan region of Manaus. Where were evaluated 700 volunteers and it was detected a positive case, using a rapid anti-HCV test, despite the presence of classical risk factors for infection in the seronegative volunteers. The realization of a molecular test, the polymerase chain reaction, confirmed the diagnosis of infection and by phylogenetic analysis of the NS5B region of the viral genome was observed genotype 2b. Among cytokines quantified, in the anti-HCV positive case, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α and IL-17A were more prevalent. The study showed seroprevalence anti-HCV of 0.14%, ranking the city as a place of low endemicity for HCV and reinforcing the heterogeneous characterization of the Amazon of hepatitis C.

Keywords: Epidemiology, diagnosis for HCV, hepatitis C transmission; Iranduba.

Sumário

1. Introdução.....	12
1.1 Considerações gerais.....	13
1.2 Resposta imune ao vírus da hepatite C.....	21
1.3 Diagnóstico.....	26
1.4 Tratamento e prevenção.....	29
1.5 Epidemiologia da hepatite C.....	31
2.0 Justificativa.....	38
3.0 Objetivos.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.1 Objetivo específicos.....	39
4.0 Metodologia.....	39
4.1 Tipo do estudo.....	39
4.2 Área do estudo.....	39
4.3 Delineamento amostral.....	40
Critérios de inclusão.....	42
Critérios de exclusão.....	42
4.4 Aspectos éticos.....	44
4.5 Apoio institucional.....	44
4.6 Procedimentos laboratoriais.....	44
4.6.1 Teste rápido anti-HCV.....	44
4.6.2 Análise estatística.....	45
4.6.3 Amplificação dos ácidos nucleicos.....	45
4.6.4 Kit CBA.....	52
5.0 Resultados.....	53
5.1 Análise descritiva dos participantes.....	53
5.2 Análise descritiva do caso positivo para hepatite C.....	55
6.0 Discussão.....	62
7.0 Conclusões.....	67
Referências.....	68
Apêndices	
Anexos	

1. Introdução

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus de genoma RNA (Ácido ribonucléico) da família Flaviviridae, que foi inicialmente detectado no soro de uma pessoa com hepatite não-A não-B (Choo et al, 1989). O HCV é um dos principais responsáveis pelo câncer de fígado e de doenças hepáticas em estágio terminal em todo o mundo (Nguyen & Nguyen, 2013).

O HCV apresenta seis genótipos, classificados de 1 a 6, com diversos subtipos distribuídos em todo o mundo (Bukh et al, 1995; Sefidi et al, 2013). Assim, a extensa variabilidade genética do HCV dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz, e favorece sua epidemia globalizada (Gray et al, 2011).

O HCV apresenta vários mecanismos de escape do sistema imunológico, contribuindo dessa forma para a evolução da doença durante décadas. Com isso, a maioria das pessoas que adquirem a infecção, desenvolvem cronicidade em 80% dos casos, destes 5% dos indivíduos cirróticos apresentam graves complicações, como câncer hepático (Ashfaq et al, 2011).

Desde 1992, com o desenvolvimento do primeiro teste para identificação do anticorpo contra o HCV (anti-HCV), houve maior segurança em transfusões sanguíneas (Strauss 2001). Entretanto, outros mecanismos de transmissão, como compartilhamento de seringas contaminadas durante o uso de drogas intravenosas, transplante de órgãos, hemodiálise, transmissão vertical, exposição sexual e ocupacional são determinantes para a infecção viral (Alter, 2002, Maia *et al* 2009, Cavalheiro *et al*, 2010). Mesmo excluídos todos os fatores de risco anteriormente citados, a transmissão esporádica, ou sem fator de risco identificado, é responsável por uma quantidade significativa de números de casos de infecção pelo HCV (Martins *et al*, 2011).

No Brasil, segundo o Inquérito Nacional de Prevalência de Hepatites Virais 2010, realizado em todas as capitais brasileiras, entre os anos de 2005 a 2009 a prevalência nacional estimada para hepatite C foi de 1,38%, sendo que entre as cinco regiões brasileiras, a região Norte apresentou as maiores taxas de prevalência da doença, tendo 2,1% dos pesquisados apresentado sorologia anti-HCV positiva (Universidade de Pernambuco, 2010).

A história natural precisa da hepatite C é difícil de ser avaliada, pela falta de dados prospectivos, dificuldade de definir a data da transmissão e principalmente pelo fato de que na fase aguda a infecção é assintomática na maioria dos casos.

O diagnóstico da infecção pelo HCV costuma ser realizado através de exames para doação de sangue, avaliações médicas de rotina ou quando sintomas de doença hepática surgem, já na fase avançada (Dominguez, 2012). O diagnóstico sorológico é geralmente o primeiro exame a ser realizado, através do marcador anti-HCV, que indica contato prévio com o vírus, entretanto, não define se a infecção é aguda ou crônica ou ainda curada espontaneamente, por isso a necessidade de confirmação do diagnóstico por testes moleculares voltados para pesquisa de viremia (Brasil, 2008).

1.1 Considerações gerais

Medindo aproximadamente 50nm de diâmetro, o HCV é um vírus esférico, pequeno e envelopado. Seu genoma se constitui de uma molécula de RNA com polaridade positiva, a molécula do genoma do RNA é traduzida diretamente em proteínas sem necessidade de transcrição, que contém cerca de 9.500 nucleotídeos responsáveis pela codificação da replicação do vírus. A cadeia de RNA possui duas regiões terminais altamente conservadas e não codificadoras, UTRs (*Untranslated region*), 5' e 3' e entre estas uma fase de leitura aberta, ORF (*Open reading frame*), que codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos, proteoliticamente clivada em pelo menos dez proteínas virais (Ashfaq *et al*, 2011).

No polo 5' N-terminal, esta poliproteína é clivada em três proteínas estruturais: o nucleocapsídeo (core), envelope um (E1) e envelope dois (E2) envolvidas na “arquitetura” do vírus. No polo 3' carboxi-terminal é clivada em sete proteínas não-estruturais, NS (*serine-like protease*), NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, responsáveis pelo ciclo replicativo do HCV (Penin *et al*, 2004), (Figura 1).

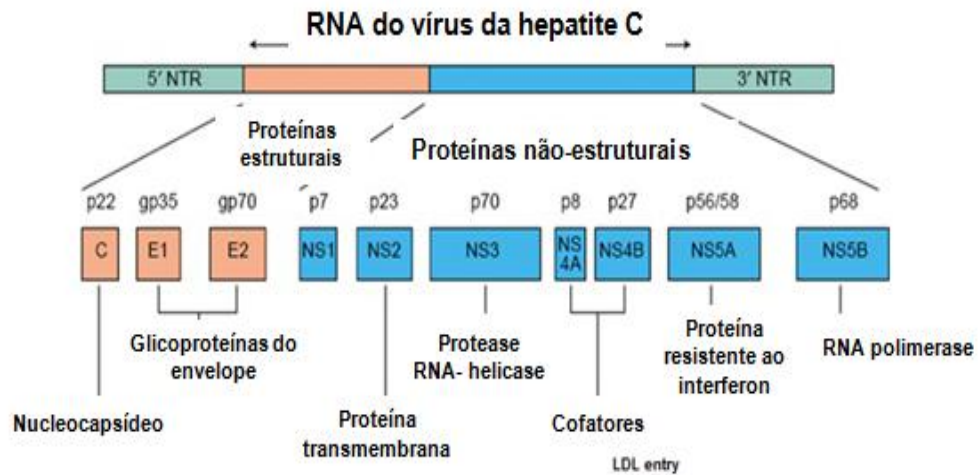


Figura 1. Esquema do genoma do vírus da hepatite C. Adaptado de Ashfaq *et al*, 2011.

A proteína *core* é altamente conservada e compõe o nucleocapsídeo viral, sendo constituída pelos primeiros 191 aminoácidos (Ashfaq *et al*, 2011). Essa proteína também interage com numerosas proteínas das células hospedeiras afetando suas funções, tais como a transcrição do gene, o metabolismo lipídico, apoptose e diversas vias de sinalização (Tellinghuisen & Rice, 2002).

E1 e E2 são proteínas que se destinam ao envoltório viral e são importantes na entrada do vírus na célula (Ashfaq *et al*, 2011). Em relação a proteína P7, tem sido demonstrado a participação da mesma na montagem de partículas do vírus e liberação de vírions dos genótipos de forma específica (Steinmann *et al*, 2007).

As proteínas NS2 e NS3 estão envolvidas na clivagem de todas as outras proteínas não estruturais. NS3 é uma das proteínas mais estudadas do genoma do HCV. Possui atividade helicase, participando do mecanismo patogênico do HCV, principalmente no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Ashfaq *et al*, 2011). A proteína NS4 atua como cofator para a proteína NS3 e também participa da fosforilação da região NS5A (Wolk *et al*, 2000).

NS5A é uma fosfoproteína que interfere no ciclo replicativo do HCV. É composta de aproximadamente 447 aminoácidos e influencia na replicação do RNA viral, na modulação de vias de sinalização celular, patogênese e regulamentação da apoptose (Ashfaq *et al*, 2011). Contudo, suas funções enzimáticas e sua completa estrutura ainda não estão bem esclarecidas (Yamasaki *et al*, 2012). A suscetibilidade do HCV ao interferon parece depender da sequência da proteína NS5A (Lemm *et al*,

2010), por isso estudos dessa região pretendem influenciar na concepção de novos medicamentos e no desenvolvimento de outros recursos para melhorar a terapia do HCV (Yamasaki *et al*, 2012).

Em sangue de pacientes infectados, o HCV está fisicamente ligado com VLDL, HDL e LDL (Rehermann, 2009). Para ocorrer a entrada do vírus no hepatócito, devem existir moléculas como a tetraspanina CD81 (Zhang *et al*, 2004), o receptor *scavenger* B tipo I (Scarselli *et al*, 2002) e as proteínas claudina (Zheng *et al*, 2007) e occludina (Liu *et al*, 2009) que conferem especificidade as espécies. O HCV também se liga aos glicosaminoglicanos, ao receptor de LDL e às lectinas DC-SIGN e L-SIGN, estes, porém, não são fatores essenciais a entrada do vírus (Rehermann, 2009).

Dessa forma, o vírus é ligado ao seu receptor, internalizado, e libera seu nucleocapsídeo para o citoplasma. No citoplasma, há a perda do capsídeo, e o RNA do HCV é utilizado para a tradução e replicação de suas poliproteínas (Ashfaq *et al*, 2011).

A tradução é iniciada pela ligação dos ribossomos ao sítio de entrada interna dos ribossomos ou *Internal Ribosome Entry Site*, que se localiza junto ao códon AUG na extremidade 5'UTR do RNA viral. À medida que a tradução ocorre os aminoácidos que surgem, sinalizam para que o complexo traducional (RNAm – ribossomos–RNAt – peptídeo) se dirija para a membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER). No RER, a sequência é deslocada para a “luz” do retículo, pois nesse local as enzimas peptidases executarão as clivagens proteolíticas em proteínas estruturais (C, E1 e E2) e não-estruturais (P7, NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), sendo que a partir da atividade de autoclivagem da proteína NS2, as outras proteínas serão originadas (Penin *et al*, 2004).

Logo em seguida, dar-se-á início ao processo de replicação e maturação. Proteínas não estruturais e o RNA viral formam uma associação com a membrana da célula, realizando o chamado “complexos de replicação” e transcrição que são iniciados e catalisam a fita negativa intermediária de RNA, que por sua vez geram moléculas para a formação do RNA de fita positiva (Rehermann, 2009; Ashfaq *et al*, 2011).

As proteínas do capsídeo e o RNA genômico se reúnem para formar o nucleocapsídeo, que brota através de membranas intracelulares em vesículas citoplasmáticas. Já os vírions envelopados e maturados no aparelho de Golgi, deixam a célula pela via secretora (Penin *et al*, 2004; Rehermann, 2009).

Quando se realiza a análise do genoma do HCV, é possível verificar grande heterogenicidade de sequências gênicas, denominadas *quasiespécies* (Burke & Cox, 2010). Esta alta variabilidade pode ser explicada por uma combinação de três fatores: o fato da RNA polimerase viral atuar sem revisão, o HCV ter co-evoluído com as populações humanas durante milhões de anos e a rapidez do ciclo de vida viral, que resulta na produção de aproximadamente $1,3 \times 10^{12}$ vírions por dia no paciente (Yamasaki *et al*, 2012).

A classificação dos genótipos do HCV foi uniformizada por Simmonds e cols. classificados de 1 a 6, com diversos subtipos, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a e 6a, e cerca de 70 diferentes cepas distribuídos em todo o mundo (Simmonds *et al*, 1993; Bukh *et al*, 1995), (Figura 2). Dessa forma, a extensa diversidade de subtipos de genótipos do HCV se difere de 31% a 34% em seus nucleotídeos e em cerca de 30% em suas sequências de aminoácidos (Vieira *et al*, 2011), esse fato é uma das principais causas de sua epidemia globalizada (Gray *et al*, 2011).

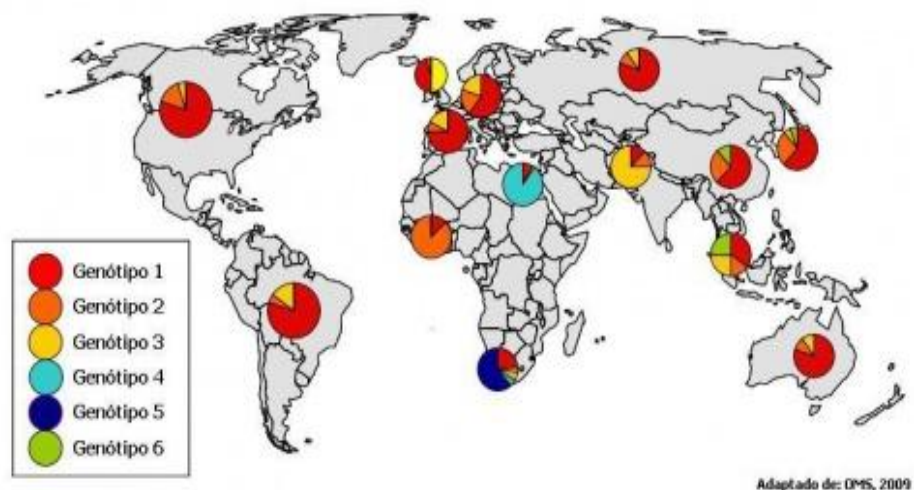


Figura 2. Distribuição Global do HCV por Genótipo (WHO, 2009).

A transmissão da hepatite C, ocorre após o contato com sangue contaminado em exposição percutânea, transfusão de sangue ou hemoderivados e transplante de doadores infectados (Shepard *et al*, 2005). Entre suas principais formas de transmissão, destacam-se: o compartilhamento de equipamentos para uso de drogas endovenosas, instrumentos cortante ou perfurante de uso coletivo contaminados pelo vírus ou sem esterilização adequada, por exemplo, material odontológico e cirúrgico (Alter, 2002), hemodiálise, exposição ocupacional ao sangue, além de objetos de uso pessoal tais como lâminas de barbear e escovas de dentes (Maia *et al* 2009; Cavalheiro *et al*, 2010).

Durante muitos anos, a transfusão de sangue e seus hemoderivados não testados em bancos sanguíneos constituíram uma das principais formas de transmissão para o HCV, entretanto, com a padronização dos processos de triagem, houve uma notável redução na transmissão de hepatite C (Brasil, 1993). Porém, vale ressaltar que o processo de rastreamento de infecções em bolsas sanguíneas, não ocorreu uniformemente em todas as regiões, Estados como o de Rondônia, ainda realizava em 1995, transfusão sanguínea sem o devido controle de qualidade (Katsuragawa *et al*, 2010).

Mesmo após a diminuição da transmissão do HCV por transfusão ter ocorrido, o elevado número de usuários de drogas intravenosas contribuiu para o aumento da doença, tornando-se o principal instrumento de possível contaminação do HCV (Shepard *et al*, 2005). Nos países desenvolvidos, o compartilhamento de equipamentos para o uso de drogas intravenosas é responsável por uma alta porcentagem de contaminações pelo HCV, que vão de 70% a 80% (Alter, 2002; Alter, 2007). O Brasil está entre os quatro países que mais consomem drogas injetáveis no mundo, de acordo com relatório divulgado pela Organização das Nações Unidas em 2009, apesar disso, as estatísticas sobre a relação dos usuários de drogas e o HCV ainda são escassas, principalmente pelo fato dessa população ser negligenciada, favorecendo assim a disseminação viral. Estudos realizados com presidiários no estado de Sergipe e Rio Grande do Sul, por exemplo, revelaram nos voluntários que apresentaram anti-HCV positivo, o uso de drogas injetáveis, como variável preditora para infecção pelo HCV (Santos *et al*, 2011; Da Rosa *et al*, 2012).

Em decorrência das várias atividades humanas expostas ao contato com sangue ou fluidos corporais, outros modelos biológicos podem contribuir para a transmissão da hepatite C, alguns exemplos incluem: procedimentos estéticos, instrumentos de pedicure e manicure, culturais e religiosos, serviços de barbearia, confecção de tatuagens e *piercing*, rituais de escarificação, circuncisão e acupuntura (Alter, 2007).

A transmissão sexual do vírus é atualmente muito debatida, sendo este fator de risco um dos mais controversos na epidemiologia da hepatite C. Entretanto, é comprovado que pessoas que possuem múltiplos parceiros(as) e com práticas sexuais desprotegidas, sem o uso de preservativos, estão suscetíveis à contaminação (Brasil, 2011).

Strauss ressaltou a possibilidade da transmissão sexual e constatou em sua experiência médico-hospitalar, que a contaminação através do parceiro sexual varia

de 6% a 10% dentro dos casos de hepatite C (Strauss, 2001), ocorrendo em maior probabilidade a transmissão homem-mulher que a transmissão mulher-homem (Magder *et al*, 2005). Entretanto, um recente estudo realizado por Terrault *et al* em casais heterossexuais monogâmicos, diverge com a prevalência anteriormente citada, não relacionando a prática sexual específica com a positividade para o HCV, conclusão baseada no risco extremamente baixo de transmissão do HCV (aproximadamente um caso a cada 190.000 contatos sexuais), além de que, existe grande dificuldade de se estabelecer o mecanismo de transmissão da infecção, pelo compartilhamento de objetos pessoais, como lâmina de barbear e escova de dentes, prática comum entre casais que apresentam muitos anos de convivência (Terrault *et al*, 2013).

Outros fatores, ainda relacionados a hábitos sexuais, parecem contribuir para a transmissão do HCV, entre eles: relações sexuais traumáticas (Magder *et al*, 2005), doenças sexualmente transmissíveis (Victoria *et al*, 2010) e homossexualismo masculino (Browne *et al*, 2004). A disseminação intrafamiliar também pode existir, possivelmente por compartilhamento de materiais cortantes, de uso coletivo ou pela exposição de ferimentos abertos (Strauss, 2001).

Em profissionais de saúde, a ocorrência de HCV varia de 2% a 10%, estando associado o risco de contágio com o tempo de serviço, realização de procedimentos invasivos e ocorrência de acidentes percutâneos, no entanto os fatores de risco para a transmissão ocupacional ainda não estão bem definidos (Ciorlia & Zanetta, 2007).

Apesar de dados conflitantes com relação a prevalência do HCV em profissionais de saúde, a exposição ocupacional continua sendo considerada um potencial fator de risco para infecção pelo HCV, principalmente devido à ausência de medidas preventivas eficazes (Martins *et al*, 2011).

Strauss constatou, dentre os casos eventualmente rotulados como esporádicos, uma porcentagem significativa de pacientes que apresentaram hepatite C após cirurgias prévias e/ou atendimentos médicos de urgência em prontos-socorros ou ainda a hipótese já confirmada de contaminação médica durante o ato cirúrgico (Strauss, 2001).

A chamada transmissão vertical, mãe para filho, também constitui uma forma de transmissão da infecção pelo HCV. As taxas de transmissão do vírus variam entre 0% a 20% e ocorre, em média, em 5% dos bebês nascidos de mães portadoras do HCV (Tajiri *et al*, 2001), sendo alguns fatores de risco decisivos para a contaminação: elevada carga viral da mãe, trabalho de parto prolongado e

coinfecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Roberts & Yeung, 2002). Existem indícios de um maior risco de contaminação no parto normal do que na cesariana. O aleitamento materno parece não influenciar no processo de transmissão do HCV, mas alguns estudos são conflitantes (Mast *et al*, 2005).

Pacientes em hemodiálise fazem parte do grupo de pessoas que apresentam uma grande possibilidade de adquirir a infecção pelo HCV (Silva *et al*, 2003). Esses pacientes têm maior tendência a tornar-se portadores crônicos do vírus e podem ser um potencial reservatório da transmissão da hepatite C, pois a ausência de controle de infecções nas unidades de hemodiálise, a falta de esterilização adequada da máquina de diálise e o período de tratamento contribuem para a aquisição do vírus, favorecendo a disseminação nosocomial do HCV em centros de diálise (Da Silva *et al*, 2013). Além disso, a taxa de mortalidade por hepatite C parece aumentar neste grupo de pacientes (Amorim *et al*, 2010).

Outros fatores como o uso de bebida alcoólica, obesidade e coinfecção com outros vírus, como o HIV e o vírus da hepatite B (HBV), contribuem para a infecção pelo HCV, além de acelerar a progressão da doença para cirrose (Li *et al*, 2011).

A transmissão do HCV ocorre, portanto, principalmente por via parenteral, mas é importante ressaltar que, em percentual significativo de casos, não é possível identificar a via de infecção (Brasil, 2008).

Assim, apesar dos esforços em conter a epidemia atual, especialmente com a realização de exames específicos em sangue doado, a hepatite C tem grande importância pelo número de indivíduos atingidos e pela possibilidade de complicações da forma aguda a médio e longo prazo quando da cronificação (Brasil, 2008; Brasil, 2011).

O HCV é responsável por aproximadamente 20% dos casos que apresentam *clearance* viral. Estudo tem demonstrado que a depuração espontânea do HCV ocorre em associação com ampla e vigorosa resposta imune celular específica (Bowen & Walker, 2005). No entanto, os fatores que determinam se um paciente responde a infecção ou evolui a infecção crônica ainda não são bem definidos (Burke & Cox, 2010).

De modo geral, a hepatite C aguda é assintomática, motivo esse que dificulta o reconhecimento da infecção nos estágios iniciais da doença (Marques *et al*, 2011).

Uma série de mecanismos pode explicar esse processo assintomático do HCV, incluindo escapar da resposta imune celular e humoral através de uma rápida

evolução do vírus, realizar esgotamento das células T específicas e contribuir para a indução de células T reguladoras (Tang *et al*, 2010).

Os primeiros sintomas de infecção aguda podem se iniciar entre a sexta e décima semana após a exposição ao vírus. Os sintomas envolvem: anorexia, astenia, mal-estar, icterícia, dor abdominal e colúria (Marques *et al*, 2011), o que a torna semelhante às outras hepatites virais, porém o diagnóstico diferencial só é possível com a detecção de anticorpos específicos (Brasil, 2011).

Após a segunda semana, depois da exposição ao HCV, o HCV-RNA poderá ser identificado no soro antes da presença do anti-HCV e de seus níveis máximo entre 10^5 e 10^7 UI/mL, antes mesmo de se atingir o pico dos níveis séricos de alanina aminotransferases (ALT), resultante da necrose do hepatócito, coincidindo com o início dos sintomas (Brasil, 2011).

A fase aguda da hepatite C dura sete meses e é marcada pela elevação das aminotransferases séricas, principalmente ALT independentemente de ser acompanhada pelos sintomas ou não (Ghany *et al*, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, duas situações definem um caso de hepatite C aguda, a primeira quando ocorre soroconversão do anti-HCV em menos de seis meses. A segunda quando o anti-HCV é não reagente e a detecção do HCV-RNA ocorre por volta de 90 dias após os primeiros sintomas, apresentando o paciente histórico de exposição potencial ao vírus. O diagnóstico na fase aguda é de extrema importância e requer a realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a confirmação da infecção, uma vez que infecções agudas podem ser soronegativas (Brasil, 2011).

A infecção aguda pode ser grave, entretanto, a ocorrência de casos de falência hepática fulminante são raros (Ghany *et al*, 2009).

O HCV é um dos principais responsáveis pelo número crescente de hepatite crônica, podendo evoluir para fibrose, cirrose ou em 5% dos casos para hepatocarcinoma (Poynard & Afdhal, 2010; O'Brien *et al*, 2011), além de ser a mais frequente etiologia diagnosticada em casos de transplante hepático (Strauss, 2001). Esses casos são caracterizados por alterações sistêmicas e hipertensão portal, cursando com ascite, hemorragia digestiva alta, varizes esofágicas, encefalopatia hepática e trombocitopenia (Brasil, 2011).

Nos Estados Unidos, a cada ano, ocorrem 30.000 novas infecções, 70% a 80% dos pacientes desenvolvem infecção crônica pelo HCV, levando-os a contraírem

outras complicações no fígado, como carcinoma hepatocelular, bem como, em muitos casos, à morte (Wang *et al*, 2011; Li *et al*, 2011).

De modo geral, 20% a 30% dos portadores de hepatite C crônica desenvolvem cirrose entre 10 e 20 anos de infecção. Esse fato é preocupante pois muitas pessoas infectadas pelo HCV não apresentarão complicações relacionadas a doença ao longo de sua vida, daí a importância de identificação precoce da infecção e do tratamento aos pacientes com risco para possíveis complicações, a fim de diminuir a morbidade e mortalidade (Brasil, 2011).

Recente pesquisa, desenvolveu um modelo de progressão da hepatite C baseado na evolução da fibrose, concluindo que vários fatores podem influenciar a progressão da fibrose, dentre eles, idade superior a 40 anos, sexo masculino, consumo de álcool, coinfeção com outros vírus, como o HBV e/ou HIV, esteatose hepática, resistência insulínica, imunossupressão e atividade necroinflamatória (Poynard & Afdhal, 2010).

Manifestações extra-hepáticas podem também acontecer em associação com a infecção crônica pelo HCV como a crioglobulinemia detectada em 30% a 50% dos pacientes, sendo sua forma mais grave, com presença de artralgias, doença de Raynaud e púrpura em 1% a 5% dos casos. Outras menos frequentes são glomerulonefrite, membranoproliferativa, porfiria cutânea tardia, síndrome de Sjögren, tireoidite autoimune, líquen plano, linfoma de células B, certos tipos de úlcera de córnea e fibrose pulmonar. Assim, segundo o Ministério da Saúde as manifestações extra-hepáticas devem ser consideradas para justificar o tratamento para hepatite C, independentemente da realização de biópsia hepática (Brasil, 2011).

1.2 Resposta imune ao vírus da hepatite C

Quando o organismo é acometido por infecção, seja ela viral, bacteriana ou fúngica a imunidade inata é a primeira linha de defesa na resposta ao hospedeiro (Szabo & Dolganiuc, 2008). Células como os monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), leucócitos, células natural *killer* (NK) e células natural *killer* T (NKT) participam ativamente dessa resposta, detectando o patógeno através de seus receptores de sensoriamento (Hiroishi *et al*, 2010).

As DCs, através da expressão de suas moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas, influenciam a ativação de células T, enquanto que as células NK e NKT

com seus grânulos de perforina e granzimas, executam lise citotóxica das células infectadas e produzem grande quantidade de interferon gama (IFN- γ) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Ashfaq *et al*, 2011).

Os receptores de padrão molecular associado ao patógeno dão início a resposta imune contra o HCV, ativando várias vias de defesa imunológica e contribuindo para a geração de um estado antiviral nas células (Stone *et al*, 2013). Como exemplo, os receptores *Toll* 3 e o ácido retinóico-induzível I reconhecem o HCV, induzindo vias de sinalização que levam à síntese de Interferon alfa e beta (IFN- α e IFN- β), TNF- α , além de uma variedade de outras citocinas como a interleucina-12 (IL-12) e interleucina-15 (Chung *et al*, 2008).

No estágio inicial de infecção pelo HCV, os IFN- α e β produzidos por DCs ativam células NK, melhorando o potencial citotóxico dessas células e estimulando a produção de IFN- γ (Hiroishi *et al*, 2008). IFN- α e β produzido por DCs também modulam a ativação de células T citotóxicas (TCD8⁺) que produzem uma maior concentração de IFN- γ e favorecem o desenvolvimento da resposta imune adaptativa específica para o patógeno (Chung *et al*, 2008), (Figura 3).

A resposta imune adaptativa envolve linfócitos T *helper* (TCD4⁺) e linfócitos TCD8[±] que atuam controlando a infecção pelo HCV e possuem papel essencial na persistência da doença (Gao *et al*, 2010). Os linfócitos TCD8⁺, são mais ativos para a eliminação de células infectadas pelo HCV em relação aos linfócitos TCD4⁺ (Hiroishi *et al*, 2010), entretanto células TCD4⁺ desempenham uma participação crítica durante as infecções virais, influenciando o desenvolvimento de respostas efetoras por células TCD8⁺ (Hammerich *et al*, 2011).

Atualmente, células TCD4⁺ são divididas em quatro subconjuntos principais, células T *helper* 1 (Th1), células T *helper* 2 (Th2), células T *helper* 17 (Th17) e células T reguladoras (Treg), baseadas na expressão de fatores de transcrição e perfil de citocinas secretadas (Hammerich *et al*, 2011).

Estudos sugerem que resposta mais intensa das células Th1 ocorrem no início da infecção pelo HCV, contribuindo para o *clearance* viral (Diepolder *et al*, 1995; Heller *et al*, 2005). Em contraste, o desenvolvimento da infecção crônica mostra predominância da resposta de células Th2 (Yue *et al*, 2013). Tais achados indicam que a capacidade de montar uma resposta celular imune eficiente é o principal mecanismo responsável pelo controle do HCV, enquanto que uma desregulação nesta resposta favorece a persistência viral, culminando na cronicidade da doença (Abayli *et al*, 2003). Os principais mediadores biológicos, nesta resposta imune, são

citocinas; peptídeos de baixo peso molecular, produzidos por uma grande variedade de células, principalmente Th1 e Th2 (Bruno *et al*, 2011).

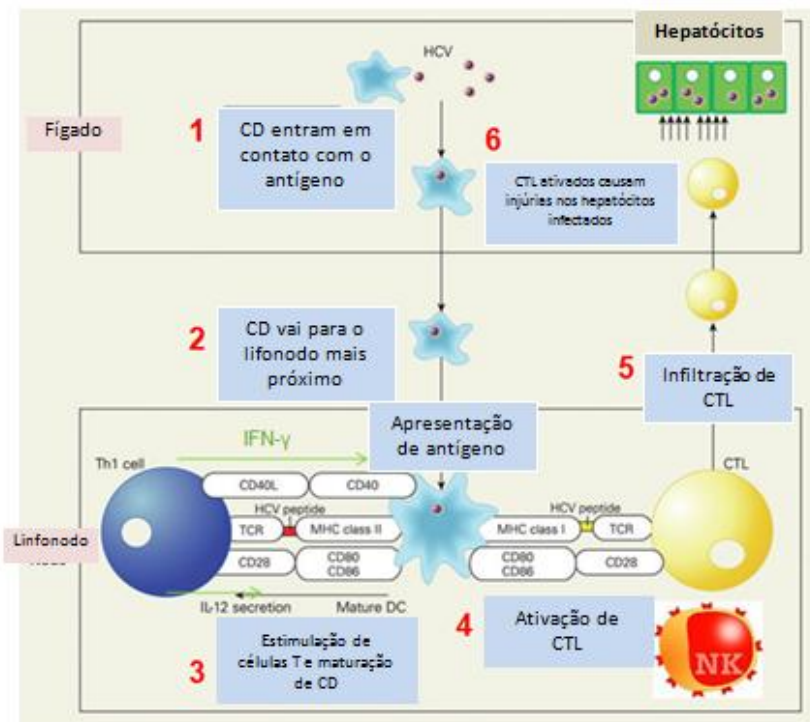


Figura 3. Resposta imune ao HCV. Após o contato com os antígenos do HCV no fígado, as DCs movem-se para o linfonodo mais próximo. O amadurecimento da DC ativa as células Th *naive* através da estimulação do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC II) e moléculas co-estimulatórias, CD80 e CD86. Células Th estimuladas ativam ainda mais DCs através de CD40, bem como a secreção de TNF. A IL-12, produzida por CDs diferencia células Th em células Th1. IL-2 e IFN-γ secretados pelas células Th1 ativadas induzem a ativação e proliferação de células NK e CTL. Como continuação desse processo, CTL reconhecem antígenos do HCV e seguem para o fígado. Os CTLs reconhecem os antígenos do HCV em conjunto com o complexo de histocompatibilidade classe I (MHC I) na superfície dos hepatócitos infectados, destruindo-os. Adaptado de Hiroishi *et al* 2008.

Citocinas são exemplo de produtos da resposta do hospedeiro à inflamação e desempenham um papel importante na defesa contra infecções virais (Talaat *et al*, 2012). Elas são capazes de reconhecer células infectadas por vírus e regular a intensidade da resposta inflamatória e imunológica direta ou indiretamente. Além disso, relatos indicam que a infecção pelo HCV causa produção de níveis inadequados de citocinas, estando este fato associado, possivelmente, com a persistência do vírus ou falha da terapia antiviral (Bruno *et al*, 2011). Assim, tornou-se mais clara e indispensável a importância do estudo de citocinas, em particular citocinas expressas pelos leucócitos do sangue periférico (Sharma *et al*, 2009), e da resposta imune celular na erradicação do HCV (Cheikhrouhou *et al*, 2011).

As citocinas promovem o desenvolvimento de células T, principalmente células Th1 e são de particular interesse para o melhoramento de técnicas imunoterápicas contra o HCV (Sharma *et al*, 2009).

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória de perfil Th1, necessária para a ativação de macrófagos envolvidos na imunidade contra patógenos intracelulares (Hammerich *et al*, 2011). A IL-12 agindo em sinergia com o TNF- α pode também estimular a produção de grandes quantidades de IFN- γ pelas células NK, sendo esse IFN- γ crucial no controle da infecção, antes que células TCD8⁺ sejam ativadas e produzam mais citocinas (Murphy *et al*, 2010).

A interleucina-2 (IL-2) está presente durante o processo de diferenciação de células Th e é expressa principalmente em células Th1. A IL-2 também promove ativação de células TCD8 (Hiroishi *et al*, 2010).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina importante na resposta imunológica à infecções, sendo produzida por diferentes tipos celulares, incluindo hepatócitos, macrófagos, células B e células T. A IL-6 desempenha papel relevante na fase aguda da infecção pelo HCV, sendo responsável pelo equilíbrio entre as vias pró e anti-inflamatórias (Giannitrapani *et al*, 2013), assim como, pela resposta à terapia para interferon (Yee *et al*, 2009). Altos níveis circulantes de IL-6 têm sido documentados em várias doenças do fígado, por exemplo: hepatite crônica viral (Spanakis *et al*, 2002), doença hepática alcoólica, cirrose e câncer hepático (Soresi *et al*, 2006).

O TNF- α é uma potente citocina antiviral comum a ampla gama de atividades pró-inflamatórias, desempenhando papel crucial na resposta imune ao hospedeiro na infecção pelo HCV (Fallahi *et al*, 2012). A própria infecção viral induz a produção de TNF- α em hepatócitos humanos, através de linfócitos TCD8⁺ que potencializam essa ação, porém acredita-se que a concentração de TNF- α circulante geralmente é maior durante a fase aguda da infecção pelo HCV (Osburn *et al*, 2013). Uma concentração exacerbada de TNF- α , correlaciona-se com uma inflamação hepática grave, fibrose e lesão tecidual. A persistência da citocina na resposta imune pode iniciar um processo, eventualmente, conhecido como câncer hepático (Talaat *et al*, 2012).

As células Th17 participam do processo inflamatório e destruição dos tecidos. Atualmente tem crescido o interesse em suas origens, desenvolvimento e funções afim de conhecer seus efeitos patológicos (Lin *et al*, 2010). Acredita-se que respostas mais fortes de Th17 estão associadas ao aumento da carga viral

(Hammerich *et al*, 2011). A IL-17A é a citocina mais estudada desse grupo, principalmente em processos inflamatórios que envolvem doenças do fígado (Crome *et al*, 2010).

No caso da hepatite C, observa-se uma estreita relação entre a inflamação desenvolvida, através do aumento da produção de IL-17A, e os danos causados ao fígado (Mills, 2008). Estudos demonstram que a estimulação com IL-17 induz a expressão de vários genes, quimiocinas e proteína C reativa, estes, portanto, estão associados ao processo de inflamação (Sparna *et al*, 2010). Este efeito pode ser potencializado pela adição de TNF- α (Hammerich *et al*, 2011) e reduzido por terapia antiviral com interferon peguilado e ribavirina, em pacientes infectados com HCV (Jimenez-Sousa *et al*, 2010).

As células Tregs são caracterizadas pela expressão de fatores de transcrição como o Foxp3, STAT5 e CD25 em sua superfície (Fontenot *et al*, 2003). Essas células são responsáveis por manter a homeostase e controlar respostas imunes excessivas, participando na supressão da imunidade celular antiviral contra o HCV (Hammerich *et al*, 2011). Quando ativadas as Tregs produzem citocinas anti-inflamatórias como Interleucina-10 (IL-10) e Fator de Crescimento Tumoral- β (TGF), suprimindo o desenvolvimento funcional das reações imunes (Hall *et al*, 2010). De fato, um aumento no número e funcionalidade das Tregs tem sido detectado em pacientes com hepatite C crônica. No entanto, essa frequência ainda não foi totalmente definida (Hall *et al*, 2010).

A IL-10 é uma citocina que atenua a resposta inflamatória, pois influencia na proliferação de células T e suas citocinas. Devido sua ação imune, constatou-se que concentrações inadequadas de IL-10 podem determinar, a longo prazo, o escape de patógenos do controle imunológico e dar origem a infecções persistentes (Couper *et al*, 2008). Outro estudo sugere que a IL-10 contribui para reduzir os efeitos patogênicos da infecção pelo HCV, por amenizar a resposta imune e favorecer a erradicação do vírus (Bruno *et al*, 2011).

Apesar do desenvolvimento de uma resposta imunológica eficaz, o HCV consegue interferir na resposta imune inata e adaptativa através de várias maneiras, resultando em sua persistência viral no organismo. Assim, o vírus utiliza meios de modificar vias de sinalização que produzem interferon, vias de ativação das proteínas NS3/NS4A e vias de tradução de fator de regulação do interferon (IRF) (Ashfaq *et al*, 2011).

O vírus da hepatite C induz a expressão de SOCS-1/3, através da proteína *core*, bloqueando a sinalização de transdução de sinal e ativador da transcrição (STAT), através dos receptores de IFN- α/β , levando a degradação, e portanto inibição da ativação e translocação de STAT (Lin *et al* 2006). O vírus também inibe a expressão do receptor de proteína quinase (PKR), uma das funções das células NK, através das proteases NS5A e E2, promovendo o rompimento, do controle translacional e ações de sinalização de PKR (Crotta *et al*, 2002). A protease NS5A induz a produção de IL-18, uma citocina que inibe as ações antivirais do IFN, atenuando a expressão de IRF (Polyak *et al*, 2001).

As várias mutações genéticas sofridas pelo HCV também constitui-se como uma das principais estratégias de evasão. Primeiramente, a falta de revisão do RNA dependente da RNA-polimerase, além da elevada taxa de replicação do vírus favorecem o surgimento de mutações nas partículas virais. Alterações nas seqüências da região hipervariável da glicoproteína de envelope E2, resultam em escape pelos epítomos das células B (Ashfaq *et al*, 2011); substituições de aminoácidos do vírus inibem o reconhecimento por células T, tendo sido essa estratégia observada em pacientes infectados cronicamente pelo HCV (Frasca *et al*, 1999). Outro importante mecanismo possível de evasão imunitária, é a inibição funcional de células T específicas ao vírus. Células TCD8⁺ podem ser prejudicadas em sua capacidade proliferativa, citotoxicidade e capacidade de secretar TNF- α e IFN- γ (Spangenberg *et al*, 2005).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico etiológico só é possível por meio da realização de exames sorológicos, para detecção de anticorpos específicos, cuja sensibilidade tem aumentado progressivamente, e/ou de biologia molecular para detecção do genoma viral (Brasil, 2008).

A presença de anticorpos anti-HCV em pacientes infectados pelo vírus deu origem ao desenvolvimento de testes imunossorológicos específicos (Lopes *et al*, 2000). O principal método diagnóstico para a hepatite C continua sendo a sorologia para anti-HCV pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* de terceira geração (ELISAIII). No entanto, ensaios anti-HCV têm limitações, incluindo a falta de sensibilidade de detecção nos períodos iniciais, de 45 a 68 dias após a infecção, embora os ensaios mais recentes sejam mais específicos através da recombinação

de vários antígenos encontrados em diferentes regiões do genoma do HCV (Park *et al*, 2010).

Outros ensaios imunoenzimáticos, como os testes rápidos, aos poucos estão sendo implementados em laboratórios e instituições públicas de saúde, como diagnóstico inicial e meio de triagem para suspeita de infecção pelo HCV. Esses testes são de fácil manuseio e apresentam resultado que pode ser interpretado no máximo em 20 minutos, diminuindo o tempo de espera pelo diagnóstico e favorecendo o início do tratamento.

A presença de anti-HCV, entretanto, não define a presença de infecção ativa e o resultado deve ser confirmado por testes moleculares (Menegazzi *et al*, 2008), além disso, pacientes imunossuprimidos também podem não apresentar sorologia reagente, pela diminuição ou falta de anticorpos (Batts & Ludwig, 1995), necessitando de um diagnóstico molecular.

O diagnóstico molecular é essencial para a confirmação da persistência e também monitoramento da infecção pelo HCV, além de verificar se houve sucesso ou falha da terapia (Colucci, 2012). As vantagens desses testes incluem: a possibilidade de confirmação de diagnóstico precoce, diagnóstico da infecção em pacientes imunossuprimidos e confirmação da infecção ativa. Além disso, esses testes são usualmente utilizados em estudos epidemiológicos que utilizam dados de genotipagem (Vieira *et al*, 2011).

O NAT, por exemplo, é uma tecnologia desenvolvida para a detecção precoce do ácido nucléico do HCV, em bolsas de sangue destinadas à transfusão. A implementação do NAT foi iniciada em 2010 na rede de Serviços de Hemoterapia do Brasil. No entanto, pela falta de estrutura nos laboratórios de serviços de hemoterapia do país e profissionais capacitados para lidarem com a técnica, apenas os estados como os de Santa Catarina e Rio de Janeiro já utilizam esse procedimento em seus hemocentros (Brasil, 2010).

A detecção do HCV-RNA identifica uma infecção de semanas ou meses antes de uma resposta de anticorpos detectáveis, permitindo a caracterização de seus genótipos e subtipos; podendo estes testes serem qualitativos, quando detectam apenas RNA viral, ou quantitativos, quando quantificam esse RNA (Menegazzi *et al*, 2008; Al Balwi, 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores (Higuchi *et al*, 1993). O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional, entretanto, as

fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas e ocorrem simultaneamente, possibilitando a quantificação em tempo real do DNA (Ácido desoxirribonucléico) amplificado em cada ciclo (Colucci, 2012). O desenvolvimento de sondas e a descoberta de que a Taq polimerase possui atividade exonuclease 5'-3' contribuíram para o aperfeiçoamento da técnica (Holland *et al*, 1991).

A qPCR também apresenta três fases características: fase de crescimento exponencial, que mostra a relação entre a quantidade de produto e do DNA; fase de crescimento linear, os produtos da reação são consumidos e fase estacionária, apresenta a degradação dos produtos da qPCR.

A qPCR requer, além de uma plataforma de instrumentação que contenha um termociclador, um sistema óptico para a excitação da fluorescência e coleta da emissão e um computador com um software para a aquisição de dados e análise final da reação (Novais *et al*, 2004). Reagentes fluorescentes ajudam neste processo, permitindo que a amplificação possa ser medida através de um detector de fluorescência em conjunto com o termociclador, enquanto a reação ainda está em curso, estes reagentes fluorescentes podem ser de sequências específicas ou não. Sequências reagentes específicas incluem, sondas 5' nuclease, primers, sondas, Taq DNA polimerase, moléculas sinalizadoras, sondas hibridizadoras ou fluorescentes e sondas *Scorpions* (Sabel, 2011).

Assim, durante a fase exponencial da reação, a emissão dos compostos fluorescentes aumenta na proporção direta da quantidade de produto da qPCR, sendo os valores da fluorescência gravados em cada ciclo (Novais *et al*, 2004).

Dessa forma, a qPCR tem a vantagem de medir o número de cópias de partida e detectar pequenas diferenças nos níveis de expressão entre as amostras, isso através da curva de amplificação, reduzindo o tempo de processamento e as chances de contaminação das amostras (Novais *et al*, 2004).

Recentemente, ensaios baseados em qPCR têm sido introduzidos em diagnósticos de rotina e estão substituindo PCR tradicionais e ensaios baseados em sinais de amplificação (Vermehren *et al*, 2008).

Para determinar o tipo viral, o sequenciamento de diferentes regiões do genoma do HCV podem ser analisadas. Essa técnica utiliza primers específicos e sondas (Colucci, 2012).

A região 5'UTR, é a região mais escolhida para a detecção do RNA-HCV nos testes diagnósticos, em decorrência do seu elevado grau de conservação (Torres *et*

al, 2009; Cavalheiro 2010), entretanto, não permite discriminação suficiente entre os diferentes subtipos dos genótipos do HCV, por ser uma região de menor divergência entre os diferentes genótipos do vírus, o que pode acarretar dificuldades no reconhecimento de subtipos, principalmente 1a e 1b (Silva, 2003; Amorim *et al*, 2010), ficando a capacidade de discriminação em torno de 75% (Halfon *et al*, 2001).

O sequenciamento de uma região de codificação apropriada, no entanto, pode ser melhor distinguida entre os diferentes genótipos através das regiões C, E1 e NS5B (Simmonds *et al*, 1994).

Atualmente, a região NS5B tem sido escolhida para a discriminação de tipos e subtipos do HCV (Cavalheiro *et al*, 2010; Nakatani *et al*, 2010). A região NS5B é responsável por codificar a RNA-polimerase dependente de RNA, enzima responsável pela síntese de novas fitas de RNA durante o processo replicativo do HCV. Esta região apresenta diferenças significativas na sequência nucleotídica dos diferentes genótipos, permitindo a classificação precisa entre os mesmos (Nakatani *et al*, 2010; Fiocruz, 2012).

1.4 Tratamento e prevenção

O padrão atual de tratamento para a hepatite C está baseado no uso de interferon peguilado associado à ribavirina. Essa terapia apresenta resultados bastante positivos (Brasil, 2012). No entanto, as taxas de resposta virológica sustentada (RVS) em 80% dos pacientes com genótipo 2, 3, 5 e 6 e 40%-50% em pacientes com genótipo 1 e 4, além dos vários efeitos adversos (Zeng *et al*, 2013), incentivaram o desenvolvimento de outros tratamentos alternativos (Aman *et al*, 2012).

Recentes estudos de associação genômica, encontraram polimorfismos de nucleotídeo único localizados no gene de IL28B que são preditivos de RVS após terapia com interferon- α peguilado e ribavirina (Cieśła *et al*, 2012). O estudo do polimorfismo da IL28B, no entanto apresenta-se ainda limitado e a importância da busca do conhecimento em relação a esse gene pode auxiliar na decisão de iniciar ou protelar o tratamento (O'Brien *et al*, 2011).

Nos últimos anos, ensaios clínicos utilizando agentes antivirais de ação direta contra o HCV têm mostrado que os inibidores de protease (IP) são uma estratégia eficaz para o tratamento da infecção (Aman *et al*, 2012). Boceprevir e Telaprevir foram os primeiros IP registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária,

permitindo sua introdução no arsenal terapêutico nacional para tratamento do HCV (Brasil, 2012). Essas duas medicações apresentam moléculas diferentes e atuam inibindo a enzima protease serina NS3 do HCV, agindo diretamente sobre o vírus através do bloqueio da sua replicação. Ambos são utilizados em associação com interferon- α peguilado e ribavirina, constituindo assim uma terapia tripla (Shi & Ploss, 2013). Novos regimes terapêuticos, como Sofosbuvir e ABT-450, têm mostrado resultados promissores para futuros tratamentos de hepatite C (Zeng *et al*, 2013).

Uma opção moderna e eficaz no combate a hepatite C, tem sido o tratamento conhecido como Terapia Tripla (TT). Essa terapia combina interferon peguilado, ribavirina e IP e o resultado ampliou a taxa de cura de 80%, além de que o tratamento que era de 48 semanas passa a ocorrer em 24 (Alexopoulou & Papatheodoridis, 2012). O benefício da TT, entretanto foi demonstrado apenas em pacientes portadores do genótipo 1, pacientes com outros genótipos, populações especiais ou ainda aqueles com comprometimento grave da função hepática continuam com tratamento de interferon peguilado e ribavirina (Akiyama *et al*, 2013; Maasoumy *et al*, 2013). É importante ressaltar que essa nova terapia, apesar dos vários efeitos colaterais adversos, já ocorre em países desenvolvidos, a Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado, por exemplo, revisou suas recomendações para o tratamento de pacientes do genótipo 1 do HCV para incluir TT (Ghany *et al*, 2011). No Brasil, a falta de assistência estruturada para acolher todos os pacientes e o elevado custo dos novos medicamentos, são os principais fatores que impedem a TT de ser prontamente adotada como política pública de saúde para o combate à hepatite C.

Em geral, a vacinação tem sido considerada como o método mais eficaz para o combate de doenças infecciosas. Em relação a hepatite C, o desenvolvimento de uma vacina para o HCV, já ocorre há mais de duas décadas de pesquisa, e é dificultado por vários desafios: a enorme diversidade genética do vírus, a RNA polimerase altamente propensa a erros e aos mecanismos de escape da resposta imune. Apesar disso, vacinas profiláticas, vacinas terapêuticas, abordagens sobre profilaxia passiva e imunoterápicas para o HCV tem sido investigado nos últimos anos, a fim de contribuir para a obtenção de uma vacina, com efeitos colaterais reduzidos, contra todos os genótipos, administrada em única dose e distribuída a um custo mínimo (Yamasaki *et al*, 2012; Shi & Ploss, 2013).

1.5 Epidemiologia da hepatite C

Uma das principais formas utilizadas em estudo de prevalência do HCV é por meio de pesquisas de soroprevalência, principalmente em pré-doadores de sangue, populações específicas, estudos-sentinela e menos frequentemente em pesquisas de base populacional (Brasil, 2011). No entanto, por se tratar de uma população específica, estudos em doadores de banco de sangue, podem não representar, de forma minuciosa, a verdadeira prevalência da doença (Martins *et al*, 2011; Nguyen & Nguyen, 2013). Tal fato ocorreu nos Estados Unidos na década de 90, onde estudos envolvendo apenas doadores sanguíneos apresentaram uma prevalência de infecção pelo HCV de 0,6%, enquanto estudos envolvendo a população geral apresentaram uma prevalência de 1,8% (Alter *et al*, 1999).

Apesar de estudos populacionais com amostras representativas serem mais adequados, eles também possuem maior complexidade e custo elevado e não podem ser executados na maior parte das regiões do mundo (Alter *et al*, 1999). Por tudo isso, as estimativas apontam para uma prevalência global de 2% a 3%, ou seja, cerca de 170 milhões de indivíduos infectados pelo HCV em todo o mundo (Perz *et al*, 2004).

Embora a infecção pelo HCV seja considerada uma endemia mundial, existe uma grande variação geográfica de sua distribuição. No Reino Unido e Escandinávia a prevalência varia em torno de 0,01% a 0,1%. Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul possuem prevalência entre 0,2% a 0,5%. Outros países com prevalência intermediária incluem Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia, Europa Oriental, partes da África e Ásia e também o Brasil (Martins *et al*, 2011).

O Egito possui alta prevalência de infecção pelo HCV, entre 5% e 85%, dependendo da população estudada (Mohamoud *et al*, 2013), esse alto índice pode ser explicado, principalmente, pelo uso de seringas de vidro contaminadas na década de 70 durante campanhas nacionais de tratamento da esquistossomose (Frank *et al*, 2000). Países como a Mongólia, Hubei e Paquistão apresentam também alta prevalência pelo HCV em 31,9%, 30,1% e 8% respectivamente (Butt *et al*, 2011; Sawada *et al*, 2011).

A importância do conhecimento da prevalência do HCV em diferentes localidades, pode permitir maior eficácia das ações de prevenção e controle da doença (Martins *et al*, 2011).

Com relação à prevalência da infecção pelo HCV por faixas etárias, existem poucos estudos relacionados a esses dados e esses demonstram variações não apenas regionais, mas temporais (Yen *et al*, 2003).

Na Austrália, estudos sobre o HCV revelaram maior prevalência entre 30 e 39 anos e menor índice em pessoas abaixo de 20 e acima de 50 anos, especulando-se que nesse caso as maiores taxas de transmissão tenham ocorrido entre 10 a 30 anos atrás (Wasley *et al*, 2000). Por outro lado, países como Turquia, Espanha, Itália, Japão e China possuem pessoas infectadas com uma faixa etária acima de 50 anos, o que pode indicar um risco de infecção em um passado mais distante entre 40 a 60 anos (Wasley *et al*, 2000).

No Brasil, o Sistema de Informação de Agravos e Notificação registrou entre 1999 e 2009, 60.908 casos confirmados de hepatite C, destes, 37.147 eram do gênero masculino e 23.748 do gênero feminino. A faixa etária predominante esteve entre 30 a 59 anos entre os homens, seguido de 40 a 59 anos entre as mulheres, embora entre os anos de 2008 e 2009 a faixa etária entre 50 e 59 anos foi a mesma para ambos os sexos (Boletim epidemiológico, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para a hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10% (WHO, 2003). Entretanto, dados mais recentes como o Inquérito Nacional de Hepatites Virais 2010, realizado em todas as capitais brasileiras, baseado em um estudo epidemiológico, socioeconômico e biológico, com uma população alvo entre 10 e 69 anos para hepatite C, mostrou uma média de prevalência nacional anti-HCV de 1,38%. A prevalência anti-HCV nas diferentes regiões brasileiras foi: Norte, 2,1%; Nordeste, 0,7%, Centro-Oeste, 1,3%; Sudeste, 1,3%, Sul, 1,2% e Distrito Federal, 0,8% (Figura 4). Assim, de acordo com esses dados epidemiológicos, a região Norte apresentou maior prevalência pelo HCV (Universidade de Pernambuco, 2010).

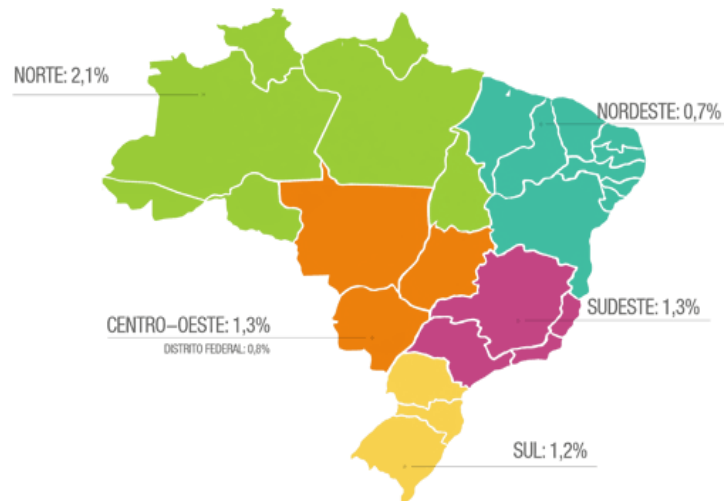


Figura 4. Inquérito Nacional de Hepatites Virais, Universidade de Pernambuco, 2010. Prevalência de anti-HCV nas diferentes regiões brasileiras: na Região Norte, 2,1%, no Nordeste, 0,7%, no Centro-Oeste, 1,3%, no Sudeste, 1,3%, no Sul, 1,2% e no Distrito Federal, 0,8%.

Estudos oficiais sobre a prevalência do HCV na Região Norte são ainda bastante limitados. Os maiores índices de hepatite C, baseados em pré-doadores de sangue, podem ser observados em Estados como o Acre, com prevalência muito alta em torno de 5,9%, Pará com até 2%, Rondônia com 1,2% e o Amazonas com 0,8% (SBH, 1999), (Figura 5).

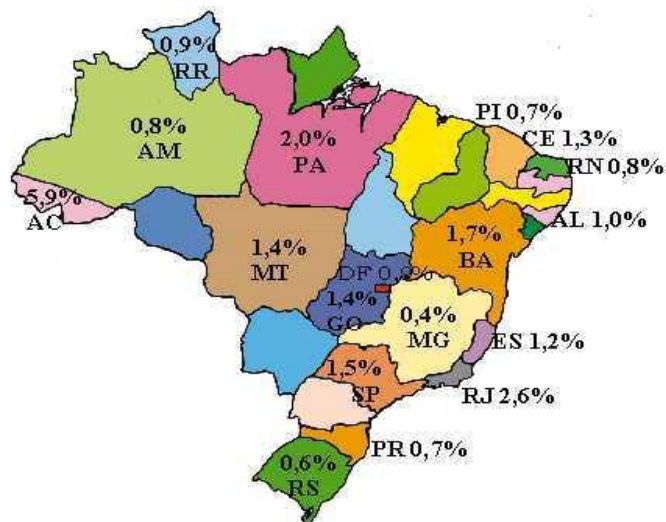


Figura 5. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia, 1999. Prevalência da soropositividade para o HCV, em doadores de sangue, nos diferentes estados brasileiros.

No Amazonas, a literatura publicada até o momento, tem demonstrado diferentes prevalências da hepatite C, o que pode sugerir uma distribuição irregular da infecção, dependendo do grupo populacional em estudo.

De Paula *et al* constataram prevalência do HCV de 1,7% em comunidades ribeirinhas dos rios Acre e Amazonas (De Paula *et al*, 2001). Pesquisa realizada em 397 frequentadores do Parque Municipal do Idoso, da Prefeitura Municipal de Manaus, encontrou sorologia anti- HCV reativa em 1,5% dos voluntários (Mubarac *et al*, 2009). Nesse mesmo período, De Paula *et al* realizaram estudo de soroprevalência da hepatite C em manicures na cidade de Manaus. Foram incluídos no estudo dados coletados de 150 manicures, de 35 salões de beleza, distribuídos nas cinco zonas demográficas, entre agosto de 2009 e julho de 2010, não sendo detectado nenhum caso positivo (De Paula *et al*, 2010).

Maia *et al* realizaram um estudo retrospectivo, entre março de 2006 e janeiro de 2007, em 395 pacientes sob terapia para substituição renal, ou seja, hemodiálise, em Manaus. A soroprevalência anti-HCV encontrada foi de 13,9% (55 pacientes). Na análise pré-hemodiálise, constatou-se que dos 55 pacientes anti-HCV positivos, 12 (21,8%) já haviam iniciado as sessões de hemodiálise com reatividade positiva para o anti-HCV, enquanto 43 (78,2%) apresentaram soroconversão durante a hemodiálise, resultando na elevada prevalência da infecção. Assim, mesmo sob cuidados médicos e o uso rigoroso de estritas normas de segurança, a hemodiálise ainda representa um fator de risco agravante para a transmissão do HCV (Maia *et al*, 2009).

Braga *et al* estimaram a prevalência de coinfeção do HIV com HCV, usando dados de rastreio de rotina em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Dos 704 indivíduos participantes, 35 apresentaram anti-HCV positivo, como resultado a prevalência de coinfeção HIV/HCV foi 5%, estando essa prevalência associada em 28,6% com o uso de drogas ilícitas (Braga *et al*, 2006).

A importância de se genotipar o HCV, em pacientes com confirmação da infecção é essencial, pois complementa a avaliação clínico-laboratorial, contribui para o estudo epidemiológico, além de definir a estratégia de tratamento da doença. Dessa forma, segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfeções, a genotipagem do HCV é obrigatória para candidatos ao tratamento, já que o mesmo é definido de acordo com o genótipo encontrado (Brasil, 2011).

A genotipagem do HCV pode ser então utilizada para prever a resposta do vírus a terapia antiviral, isso ocorre devido ao diferente potencial biológico dos genótipos do HCV. Por exemplo, pacientes portadores de genótipo 1 e 4 respondem menos ao tratamento com o IFN do que os portadores do genótipo 2 e 3 (Pawlotsky,

2003). Dessa forma, para cada genótipo, existe uma diferente forma de tratamento e resposta, conseqüentemente uma terapia diferencial (Sy & Jamal, 2006).

Atualmente, o genótipo 3 vem sendo alvo de vários estudos que demonstram a resistência desse genótipo ao tratamento e o potencial agressivo em relação a velocidade da formação de fibrose e cirrose. Estudo realizado por Nkontchou *et al* em 353 pacientes infectados com diversos genótipos do HCV durante cinco anos e meio, demonstrou que 44% dos pacientes infectados com o genótipo 3 com cirrose e infecção em curso desenvolveram câncer no fígado contra 26% dos pacientes infectados com outros genótipos nas mesmas condições, sugerindo o genótipo 3 como o genótipo de maior probabilidade de desenvolvimento de câncer no fígado e a possibilidade de indivíduos portadores do mesmo receberem o tratamento o quanto antes possível (Nkontchou *et al*, 2011).

A prevalência dos genótipos do HCV pode também estar associada com o meio de transmissão da infecção; por exemplo, infecções com os subtipos 1a e 3a estão significativamente associadas com o uso abusivo de drogas intravenosas (Santos *et al*, 2011), grupos de risco específicos (Simmonds, 2004), progressão e terapia da doença (Pawlotsky, 2003) ou ainda diferentes áreas de uma região ou país (Campiotto *et al*, 2005).

Na América do sul e na região do Caribe, o genótipo 1 é o mais prevalente, seus subtipos 1a e 1b são os mais comuns nos Estados Unidos e norte da Europa; no Japão, o subtipo 1b é responsável por 75% das infecções pelo HCV. O genótipo 2 é o mais comum na América do Norte e Europa, sendo os subtipos 2a e 2b os mais frequentes. O genótipo 3 é mais frequente na Índia. Nos Estados Unidos e Europa os subtipos 3a e 1a são os mais frequentes em usuários de drogas, enquanto o subtipo 1b acredita-se está ligado em pacientes submetidos à transfusão sanguínea. O genótipo 4 é o predominante na África e no Oriente Médio. Os genótipos 5 e 6 são raros de ser encontrados e geralmente prevalecem em regiões isoladas como a África do Sul e Hong Kong respectivamente (Simmonds, 2004). Recentemente, a descoberta de um novo genótipo, classificado como genótipo 7, ocorreu por um grupo de pesquisadores da África Central (Murphy *et al*, 2007), (Figura 6).

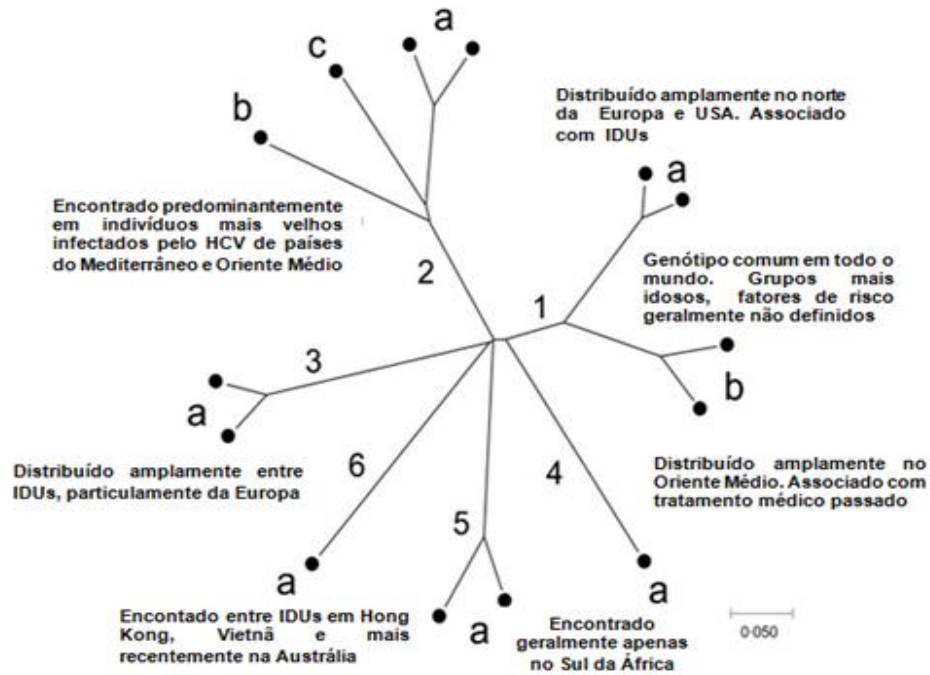


Figura 6. Árvore evolutiva dos principais genótipos do HCV que são encontrados em países industrializados e suas principais associações epidemiológicas com os diferentes genótipos. Acredita-se que estes fatores de risco específicos para o HCV, tornaram-se predominantes ao longo do século 20. A árvore foi construída usando o método de neighbor-joining, utilizando distâncias Jukes-Cantor. Adaptado de Simmonds 2004.

No Brasil, baseado em estudos epidemiológicos e moleculares, os genótipos 1, 2 e 3 são os que apresentam maior predominância. O genótipo 1 é o mais encontrado com 60% de prevalência seguido por 40% dos genótipos 2 e 3 (Focaccia *et al*, 2004; Shi & Ploss, 2013). Um estudo realizado por Campiotto *et al* sobre a distribuição de genótipos em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, mostrou a ocorrência de 64,9% do genótipo 1, 4,6% do genótipo 2, 30,2% do genótipo 3, 0,2% do genótipo 4, e 0,1% do genótipo 5. Em todas as regiões, o genótipo 1 foi o mais frequente, principalmente na região norte. Já o genótipo 2 foi mais prevalente na região centro-oeste, enquanto que o genótipo 3 foi mais comum na região sul. Os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados (Campiotto *et al*, 2005).

Em regiões do Sul, foi encontrada maior prevalência dos genótipos 1 e 3. Estudos realizados em diversos estados brasileiros como Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais mostraram a predominância do genótipo 1, com prevalência de 70% (Brasil, 2011).

Na região do Distrito Federal, um estudo com pacientes em hemodiálise constatou cerca de 90% dos casos com teste anti-HCV positivo a ocorrência do genótipo 1 e, em 9,8% o genótipo 3 (Amorim *et al*, 2010). No estado do Mato Grosso

do Sul ocorre também a predominância do genótipo 1, principalmente subtipo 1a, e essa estatística é confirmada tanto em estudos com doadores de sangue como em pacientes em hemodiálise (Freitas *et al*, 2008).

No Nordeste, estados como a Bahia, apresentam genótipo 3 com maior frequência (Zarife *et al*, 2006). Em Sergipe, estudos apontam para a ocorrência dos genótipos 1 e 3, sendo o genótipo 1 de maior prevalência, com 90% dos casos da infecção (Santos *et al*, 2011).

A concentração de estudos epidemiológicos concernentes a distribuição de genótipos na região Norte ainda é rara e baseada na variedade de casos de pessoas encontradas com o HCV nos estados do Acre, Pará e Amazonas (Oliveira-Filho *et al*, 2010). No Acre, os genótipos mais comumente identificados estão em pacientes com hepatite C crônica e com a saúde comprometida, no Amazonas, principalmente em pacientes com hepatite C crônica e no Pará em doadores sanguíneos. Em todos esses estados, o genótipo 1 é o de maior prevalência, com 78% de predominância no Acre (Paraná *et al*, 2007), 64% no Amazonas (Capiotto *et al*, 2005) e 93% no estado do Pará (Oliveira-Filho *et al*, 2010).

Torres *et al* encontraram prevalência do genótipo 1 (87,1%), seguido do 3 (12,9%) na população de doadores de sangue do Estado do Amazonas, não sendo detectados os demais genótipos (Torres *et al*, 2009).

Entretanto, estudos como o trabalho envolvendo genótipos do vírus do HCV, realizado em 69 pacientes portadores de hepatite C crônica, cadastrados no ambulatório da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, mostrou prevalência do genótipo 1 (76,1%), seguido do genótipo 3 (19,6%) e 2 (4,3%) (Araújo *et al*, 2011).

As diferenças apresentadas pelos genótipos do HCV têm sido portanto, consideradas como parâmetro epidemiológico, permitindo marcar o curso da infecção em uma dada população (Torres, 2008).

2. Justificativa

O Brasil ao reconhecer a hepatite C como um dos mais graves problemas de saúde pública, apresentou durante a 63ª Assembleia Mundial de Saúde em 2010, a média de casos notificados para a hepatite C: 6,6 por 100 mil habitantes, confirmando o impacto da doença no país. Porém, ainda são necessários mais estudos e informações sobre o HCV para a população geral, divulgando a importância da prevenção e realização de exames específicos para diagnosticar a infecção, precocemente, uma vez que a hepatite C é uma doença silenciosa, além de que, até o presente momento, não existe vacina.

A região Norte do Brasil apresenta a maior prevalência pelo HCV, segundo dados atuais do Inquérito Nacional de Hepatites Virais realizado em todas as capitais brasileiras. Nesse estudo, a prevalência estimada foi de 2,1%, acima da média nacional de 1,38%, sendo incluídos voluntários de Manaus, Amazonas.

No Amazonas, as informações sobre a prevalência da hepatite C ainda são escassas, com dados oriundos principalmente da população de doadores de sangue.

Após adquirirem o HCV, a maioria das pessoas desenvolve infecção crônica, podendo apresentar quadro evolutivo para cirrose e câncer hepático. No entanto, essa evolução é variável entre os portadores do HCV, sendo influenciada por fatores virais, como genótipo e carga viral, além de fatores do hospedeiro, como a resposta imunológica. A importância de se analisar o perfil de citocinas, em pacientes infectados pelo HCV, contribui para ampliar o conhecimento da fisiopatogenia da doença, podendo identificar um perfil imunológico associado à infecção.

Estudos moleculares sobre o HCV, permitem comprovar a presença do vírus, mesmo em quantidades mínimas de RNA, além de ser útil para caracterizar os principais genótipos, influenciando na escolha do esquema terapêutico e contribuindo para o conhecimento epidemiológico da doença.

O município de Iranduba faz parte da região metropolitana de Manaus, que passa atualmente por prosperidade e investimentos sociais, após a viabilização terrestre que liga o município à capital do Amazonas.

Diante do exposto, este trabalho realizou um estudo epidemiológico, virológico e imunológico para o HCV em voluntários infectados pelo HCV do município de Iranduba, possibilitando a oportunidade de diagnóstico àqueles que não conheciam sua condição sorológica, além de orientação quanto ao possível tratamento,

contribuindo para a qualidade de vida dessas pessoas. O estudo também contribui com registros epidemiológicos no Estado do Amazonas.

3. Objetivos

3.1 Geral

Caracterizar o perfil epidemiológico, virológico e imunológico de voluntários infectados pelo HCV residentes no município de Iranduba.

3.2 Específicos

1. Estimar a prevalência da hepatite C no município em estudo;
2. Identificar fatores de risco para infecção pelo HCV;
3. Caracterizar os genótipos encontrados nos voluntários positivos no teste qPCR;
4. Analisar o perfil de citocinas em pacientes com qPCR positiva.

4. Metodologia

4.1 Tipo do estudo

O trabalho realizado é de caráter descritivo transversal, com delineamento tipo detecção de casos.

4.2 Área de estudo

O estado do Amazonas está localizado na região norte do Brasil e apresenta uma população de 3.590.985 habitantes, correspondente a 22% da população da Região Norte e 1,8% da população do país. Entre os municípios amazonenses, a maior população pertence a Manaus com 1.861.838 de habitantes, o que corresponde a 51,8% da população total do Estado. Manaus, por sua vez, apresenta sua região metropolitana integrada por 13 municípios: Manaus, Presidente Figueiredo, Rio Preto da Eva, Itacoatiara, Iranduba, Manacapuru, Novo Airão, Careiro da Várzea (os primeiros) e Manaquiri, Careiro, Autazes, Itapiranga e Silves inseridos por meio da Lei Complementar n.º 64, de 30 de abril de 2009, promulgada pela Assembleia Legislativa do Estado.

Com 40.735 habitantes, Iranduba está localizada a 22Km da cidade de Manaus, fazendo fronteira direta com a mesma. Atualmente, existe fácil acesso ao

município, o que acarreta um intenso fluxo migratório com a cidade de Manaus, possibilitando uma interligação entre essas duas regiões e facilitando a execução do projeto.

4.3 Delineamento amostral

Inicialmente, foi realizado contato com a representante da Secretaria de Saúde Municipal para apresentação do projeto e conhecimento da área de estudo. No total, colaboraram com a coleta de dados, alunos da Liga de Hepatologia do Amazonas das Universidades Estadual e Federal do Amazonas, além de uma equipe composta por dois enfermeiros, dezoito técnicos de enfermagem e doze agentes comunitários de saúde do município.

Com o apoio da Secretaria de Saúde foram realizadas campanhas na zona urbana das seguintes localidades: Novo Amanhecer, Cacau Pirêra, Centro, Bairro Alto, Cidade Nova, Nova Veneza, Alto de Nazaré, Morada do Sol, Ariaú e Estrada I (Km 6). As campanhas ocorreram uma vez por semana e a divulgação era realizada nas Unidades Básicas de Saúde (UBS). Nossa equipe também realizou divulgação através de rádio comunitária, ressaltando a importância do diagnóstico precoce para a hepatite C. Algumas coletas ocorreram em locais como o Centro do Idoso, devido à falta de estrutura de algumas UBS, impossibilitando o desenvolvimento da campanha. Primeiramente, foi realizada palestra sobre hepatite C para os voluntários e posteriormente explicação das etapas do teste rápido anti-HCV, esclarecimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aplicação do questionário epidemiológico e teste rápido anti-HCV.

A zona rural, composta principalmente pela população ribeirinha, abrangeu as seguintes localidades: Parque dos Barões, Rio Negro, Paricatuba, Lago do Limão, Januari, Solimões I, Solimões II, Estrada II (Km 3 e Km 26) e Nossa Senhora de Fátima. Devido as condições financeiras limitadas da pesquisa, desde o transporte até a estadia nessas localidades, realizamos campanha no Parque dos Barões, Lago do Limão e Km 6. Dessa forma, para as outras localidades promovemos o treinamento de suas equipes de saúde compostas por agentes comunitários e enfermeiros(as). O projeto e suas finalidades, bem como a importância para a população, foi ressaltado para esses profissionais, ficando os mesmos orientados e aptos para aplicarem o teste, obedecendo a seleção dos indivíduos enquadrados nos critérios de inclusão e exclusão. Os indivíduos da zona rural, que aceitaram

participar do teste, tiveram agendadas, pelo agente de saúde, as coletas de amostra, que foram realizadas na UBS mais próxima de sua residência ou no próprio domicílio.

Dessa forma, com o auxílio do estatístico, foi calculado a quantidade, mínima, de 414 testes afim de que a amostra fosse representativa para o município. Cálculo estatístico (Bussab & Morettin, 2011):

$$N_h = \frac{n}{N_g} \times n_h$$

N_h = Tamanho da amostra no município

n = Amostra calculada de acordo com a prevalência nacional (1,2%) e margem de erro ($\pm 0,5\%$) = 1800

N_g = População geral

n_h = População do município*

*População baseada em dados estatísticos do IBGE 2011.

Mediante a assinatura do TCLE, foi preenchido um formulário (em anexo) com informações específicas dos participantes, sendo posteriormente realizado o teste rápido anti-HCV, através de punção de polpa digital. Apenas das pessoas que foram positivas no teste rápido anti-HCV, foi coletado 10 mL de sangue para a realização da qPCR, para que fosse confirmado o diagnóstico, e 10 mL de sangue para dosagem de citocinas, para analisar o perfil imunológico, (Figura 7).

Como grupo controle para análise de perfil de citocinas, foram coletadas amostras de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (Hemoam). Para cada amostra HCV positiva, foi coletado uma amostra controle. Para este procedimento foram incluídos doadores de sangue entre 18 e 65 anos, de ambos os gêneros e excluídos àqueles que apresentaram sorologia positiva para HBV, HIV, HCV, HTLV, Sífilis e Doença de Chagas, de acordo com a triagem da Fundação Hemoam.

Todas as amostras dos participantes anti-HCV positivos, após a centrifugação e obtenção do plasma, foram armazenadas a -80°C no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Manaus, onde foram realizados os testes moleculares e na Fundação Hemoam, onde foi realizado a quantificação de citocinas.

Os indivíduos positivos para o teste anti-HCV também foram encaminhados para consultas no serviço de Hepatologia, procedimento de rotina, do ambulatório

Araújo Lima, Universidade Federal do Amazonas, onde foi iniciado acompanhamento específico para a doença.

Critérios de inclusão

- Maiores de 18 anos;
- Residente no município em estudo.

Critérios de exclusão

- Enfermidades ativas nas polpas digitais, que contra- indique punção digital;
- Recusa em assinar oTCLE e a participar do questionário epidemiológico.

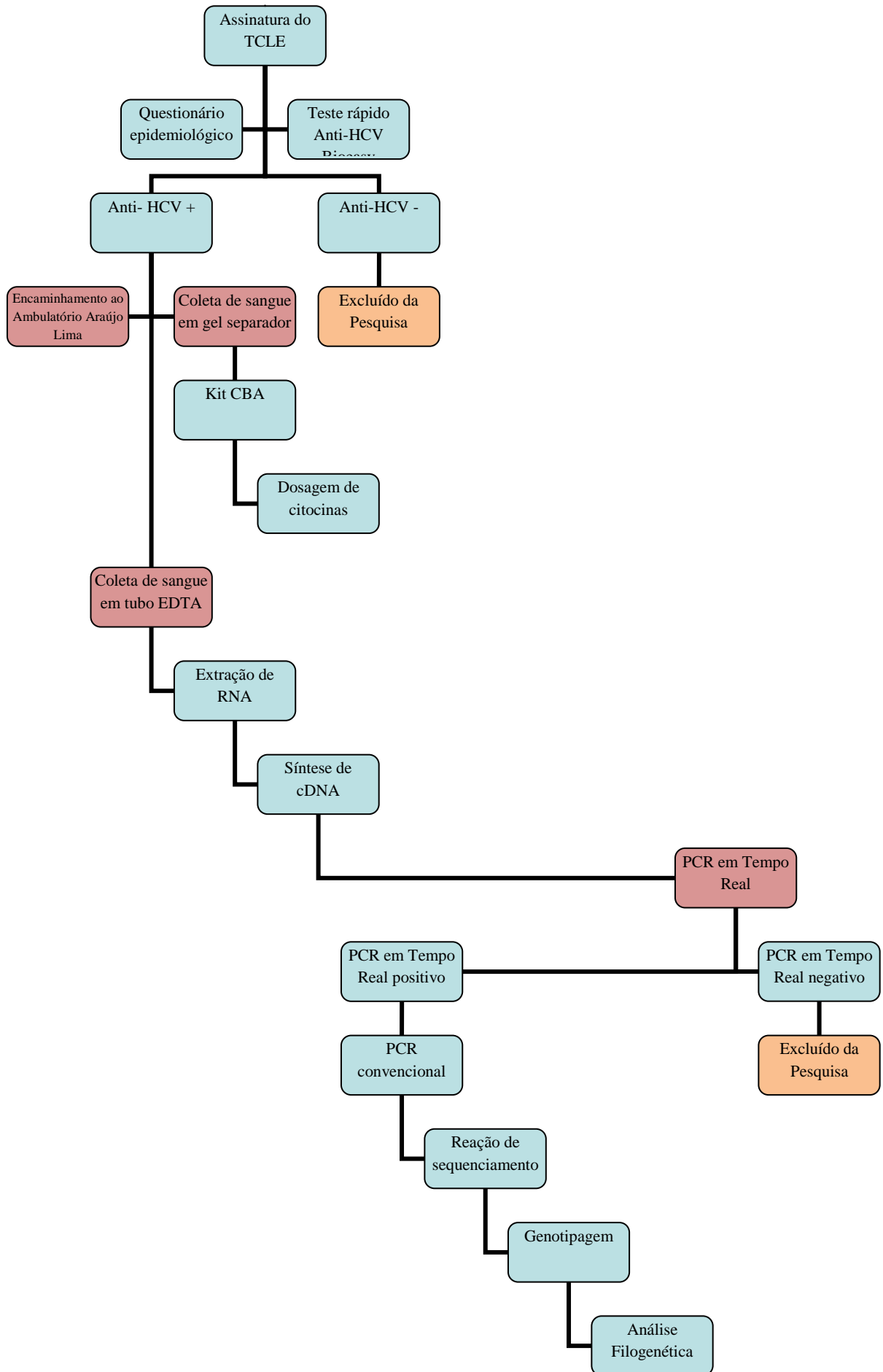


Figura7. Fluxograma metodológico

4.4 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa- CEP da Fundação Hemoam em 30 de julho de 2012, com número de protocolo CAAE-01344012.6.0000.5020 (Anexo) frente à resolução CNS 196/96.

4.5 Apoio institucional

O projeto contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, através de bolsa de mestrado. A pesquisa também contou com apoio financeiro das instituições; Instituto Leônidas e Maria Deane- Fiocruz-Manaus e Fundação Hemoam, através de suporte técnico-laboratorial, CNPq e FAPEAM.

4.6 Procedimentos laboratoriais

4.6.1 Teste rápido anti-HCV

Para a triagem sorológica foi realizado o teste rápido HCV *Bioeasy* (*Bioeasy*®). O teste consiste em um imunoensaio qualitativo para a detecção de anticorpos específicos anti- HCV em amostras de soro, plasma ou sangue total.

O teste rápido HCV *Bioeasy*, apresenta uma membrana pré-coberta de múltiplos antígenos recombinantes das regiões core, NS3, NS4 e NS5 do genoma do HCV na região da linha teste “T”, aumentando a sensibilidade para o diagnóstico da infecção e diminuindo a chance de reações inespecíficas, diferente dos testes de primeira geração que utilizam apenas um antígeno recombinante. Segundo o fabricante, o desempenho do teste apresenta sensibilidade 100% e especificidade de 99,4% quando comparado a PCR em tempo real.

O teste consistiu em uma leve picada no dedo indicador com uma lanceta. Com o auxílio de uma micropipeta foi recolhido 10µL de sangue e dispensado dentro da cavidade “S” do dispositivo do teste, em seguida foi adicionado 4 gotas de tampão diluente. O resultado foi interpretado em 20 minutos (*Bioeasy*, 2011), (Figura 8).

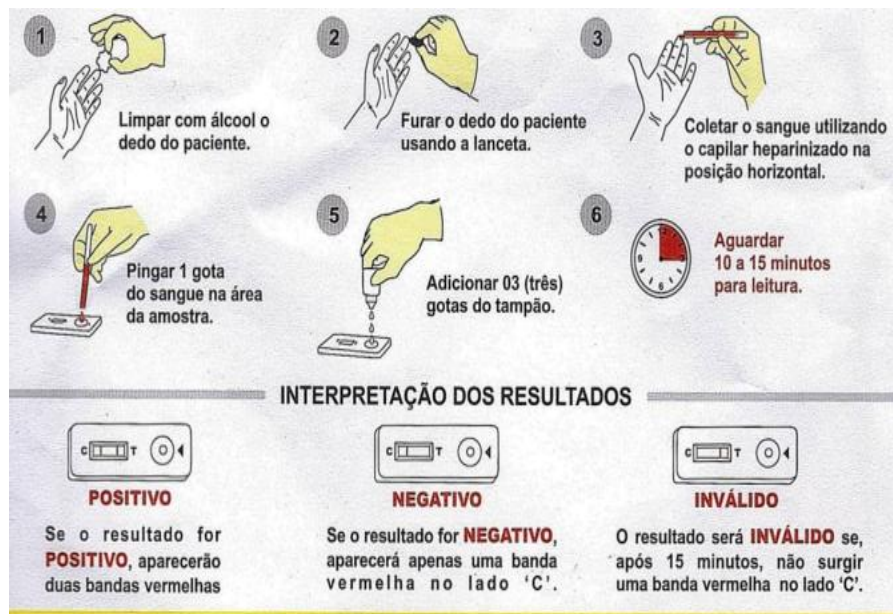


Figura 8. Etapas da realização do teste rápido anti-HCV Bioeasy®.

Os resultados do teste foram interpretados com base na linha controle “C” e na linha teste “T”. Caso somente a linha controle “C” aparecesse, o paciente era considerado não reagente, caso aparecesse a linha controle “C” e a linha teste “T”, o paciente era considerado reagente e, portanto anti-HCV positivo (Figura 8).

4.6.2 Análise estatística

Após o término da coleta de dados, todos os questionários epidemiológicos dos participantes foram registrados no programa estatístico *Epi Info*TM versão 7.1.0.6. Figuras e tabelas foram construídas no programa *Microsoft Office Excel 2007*. Para o cálculo das concentrações em pg/mL das citocinas, foi utilizado o software *FCAP-Array*TM (v 3.0.1) e para a construção dos gráficos, o programa *Graphpad Prism 5*. O teste de *Spearman* foi aplicado para a correlação entre citocinas e carga viral.

4.6.3 Amplificação dos ácidos nucleicos

4.6.3.1 Extração do RNA do plasma

A extração do RNA da amostra positiva no teste rápido anti-HCV foi realizada com o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Quiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído, livre de inibidores, contaminantes, proteínas e nucleases, foi eluído em 60µL de tampão AVE para uso direto e armazenagem a -80°C até o momento de uso. A etapa seguinte foi a síntese do DNA complementar.

4.6.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA, através da reação de transcriptase reversa, foi obtida através do kit *SuperScript III cDNA Reverse Transcriptase* (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), sendo utilizado o seguinte programa: 50°C por 5 minutos, 55°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

4.6.3.3 Desenho e elaboração de oligonucleotídeos iniciadores

As sequências de iniciadores e sonda utilizados no presente estudo foram elaboradas com base no banco de dados do HCV disponível no *Los Alamos HCV Sequence* (<http://hcv.lanl.gov>). Essas sequências foram posteriormente alinhadas pelo algoritmo MUSCLE implementado no programa MEGA versão 5.05. Contudo, regiões conservadas foram selecionadas como alvo para elaboração das sequências de iniciadores e sonda. Após a determinação das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, análises complementares foram realizadas para determinar possível amplificação não-específica com auxílio da ferramenta *Primer-Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

4.6.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)- Tempo Real

Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Os oligonucleotídeos iniciadores e a sonda utilizados na reação estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Primers e sonda do genoma do HCV utilizados nos ensaios moleculares.

Ensaio molecular	Região	Primer (Invitrogen®)	Sequência	Produto amplificado	Posição*
PCR quantitativo	5'UTR	qHCV_FNS (SENSE)	5'CGTGCCCCCGCRAGA3'	63pb	232-246
		qHCV_FNAS (ANTISENSE)	5'AGGCAGTACCACAAGGCCTT T3'		274-294
PCR qualitativo	NS5B	HCV_FNS (SENSE)	5'TGGGSTTYTCGTATGAYACC CGCTG3'	400pb	8.245-8.271
		HCV_FNAS (ANTISENSE)	5'GARTACCTRGTCATAGCCTC C3'		8.621-8.641
Sonda	HCV_FNP	5' (FAM) AGCCGAGTAGYGTGGG 3' (MGB-NFQ)			252-268

* NC_004102 Sequência referência utilizada para cálculo da posição.

As reações em cadeia da polimerase em tempo real foram realizadas com a utilização do mix *TaqMan® Fast Advanced Master Mix* (Applied Biosystems, catálogo: 4444556) de acordo com as instruções do fabricante. Para uma maior confiabilidade dos resultados, o ensaio foi conduzido com aplicação em duplicata das amostras testadas, sendo aplicado no mesmo ensaio controle interno positivo (Beta-actina) e negativo (Branco). Para a reação foi montado um mix de volume final de 20µL; contendo 10 µL do mix *qPCR-Taqman Advanced*, 2µL de cDNA e os seguintes componentes descritos na tabela 2.

Tabela 2. Reagentes do PCR em tempo real

Primer Mix (Invitrogen™)			Sonda FAM (Invitrogen™)		H ₂ O	Volume final
	Concentração	Volume utilizado	Concentração	Volume utilizado	5,2µL	20µL
HCV	5µM	1,2µL	10µM	0,2µL		
Beta-actina	5µM	1,2µL	10µM	0,2µL		

A reação foi realizada em termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems) com o seguinte programa: uma primeira etapa a 50°C por 2 minutos para ativação da enzima e 95°C por 20 segundos para desnaturação das fitas, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos para hibridização dos iniciadores e detecção da amplificação.

4.6.3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Confirmado o resultado da qPCR o procedimento prosseguiu para a amplificação do gene NS5B do HCV, sendo realizada através da PCR convencional. Foram utilizados os seguintes reagentes e suas respectivas concentrações de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. Reagentes da PCR convencional

Reagentes (Invitrogen™)	Concentrações	Volume utilizado
Tampão de PCR	10X	2,5 µL
MgCl ₂	1,5 mM	0,75 µL
<i>Primer</i> HCV FN_S	10mM	1µL
<i>Primer</i> HCV FN_AS	10mM	1 µL
dNTP's	10mM	0,5µL
<i>Platinum Taq</i> DNA Polimerase	5U/µL	0,2µL
cDNA	–	2µL
H ₂ O UP	–	17,05µL
Volume final		25µL

O programa utilizado na reação foi: 94°C por 2 minutos para uma desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação das fitas, 63°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturação das fitas, 63°C por 30 segundos para hibridização dos iniciadores e, 72°C por 30 segundos para extensão da amplificação do alvo, após uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.6.3.6 Eletroforese em gel de agarose

O produto amplificado foi identificado através de eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X corado com *GelRed™* (Biotium), 0.5 µL/20mL. Foram homogenizadas 5 µL da amostra com 1 µL do corante de Azul de Bromofenol 6X.

Além da amostra foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen[®]) como padrão. A eletroforese foi realizada em cuba alimentada por fonte de eletroforese a 100 V, constantes, durante 45 minutos.

4.6.3.7 Purificação do produto amplificado

O produto amplificado foi purificado com Polietilenoglicol 8000 (PEG), afim de remover oligonucleotídeos e excesso de reagentes da PCR, que pudessem vir a interferir na reação de sequenciamento. Em um tubo de 1,5 mL foi transferido 20µL de PEG 20%, em seguida adicionado 20 µL do produto da PCR. A mistura foi agitada suavemente para melhor homogeneização durante 10 segundos e incubada a 37°C por 15 minutos. Após essa etapa, foi centrifugada por 6000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e adicionado 125 µL de etanol a 80%, gelado, seguindo a amostra para centrifugação a 4500 rpm por 2 minutos. Descartado novamente o sobrenadante, o tubo foi submetido a 60°C por 10 minutos, para remoção de resíduos de etanol. Certificado a ausência do etanol foi adicionado 20 µL de água livre de nuclease. Depois de ser agitada em vórtex por 10 segundos, a amostra foi armazenada a -20°C, antes porém ficou algumas horas submetida a temperatura de 4^o-5^oC, para uma melhor eluição do DNA.

4.6.3.8 Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com utilização do kit *BigDye[®] Cycle Sequencing Terminator v.3.1* (Applied Biosystems part number 4337455). O mix preparado com seus componentes e suas respectivas concentrações estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Reagentes da reação de sequenciamento

Reagentes	Tampão	Primer	BigDye	cDNA	H ₂ O	Volume final
Concentração	5X	3,3 µM	0,3 µL	0,5 µL	6,2µL	10µL
Volume utilizado	2µL	1 µL				

Foi preparado um mix com o primer sense e outro com o antisense. O programa utilizado na reação de sequenciamento foi: 95°C por 1 minuto, seguidos de 20 ciclos a 95°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos, e 10 ciclos a 95°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 3 minutos.

4.6.3.9 Purificação do produto da reação de sequenciamento

Realizamos posteriormente, a purificação da reação de sequenciamento com base na utilização do protocolo de purificação EtOH/EDTA/Acetato de Sódio (Applied Biosystems v.3.1).

A placa foi centrifugada a 2000 rcf durante 1 minuto, logo em seguida foi adicionado respectivamente 1µL de EDTA a 125mM, 1µL de acetato de sódio a 3M com pH de 5,2 e 25µL de etanol 100% gelado a cada um dos poços. A placa foi selada com strips e misturada por inversão quatro vezes. Em seguida, a placa foi incubada por 15 minutos.

Após isso, passou novamente por centrifugação a 2.000 rcf durante 45 minutos, depois a placa foi invertida imediatamente e submetida a um *spin* até 180 rcf por 1 minuto. Desprezado o conteúdo, foi adicionado 35µL de etanol 70%. A placa foi centrifugada por 15 minutos à 4°C e 1.650 rcf. Foi realizado outro *spin* a 180 rcf durante 1 minuto em seguida a mesma foi incubada à 52°C por 15 minutos. Por fim, no momento de sequenciar as amostras foi adicionado 10µL de formamida *Hi-Di*, lavando as paredes dos poços, antes porém a placa foi aquecida a 95°C por 1 minuto.

Dessa forma, foi realizado o sequenciamento nucleotídico utilizando o analisador genético ABI 3130 da Plataforma tecnológica de genômica (parceria Instituto Leônidas e Maria Deane e Fundação Alfredo da Mata).

4.6.3.10 Curva padrão

Para a construção da curva padrão, foi inicialmente quantificada a amostra da última coleta, através do kit *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen™), de acordo com as normas do fabricante. Dessa forma, o valor quantificado foi convertido através do site: <http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>, para número de cópias/ µL. A partir dessa amostra, foi realizada uma diluição seriada que ia de 10⁻¹ a 10⁻⁸, entretanto para a construção da curva foi utilizado a partir da concentração 10⁻⁴,

afim de detectar o limite do DNA e a quantificação da carga viral do HCV, utilizando a PCR em tempo real. Para a reação foi montado um mix de volume final de 15µL; contendo 5 µL do mix *Taqman* vírus e, 5µL do RNA das amostras e os seguintes componentes descritos na tabela 5.

Tabela 5. Reagentes utilizados na curva padrão

Primer Mix (Invitrogen™)		Sonda FAM (Applied)		H ₂ O	Volume final
Concentração	Volume utilizado	Concentração	Volume utilizado	8,6 µL	15 µL
5µM	1,2µL	10µM	0,2µL		

A reação foi realizada em termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems) com o seguinte programa: uma primeira etapa a 50°C por 2 minutos e 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos.

4.6.3.11 Análise das sequências

Obtida as sequências nucleotídicas foi verificada a qualidade das mesmas e logo após realizado o alinhamento através do programa *Geneious 5.6.5*. As sequências foram submetidas a ferramenta *Nucleotide-Blast*(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast>) afim de compará-las com outras sequências homólogas existentes no banco de dados do programa.

4.6.3.12 Análise filogenética

Para a realização da análise filogenética as sequências definidas neste estudo foram alinhadas à um conjunto de três representantes de cada genótipo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 descrito para o HCV, obtidos através do banco de dados *Los Alamos HCV Sequence* (<http://hcv.lanl.gov>). Para essa parte do estudo foi utilizado os programas *JMODELTEST* para escolha do melhor modelo evolutivo e o *Geneious 5.6.5* utilizando a abordagem de máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood*). O alinhamento das sequências foi realizado com o auxílio do algoritmo *ClustalW Multiple Alignment* implementado no programa *Geneious 5.6.5*. Foram utilizados fragmentos de sequência de no mínimo 390 nucleotídeos correspondente ao gene

NS5B. O modelo de distância genética utilizado foi o Tamura-Nei. O valor de *bootstrap* mostrado foi acima de 70%.

4.6.4 Kit CBA

As dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo CBA (*BD Cytometric Bead Array-CBA*), utilizando o Kit T_H1, T_H2 e T_H17 *Human Cytokine* (Cat. n° 560484, Lot.: 29132, marca BD[®] Biosciences, San Jose, CA), seguindo as orientações técnicas contidas nos protocolos preconizados pelo fabricante.

Após a preparação, foi realizado a aquisição das amostras utilizando o citômetro de fluxo *FACSCanto II* (BD *Biosciences*) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz-Manaus.

A ampla dinâmica de detecção fluorescente via citometria de fluxo e a captura eficiente de partículas em suspensão, ativam o ensaio *CBA-BD* para medir a concentração desconhecida de uma amostra em menos tempo e com menos diluições em relação a metodologia de um teste de ELISA convencional e fornece resultados que, normalmente, requerem sete ELISAs convencionais (Manual de Instrução, Kit *CBA BD*).

5. Resultados

O período de coleta de dados aconteceu entre agosto de 2012 e fevereiro de 2013. Participaram do estudo 700 voluntários, moradores de nove localidades da zona rural e dez localidades da zona urbana.

De todos os casos estudados, registramos um indivíduo com sorologia reativa para o teste rápido anti-HCV *Bioesay*®, com prevalência de sororeatividade anti-HCV de 0,14% (1/700) da amostra.

5.1 Análise descritiva dos participantes

A média de idade foi de 33 anos (homens: 34,0, mulheres: 33,5) com desvio padrão de 14,7.

Com relação às variáveis sócio-demográficas (Tabela 6), observou-se predominância do gênero feminino, 450 (64,4%) voluntárias. Quando entrevistadas, 30 (6,7%) relataram gravidez. A maioria era natural do Amazonas 635 (90,7%). Sobre a residência da população do município, 370 (52,9%) moravam na zona urbana e 324 (46,2%) na zona rural, sendo que 6 (0,9%) possuíam moradia em ambas as zonas. Quanto à cor, 614 (87,7%) se identificaram como pardos. Quanto à escolaridade, a maioria possuía o ensino fundamental incompleto 233 (33,5%). O estado civil predominante foi casado ou em união estável 478 (68,4%). Dos entrevistados, 549 (78,4%) informaram comportamento heterossexual.

O levantamento de dados epidemiológicos encontrou possíveis fatores de risco e vulnerabilidade para a infecção pelo HCV na população estudada (Tabela 7). Durante a entrevista, 53 (7,6%) informaram uso atual ou passado de drogas, injetáveis ou inaladas, com compartilhamento de agulhas e seringas, destes a maioria 45 (84,9%) eram usuários por tempo não superior a cinco anos.

Dos entrevistados, 258 (36,9%) consumiam algum tipo de bebida alcólica, destes 110 (42,7%) relataram uso diário ou semanal.

Quanto ao histórico de procedimentos hospitalares, 314 (44,9%) foram submetidos à internação hospitalar em algum momento de suas vidas. Realizaram intervenção cirúrgica 284 (40,6%) pessoas, destas 195 (68,6%) foram hospitalizadas, sendo a maioria das intervenções cirúrgicas a partir de 1992.

Relatos de indivíduos submetidos a procedimentos odontológicos, acupuntura, colocação de piercing e tatuagens, hábito de manicure e pedicure, barbearia e

medicação injetável em farmácia, foram encontrados na proporção de 48,3%, 0,71%, 20,1%, 26,43%, 18,0% e 13,4% respectivamente. Dos entrevistados somente uma pessoa afirmou ser portadora de HIV.

Quanto à atividade profissional, 74 (10,6%) informaram serem profissionais de saúde. Houve relato de transfusão sanguínea por 87 (12,4%) dos entrevistados, sendo que a maioria, 68 (78,2%) receberam após 1992.

Afirmaram passado de icterícia 96 (13,73%) dos entrevistados e 235 (33,6%) relataram possuir familiares que tiveram diagnóstico de hepatite viral em algum momento da vida. Sobre o tipo de hepatite ocorrente na família, 146 (62,1%) não souberam informar, 60 (25,5%) informaram o tipo viral, como hepatite A.

A análise multivariada dos fatores de risco e exposição ao HCV não foi possível de ser estatisticamente definida devido a baixa soropositividade encontrada.

Tabela 6. Análise das variáveis sócio-demográficas, Iranduba-AM, 2013.

VARIÁVEIS	N	%	VARIÁVEIS	n	%
GÊNERO			ESCOLARIDADE		
Feminino	450	64,4	Não alfabetizado	51	7,3
Masculino	250	35,6	Ensino fund. Incompleto	233	33,5
COR			Ensino fund. completo	85	12,2
Branco	53	7,6	Ensino médio incompleto	77	11,0
Negro	31	4,4	Ensino médio completo	196	28,1
Oriental	2	0,3	Ensino superior completo	55	7,9
Pardo	614	87,7	NATURALIDADE		
ESTADO CIVIL			Manaus	177	25,3
Casado	238	34,1	Interior do Amazonas	458	65,4
Divorciado	18	2,6	Outros estados do Norte	36	5,2
Solteiro	175	25,0	Outros estados do Brasil	28	4,0
União estável	240	34,3	Outros países	1	0,1
Viúvo	28	4,0	ORIENTAÇÃO SEXUAL		
PROCEDÊNCIA			Bissexual	1	0,1
Zona urbana	370	52,9	Heterossexual	549	78,4
Zona rural	324	46,2	Homossexual	2	0,3
Ambas as zonas	6	0,9	Não respondeu	148	21,2

Tabela 7. Variáveis relativas aos fatores de risco e vulnerabilidade para a infecção pelo HCV na população estudada, Iranduba-AM, 2013.

VARIÁVEIS	N	%	VARIÁVEIS	n	%
BEBIDA ALCOÓLICA			ANO DE CIRURGIA		
Não	440	63,9	Antes de 1980	7	2,5
Sim	258	35,9	De 1980 a 1989	48	16,9
Não respondeu	2	0,2	Apartir de 1992	229	80,6
TIPO DE BEBIDA			ASSISTÊNCIA ODONTOLÓGICA		
Cachaça	67	26,0	Não	361	51,6
Cerveja	169	65,5	Sim	338	48,3
Vinho	22	8,5	Não respondeu	1	0,1
FREQUÊNCIA DE INGESTÃO ALCOÓLICA			DOAÇÃO DE SANGUE		
Diária	7	2,7	Não	691	98,7
Semanal	103	40,0	Sim	8	1,1
Mensal	148	57,3	Não respondeu	1	0,2
TEMPO DE USO BEB. ALCOÓLICAS			ANO DA HEMOTRANSFUSÃO		
0 a 5 anos	73	28,3	Antes de 1992	19	21,8
5 a 10 anos	94	36,4	A partir de 1992	68	78,2
10 a 20 anos	53	20,6	POSSUI TATUAGEM OU PIERCING		
> 20 anos	38	14,7	Não	559	79,9
USA DROGAS INJET. OU INALADAS			Sim	141	20,1
Sim	53	7,6	MEDICAÇÃO INJETÁVEL EM FARMÁCIA		
Não	647	92,4	Não	606	86,6
TEMPO DE USO DE DROGAS			Sim	94	13,4
0 a 5 anos	45	84,9	PROFISSIONAL DA SAÚDE		
5 a 10 anos	8	15,1	Não	626	89,4
JÁ FOI HOSPITALIZADO			Sim	74	10,6
Não	383	54,7	HISTÓRICO FAMILIAR DE HEPATITE		
Sim	314	44,9	Não	465	66,4
Não informaram	3	0,4	Sim	235	33,6
CIRURGIA			TIPO DE HEPATITE		
Não	416	59,4	Viral (HAV)	60	25,5
Sim	284	40,6	Viral (HBV)	19	8,1
			Viral (HCV)	10	4,3
			Não soube informar	146	62,1

5.2 Análise descritiva do caso positivo para hepatite C

Paciente do gênero feminino, 64 anos de idade, cor parda, natural do município, do lar, residente na zona urbana de Iranduba, com ensino fundamental

incompleto. Divorciada, com um parceiro sexual durante sua vida afetiva. Tem diagnóstico de diabetes, hipertensão, passado de hemorragia digestiva alta em 2008, com necessidade de transfusão de hemoderivados. Negava icterícia.

A paciente tinha histórico familiar de hepatite, entretanto não sabia informar o tipo. Negava o uso de bebida alcoólica e drogas injetáveis. Negava tatuagem, uso de *piercing*, frequentar manicure e uso de medicação injetável em farmácia. Afirma ter participado de campanhas de vacinação, quando ainda se utilizava seringas de vidro.

Assim, mediante assinatura do TCLE e após apresentar positividade no teste rápido (Figura 9), foi coletado 4ml de sangue em tubo com EDTA e 4mL de sangue em tubo com gel separador para a realização de testes moleculares e teste imunológico respectivamente. Foram realizadas novas coletas de amostra da voluntária, com intervalo de três meses, a fim de acompanharmos a carga viral e a quantificação de citocinas.

Figura 9. Resultado positivo do teste rápido anti-HCV *Bioeasy*®.



As sorologias confirmatórias, por ELISA, revelaram positividade para anti-HCV, e negatividade para hepatite B (HBsAg, anti-HBc total, anti-HBs) e HIV.

Os exames hematológicos evidenciaram plaquetopenia (plaquetas $89.750/\text{mm}^3$), testes hepáticos alterados, com predomínio de aminotransferases, tendo a alanina aminotransferase os níveis mais elevados, alcançando 4 vezes o limite superior da normalidade. Quando avaliada por exame de imagem, a tomografia computadorizada de abdômen superior mostrou doença hepática crônica com sinais de cirrose e esplenomegalia.

Os exames de biologia molecular revelaram a presença do RNA do HCV. Na primeira amostra, a PCR em tempo real apresentou um valor de $Ct=39,6$, na segunda $Ct=36,6$ e na terceira $Ct=36,8$. Todas as amostras, portanto, confirmaram o diagnóstico da infecção, sendo o controle positivo interno da reação (beta-actina) e o controle externo positivo (amostra de paciente sabidamente HCV-RNA positivo) amplificados satisfatoriamente. O branco da reação foi negativo, validando o experimento.

Após realização da PCR convencional, o produto amplificado foi identificado por eletroforese em gel de agarose, apresentando um amplicon de 400 pares de base (Figura 10), seguindo para a reação de sequenciamento, com exceção da segunda amostra, que após várias tentativas não foi possível obter uma boa amplificação. Dessa forma, a confirmação do genótipo para a região NS5B das amostras foi baseada na análise filogenética com um valor de *bootstrap* superior a 70% evidenciando a confiabilidade da análise, (Figura 11). As sequências também foram submetidas a ferramenta *Nucleotide-Blast*, além de outros programas como o REGA (Bioáfrica).

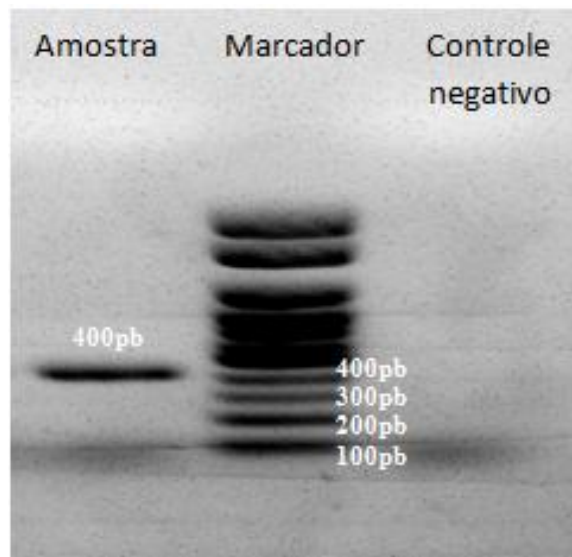


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose da amostra da voluntária 379, apresentando um amplicon de 400 pares de base (pb).

O resultado obtido pela análise filogenética com outras sequências referências caracterizou a amostra como genótipo 2b. As amostras agruparam com a sequência referência 2b _AF238486.1 com um valor de *bootstrap* em 99,95%, indicando um valor alto de confiabilidade da análise. Entretanto, a árvore revela que as duas amostras, apesar de ser da mesma paciente, diferem em suas sequências nucleotídicas. Essa interpretação pode está ligada ao fato do genoma do HCV apresentar mutações comuns no decorrer de sua replicação; no caso das amostras da voluntária HCV-RNA positivo de nosso estudo, elas apresentaram transições de nucleotídeos na região NS5B sequenciada, Adenina/Guanina na posição 8.316 e Citocina/Timina na posição 8.401.

Baseado no valor da quantificação da diluição 10^{-4} (0,0632 ng/ μ L), o qual foi convertido para número de cópias/ μ L, cujo valor foi 1×10^9 de cópias/ μ L, foi possível obter a carga viral da primeira coleta, cujo valor foi de 3.216 cópias/mL,

passando para 20.417 cópias/mL na segunda e apresentando declínio para 17.781 cópias/mL na terceira coleta. O limite de detecção constatado foi de 1.724 cópias/mL.

As amostras foram aplicadas em quadruplicatas e foi observado a seguinte curva, (Figura 12).

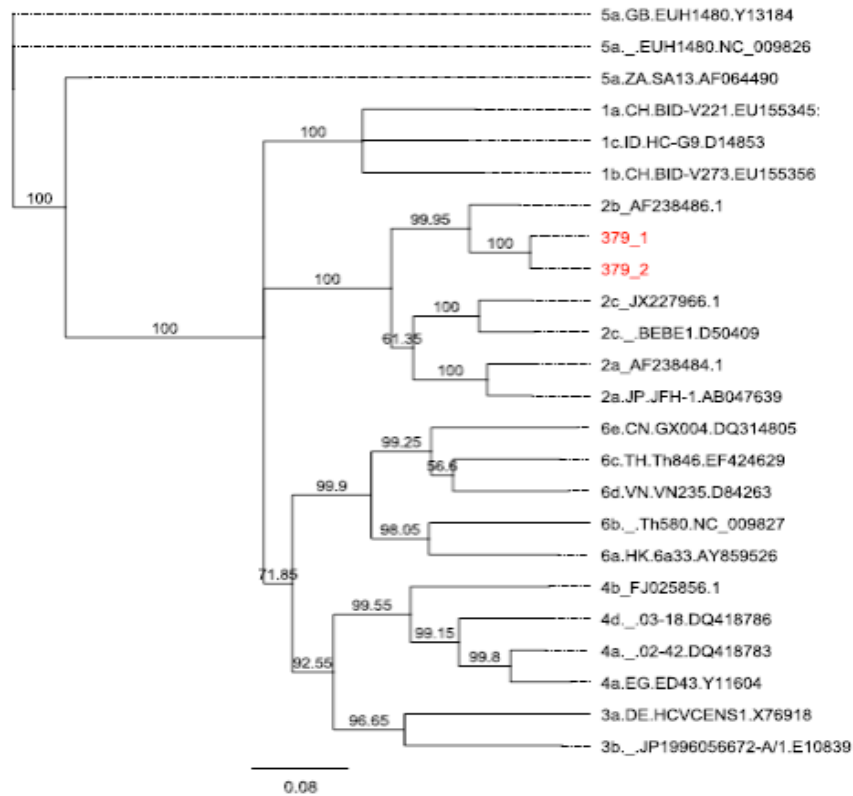


Figura 11. Análise filogenética da região NS5B do HCV da amostra da voluntária 379. Árvore de máxima verossimilhança, implementado no programa Geneious 5.6.5. Foi utilizado o modelo de distância genética *Tamura-Nei* entre as sequências do estudo e as sequências da região NS5B do banco de dados *Los Alamos*. O valor do *bootstrap* utilizado foi avaliado após 2000 pseudoréplicas. A barra de escala no canto esquerdo inferior representa a distância genética em substituições por nucleotídeo do fragmento analisado. As sequências em vermelho indicam as sequências do estudo.

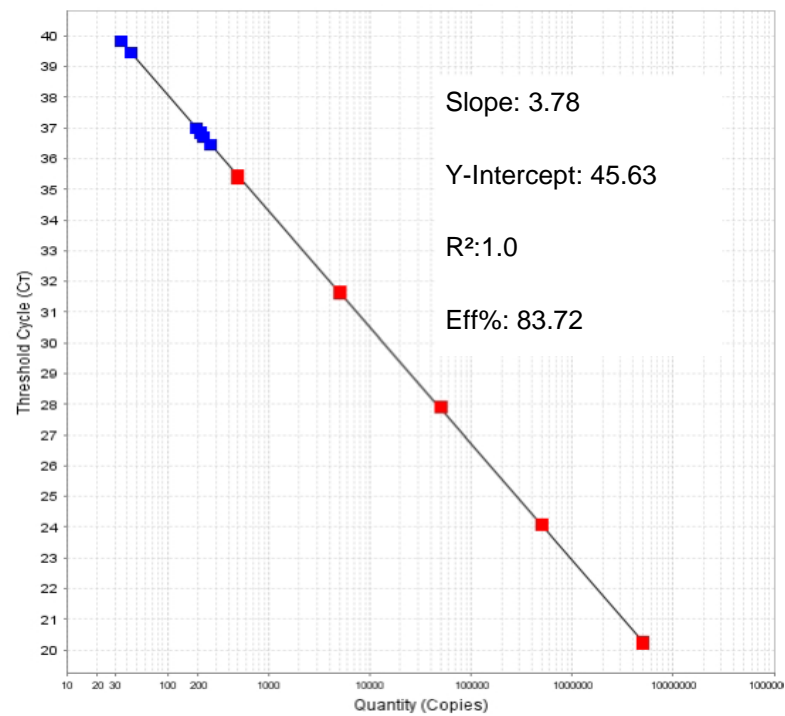


Figura 12. Regressão linear da curva padrão do caso HCV soropositivo. Os pontos em vermelho indicam as diluições seriadas e os pontos em azul indicam as amostras da voluntária 379.

Na quantificação de citocinas de padrão T_H1, T_H2 e T_H17 por citometria de fluxo, foram analisadas as seguintes citocinas, (Figura 13).

Os níveis séricos de IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-17A foram determinados em todas as amostras, no entanto, os níveis de IL-4 e IFN- γ foram detectados apenas em uma amostra da paciente. As citocinas apresentaram as seguintes concentrações (Tabela 9).

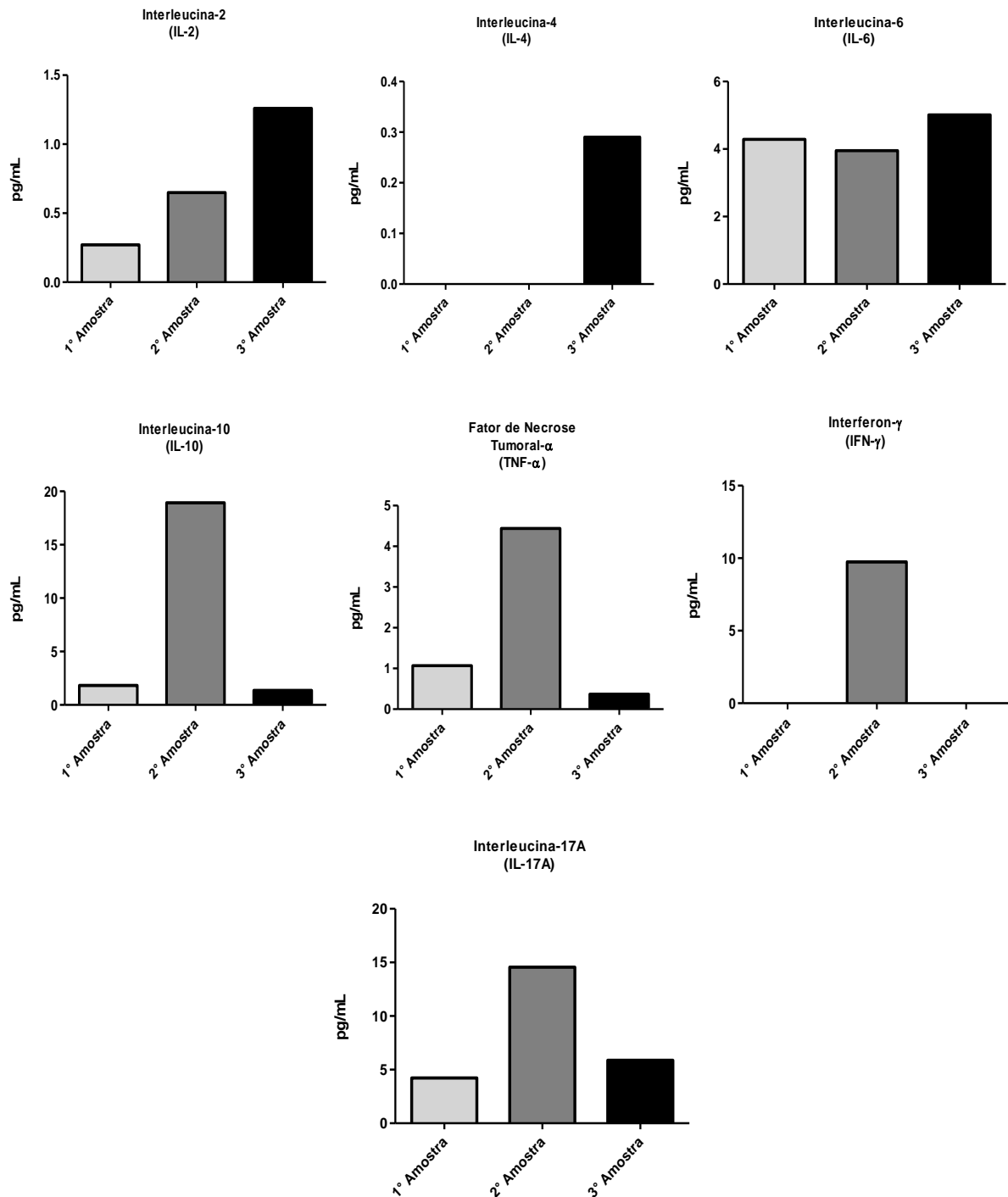


Figura 13. Quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A da paciente 379, realizadas pela técnica de citometria de fluxo CBA, utilizando o Kit T_H1, T_H2 e T_H17.

A citocina IL-2 apresentou um aumento gradativo, sugerindo a diferenciação de células Th1. A IL-4, uma citocina de perfil Th2, não foi detectada durante as duas primeiras coletas, na terceira porém, mostrou-se em quantidade muito reduzida. A quantidade de IL-6 foi bastante expressiva, apresentando-se constante ao longo das amostras. Em contraste, a IL-10 não se apresentou estável, sendo mais significativa na segunda amostra, juntamente com o IFN- γ . Os níveis séricos de TNF- α foram

muito baixos. A citocina IL-17A esteve presente em todas as amostras, durante a segunda amostra seu valor foi mais representativo, tendo sido quase três vezes superior as quantidades inicial e final.

Foi observada correlação positiva somente entre a citocina IL-17A e a carga viral (Tabela 9).

Tabela 9. Níveis de citocinas da paciente 379, determinados através do *Kit CBA*.

Citocinas (pg/mL)	Grupo controle	1ª Amostra	2ª Amostra	3ª Amostra	Teste de Sperman (valor p)
IL-2	0,00	0,27	0,65	1,26	0,66
IL-4	0,00	0,00	0,00	0,29	0,99
IL-6	0,00	4,29	3,95	5,01	0,66
IL-10	0,00	1,82	18,92	1,36	0,66
TNF- α	0,00	1,07	4,44	0,37	0,66
IFN- γ	0,00	0,00	9,74	0,00	0,33
IL-17A	0,00	4,23	14,55	5,88	<0,01*

*Valor de p significativo $\leq 0,05$

6. Discussão

No presente estudo, a prevalência estimada foi de 0,14% para o marcador anti-HCV, caracterizando o município de Iranduba, região metropolitana de Manaus, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, como região de baixa endemicidade para a hepatite C.

O município de Iranduba esteve durante muitos anos “isolado” da capital do Amazonas, sendo seu acesso somente possível através de transporte fluvial. Recentemente, após viabilização terrestre com a cidade de Manaus, a região vem sendo alvo de investimentos econômicos e sociais, apresentando uma expectativa de renda, oportunidade de negócios e trabalho e por sua vez, influenciando o intenso fluxo migratório entre as duas regiões. Estudos identificam a hepatite C como doença de área urbana, sobretudo em grupos de risco (Pereira *et al*, 2013; Da Silva *et al*, 2013; Da Rosa *et al*, 2012), o que pode ter contribuído para a baixa positividade encontrada no município.

Segundo o Inquérito Nacional das Hepatites Virais, realizado nas capitais brasileiras, a macroregião Norte foi caracterizada como de maior endemicidade, 2,1% para o HCV (Universidade de Pernambuco, 2010). No entanto, sabemos, por estudos anteriores, da heterogeneidade da epidemiologia da hepatite C na região Norte, onde outros Estados apresentam maior endemicidade para a infecção.

O Estado do Acre, apresenta-se como uma região de alta endemicidade para a hepatite C. Em 1999, o Acre apresentou prevalência anti-HCV de 5,1% em doadores de sangue e estudos mais recentes como os de Tavares *et al* e Paraná *et al*, apresentam resultados bem próximos ao da década passada, comprovando ainda elevada prevalência de anticorpos anti-HCV na população acriana, sendo 4,2% na população de pré-doadores de sangue e 4,8% em profissionais de saúde (SBH, 1999; Tavares-Neto *et al*, 2004; Paraná *et al*, 2007). O Estado de Rondônia, por sua vez, é considerado o segundo estado de maior número de casos notificados de hepatite C, depois do Acre, estando esse fato relacionado, principalmente, a falta de qualidade de sangue transfundido e o compartilhamento de objetos pessoais. De acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 1999-2005, 21,8% dos casos de hepatite C na região Norte ocorreram em Rondônia. Estudo recente realizado sobre hepatites virais, encontrou sorologia reativa para o HCV em 32 voluntários ribeirinhos do município de Porto Velho, Rondônia, constatando prevalência de 7,4% para hepatite C (Katsuragawa *et al*, 2010). O Estado do Pará também apresenta

prevalência significativa, 2%, para o HCV (Sawada et al, 2011). Assim, diante dessas informações e baseado em estudos de soroprevalência para o HCV, na população geral, da região metropolitana de Manaus (De Paula *et al*, 2009; Mubarak *et al*, 2009; Torres *et al*, 2009), o Amazonas, mas precisamente a região metropolitana da capital, parece se apresentar como local de baixa endemicidade para a infecção.

Interessantemente, essa análise nos faz refletir a dificuldade de se estabelecer uma prevalência padrão para o HCV em diversas localidades ou até mesmo países, visto que o estudo epidemiológico da hepatite C, apresenta-se de forma bastante dinâmica. Além disso, há uma série de limitações e interpretações na meta-análise dos dados da maioria dos estudos transversais. Estimativas da prevalência do HCV, por exemplo, no Sul da Ásia, apresentam essa região com alta prevalência de anti-HCV. Entretanto, esse resultado foi impulsionado, principalmente, pelos dados do Paquistão. Por outro lado, no Japão, estudos regionais com amostras representativas, apresentam áreas hiperendêmicas para o HCV, definindo de maneira mais coerente a prevalência da hepatite C para o país, em relação a população geral (Hanafiah *et al*, 2013). Como discutido anteriormente, a heterogeneidade dos dados para o HCV, mostra o grande desafio global, nacional e até mesmo regional para marcar a epidemiologia da hepatite C.

Um outro dado que nos chama atenção, é a maior participação do gênero feminino em nossa casuística, tendo possivelmente esse dado influenciado o baixo número de casos anti-HCV positivo, detectados em nosso estudo. Apesar da existência de poucos estudos que envolvem predominância de casos de hepatite C entre homens e mulheres, a maior prevalência parece ocorrer entre o gênero masculino (Sarma *et al*, 2012). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, no período de 1999 a 2010, a taxa de detecção de hepatite C foi maior no gênero masculino, sendo nesse último ano a razão de 6,4 em homens e 4,5 em mulheres (Boletim epidemiológico, 2012). A prevalência do gênero masculino pode ser explicada pela maior exposição a fatores de risco associados à transmissão da hepatite C, como o uso de drogas ilícitas intravenosas, promiscuidade sexual, tatuagem e histórico de detenção (Josahkian *et al*, 2010), apesar disso recentemente o Inquérito Nacional de Prevalência de Hepatites Virais não encontrou diferença de soropositividade entre os gêneros (Universidade de Pernambuco, 2010).

A prevalência da hepatite C difere com a região ou país, ou ainda em relação à faixa etária (Universidade de Pernambuco, 2010), podendo também está relacionada com os possíveis mecanismos de transmissão do vírus.

Nos Estados Unidos, os efeitos de corte foram vistos que eram específicos para a década de 70, com o uso de drogas injetáveis, apresentando sinais de envelhecimento de corte na prevalência para o HCV, isto é, uma mudança de faixa etária com maior risco de sequelas entre 1990-2005. Em outras regiões, como a Ásia Oriental e América do Sul, os efeitos de corte não são bem definido em suas populações, o que sugere que estas localidades podem ter seus próprios efeitos, que, por sua vez, não estão bem caracterizados, ressaltando a importância do conhecimento da transmissão do HCV em diferentes países (Hanafiah *et al*, 2013).

Estudos realizados no Amazonas, na região metropolitana da capital, parecem sinalizar que a prevalência de hepatite C está mais restrita a grupos etários mais elevados (Universidade de Pernambuco, 2010), visto a ausência de casos positivos em população mais jovem, como foi o achado da análise feita por De Paula *et al*, na testagem de 150 manicuristas e com média de idade de 31 anos (De Paula *et al*, 2009), por outro lado, Mubarac *et al* identificaram 1,5% de idosos com sorologias reativas anti-HCV (Mubarac *et al*, 2009), assim como dados de hepatite C em doadores de sangue, no Amazonas, encontrou associação significativa entre viremia do HCV e faixa etária de 45 a 55 anos, o que sugere um efeito de corte em que o risco de infecção pelo HCV foi maior no passado distante, ou seja, 20-30 anos atrás (Torres *et al*, 2009).

O caso identificado nesse estudo, anti-HCV positivo, refere-se a uma portadora idosa, com possível contaminação na década de 70, ao participar de campanhas de vacinação com uso de seringas de vidro.

A utilização de seringas de vidro faz parte da história de transmissão do HCV especialmente em décadas passadas (Universidade de Pernambuco, 2010). Guadagnino *et al* ao encontrarem 32% de sororeatividade para HCV em indivíduos com faixa etária ≥ 70 anos, no sul da Itália, identificaram que o principal modo de transmissão aconteceu no passado, por uso de seringas de vidro (Guadagnino *et al*, 2013). Gatselis *et al*, constataram através de um estudo retrospectivo em pacientes infectados pelo HCV, a utilização de seringas de vidro de múltiplo uso para fins medicinais no passado, como único fator de risco potencial para a hepatite C, além disso essa prática esteve significativamente ($p < 0,001$) associada com a idade avançada dos pacientes infectados (Gatselis *et al*, 2007). Picchio *et al*, em estudo

em comunidade rural da Argentina, também encontraram estreita associação entre idade e soroprevalência para o HCV, alcançando 23,9% de positividade anti-HCV na faixa etária de 61 a 70 anos, tendo como principal fator de risco apontado nessa população, o uso de seringas de vidro esterilizadas inadequadamente, por um profissional de saúde na comunidade (Picchio *et al*, 2006).

Assim, essas informações da literatura e a análise epidemiológica do caso anti-HCV positivo identificado em nosso estudo, reforçam a informação de que a transmissão da hepatite C em idosos tem como principal causa o uso de seringas de vidro contaminadas, em passado distante (Universidade de Pernambuco, 2010).

O caso anti-HCV positivo apresentou, após análise por métodos de biologia molecular, viremia, sendo identificado por análise filogenética o genótipo 2b, já descrito anteriormente em 4,3% dos pacientes com hepatite C crônica, atendidos em ambulatório especializado, na cidade de Manaus (Araújo *et al*, 2011).

Ao analisarmos o padrão do perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro da voluntária, que apresentava infecção crônica pelo HCV, em três momentos distintos, detectamos níveis de IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e IL-17A, sugerindo resposta imunológica predominante Th1 e Th17, nas três amostras. Vale ressaltar, que nosso resultado por apresentar uma amostra anti-HCV positiva, levantou hipóteses sobre o predomínio da resposta imune, necessitando de um número amostral ou talvez um intervalo de tempo maior, para conclusões mais específicas.

Achado semelhante, com predominância de perfil Th1 e TH17 em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, havia sido descrito por Jimenez-Souza *et al*, que também observaram supressão de mediadores pró-inflamatórios relacionados a esses perfis durante tratamento antiviral, com interferon peguilado e ribavirina (Jimenez-Souza *et al*, 2010).

Entretanto há controvérsias na literatura, sobre o perfil de resposta predominante em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, Fan *et al* e Yue *et al*, por exemplo, descreveram em seus experimentos, perfil Th2 em pacientes com hepatite C crônica, culminando essa resposta exacerbada em possível desenvolvimento de câncer hepático (Fan *et al*, 2000 ; Yue *et al*, 2013). Já Sofian *et al* identificaram em 63 pacientes com HCV, níveis elevados tanto de Th1 (IL-2, IFN- γ) quanto de Th2 (IL-4) e IL-10 em comparação ao grupo controle de indivíduos sadios (Sofian *et al*, 2012).

Níveis da citocina reguladora IL-10 foram detectados nas três amostras, sendo mais expressivos na segunda, aqui possivelmente influenciado pelo IFN- γ , não

detectado nas outras amostras. Na análise da dinâmica da carga viral, identificamos maior número de cópias/ml na segunda amostra, podendo também explicar os níveis elevados de IFN- γ e IL-10 no mesmo período. Diante disso, observamos correlação positiva entre as citocinas IFN- γ e IL-10, contribuindo para o equilíbrio da resposta imune. No entanto, nem sempre essas citocinas atuam dessa forma, Napoli *et al* em seu experimento com 18 pacientes com hepatite C crônicos, 5 deles com cirrose, observaram níveis mais elevados de IFN- γ em comparação com a citocina IL-10, enquanto Osna *et al* e Abayli *et al* mostraram níveis mais baixos de IFN- γ em relação a IL-10 durante infecção pelo HCV (Napoli *et al*, 1996; Osna *et al*, 1997; Abayli *et al*, 2003).

A citocina IL-6, foi detectada em todas as amostras indicando provavelmente atividade inflamatória. Essa informação corrobora com frequentes trabalhos publicados na literatura que tem constatado níveis aumentados e correlação positiva dessa citocina em pacientes com hepatite C crônica e em pacientes com moderada atividade necroinflamatória no fígado, quando comparado a indivíduos saudáveis (Soresi *et al*, 2006; Antonelli *et al*, 2009; Sousa *et al*, 2012; Giannitrapani *et al*, 2013).

O teste de *Spearman* mostrou correlação significativa entre a citocina IL-17A, de perfil Th17, e a carga viral. Estudos tem demonstrado implicações das células Th17 no desenvolvimento de doenças autoimunes, em infecção crônica pelo HCV, essas células ainda não estão bem caracterizadas (Balanescu *et al*, 2012), entretanto pesquisas revelam resposta mais intensa de Th17, principalmente IL-17, em pacientes infectados cronicamente pelo HCV, estando o aumento dessa citocina possivelmente relacionado com maior carga viral do vírus, elevação de transaminases séricas, processo inflamatório causado pelo HCV e gravidade das lesões causadas no fígado (Lemmers *et al*, 2009; Hammerich *et al*, 2011; Sousa *et al*, 2012).

Assim, o perfil de resposta imune para a infecção crônica pelo HCV, especialmente sobre níveis de citocinas, principalmente entre Th1 e Th2, ainda não estão bem definidos, pois o curso de produção desses peptídeos é bastante instável e portanto difícil de determinar um resultado satisfatório. Uma série de fatores pode influenciar esses resultados heterogêneos como: diferença da intensidade da resposta imune entre pacientes, influência estrutural do próprio vírus, fase de desenvolvimento da doença, influência do tratamento, ou ainda, o perfil da população estudada (Osburn *et al*, 2013; Yue *et al*, 2013; Soylu *et al*, 2012; Rafik *et*

al, 2013). Apesar disso, o perfil de citocinas ajuda a esclarecer a patogênese do HCV, contribuindo para futuras estratégias de tratamento e/ou prevenção.

7. Conclusões

1. Diante do levantamento de dados revisados e obtidos, o município de Iranduba, região metropolitana de Manaus, pode ser classificado no presente momento, como região de baixa endemicidade para a hepatite C.

2. Nosso resultado sobre o perfil de citocinas, sugere o envolvimento de resposta imune Th1 e Th17 no caso estudado com hepatite C crônica.

3. A distribuição da hepatite C apresenta-se heterogênea no Estado do Amazonas, dessa forma, estudos soropidemiológico e moleculares sobre o HCV são de fundamental importância para a ampliação do conhecimento dessa infecção, norteando assim, futuras ações de saúde pública.

Referências

- ABAYLI, B.; CANATAROGLU, A.; AKKIZ, H. Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Turk J Gastroenterol**, v. 14, n.1, p.7-11, 2003.
- AL BALWI, M. A. Prevalence of mixed hepatitis C virus (HCV) genotypes among recently diagnosed dialysis patients with HCV infection. **Saudi Journal Kidney Dis Transpl**, v. 22, n. 4, p. 712-6, Jul 2011.
- ALEXOPOULOU, A.; PAPTAEODORIDIS, G.V. Current progress in the treatment of chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol**, v. 18, n.42, p. 6060-6069, 2012.
- ALTER, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; NAINAN, O.V.; et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. **N Engl Journal Medicine**, v. 341, p. 556-62, 1999.
- ALTER, M.J. Prevention of spread of hepatitis C. **Hepatology**, v.36, p.93-8, 2002.
- ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal Gastroenterol**, v.13, p.2436-41, 2007.
- AKIYAMA, M. J.; PIOTROWSKI, J. I.; ROYTMAN, M. M.; et al. new triple therapy for chronic hepatitis c: real life clinical experience in a community setting. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v.72, n.9, 2013.
- AMAN, W.; MOUSA, S.; SHIHA, G.; MOUSA, A. S. Current status and future directions in the management of chronic hepatitis C. **Virology Journal**, v. 9, n.57, 2012.
- AMORIM, R. M.; RAIOL, T.; TREVIZOLI, J. E. et al. Hepatitis C virus genotypes in hemodialysis patients in the Federal District, Brazil. **Revista Inst Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 1, p. 57-60, Jan-Feb 2010.
- ANTONELLI, A.; FERRI, C.; FERRARI, S.M. et al. High interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha serum levels in hepatitis C infection associated or not with mixed cryoglobulinemia. **Clin Rheumatol**, v.28, p.1179-85, 2009.
- ARAÚJO, R. A.; ALMEIDA, M. C.; FRAPORTI, L. et al. Characterization of hepatitis C virus in chronic hepatitis patients: genotypes in the State of Amazonas, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.5, p.638-640, set-out, 2011.
- ASHFAQ, U. A.; JAVED, T.; REHMAN, S.; et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. **Virology Journal**, v. 8, p. 161, 2011.

BALANESCU, P.; LADARU, A.; VOIOSU, T. Th17 and IL-17 immunity in chronic hepatitis C infection. **Rom J Intern Med**, v.50, n.1, p.13-8, 2012.

BATTS, K. P.; LUDWIG, J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. **Am. J. Surg. Pathol**, v. 19, p. 1409-1417, 1995.

BIOEASY. **HCV Rapid Test Bioeasy**. Versão 04. Revisão 07/07/2011.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO-HEPATITES VIRAIS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**. Ano II. N 01, 2010.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO- HEPATITES VIRAIS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**. Ano II. N 01, 2012.

BOWEN, D,G.; WALKER, C. M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. **Nature**, v. 436, n.7053, p. 946-52, 2005.

BRAGA, M. S. W.; CASTILHO, C. M.; SANTOS, V. C. I.; et al. Low prevalence of hepatitis B virus, hepatitis D virus and hepatitis C virus among patients with human immunodeficiency virus or acquired immunodeficiency syndrome in the Brazilian Amazon basin. **Rev Soc Bras Med Trop**, 39(6):519-522, nov-dez, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. **Diário Oficial**. Brasília nº 229, Seção 1. 2 de dezembro de 1993.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. **Departamento de Atenção Especializada.Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados**. NOTA TÉCNICA. Estágio Atual da Implantação dos Testes de Acido Nucléico para HIV e HCV – NAT HIV/HCV na rede de Serviços de Hemoterapia do Brasil. Novembro de 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Inibidores de protease (Boceprevir e Telaprevir) para o tratamento da hepatite Crônica C. **Relatório de recomendação da comissão nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS- CONITEC- 01**, Julho de 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para

Hepatite Viral C e Coinfecções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BROWNE, R.; ASBOE, D.; GILLEECE, Y.; et al. Increased numbers of acute hepatitis C infections in HIV positive homosexual men; is sexual transmission feeding the increase? **Sex Transm Infect**, v.80, p.326-327, 2004.

BRUNO, C. M.; VALENTI, M.; BERTINO, G. et al. Relationship between circulating interleukin-10 and histological features in patients with chronic C hepatitis. **Ann Saudi Medicine**, v. 31, n. 4, p. 360-4, Jul-Aug 2011.

BUKH, J.; MILLER, R.H.; PURCELL, R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semi. Liver Dis.**, [S.l.], v.15, n.1, p.41-63, 1995.

BURKE, K. P.; COX, A. L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunol Res**, v. 47, n. 1-3, p. 216-27, Jul 2010.

BUSSAB, O, W.; MORETTIN, A, P. Estatística Básica. **Editora Saraiva**, 7^o edição, 2011.

BUTT, S.; IDREES, M.; UR REHMAN, I. et al. Mixed genotype infections with hepatitis C virus, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1565-7, Aug 2011.

CAMPIOTTO, S; PINHO, J.R.R; CARRILHO, F.J. et al. Geographic distribution of hepatitis C genotypes in Brazil. **Braz. Journal of Medical and Biomol Research**. v.38, p. 41-49, 2005.

CAVALHEIRO, P.N.; LA ROSA, A.; ELAGIN, S. et al. Hepatitis C virus: molecular and epidemiological evidence of male-to-female transmission. **Braz J Infect Dis**, v.14, n. 5, p. 427-432, 2010.

CHEIKHROUHOU, K. L.; SFAR, I.; AOUNALLAH-SKHIRI, H. et al Cytokine and apoptosis gene polymorphisms influence the outcome of hepatitis C virus infection. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v.10, n.3, p. 280-288, June 2011.

CHEN, S.L.; MORGAN, T. R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int Journal Medicine Science** v. 3, p. 47-52, 2006.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, Apr 21 1989.

CHUNG, R. T.; GALE, M., JR.; POLYAK, S. J. et al. Mechanisms of action of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: Summary of a workshop. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 306-20, 2008.

CIORLIA, L. A.S; ZANETTA, D.M.T. Hepatite C em profissionais da saúde: prevalência e associação com fatores de risco. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.2, São Paulo, Abr 2007.

COLUCCI, G. Molecular diagnostic and predictive tests in the evolution of chronic hepatitis C anti-viral therapies. **BMC Infectious Diseases**, v.12(Suppl 2):S8, 2012.

COUPER, N,K.; BLOUNT, G.D.; RILEY, M. E. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **J Immunol**, v.180, p. 5771-5777, 2008.

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clinical Experimental Immunology**, v. 159, n. 2, p. 109-19, Feb 2010.

CROTTA, S.; STILLA, A.; WACK, A. et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. **J Exp Med**, v.195, p.35-41, 2002.

CIÉSLA, A.; BOCIĄGA-JASIK, M.; SOBCZYK-KRUPIARZ, I. et al. IL28B polymorphism as a predictor of antiviral response in chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol** , v.18, n.35, p. 4892-4897, 2012.

DA ROSA, F.; CARNEIRO, M.; DURO, L.N. et al. Prevalência de anti-HCV em uma população privada de liberdade. **Rev Assoc Med Bras**, v.58, n.5, p. 557-560, 2012.

DA SILVA, O.M.N.; GERMANO, N.F.; MENDOZA-SASSI, A.R. et al. Evidence of association between hepatitis C virus genotype 2b and nosocomial transmissions in hemodialysis centers from southern Brazil. **Virology Journal**, v.10, p.167, 2013.

DE PAULA, V.S.; ARRUDA, M.E.; VITRAL, C.L. et al. Seroprevalence of Viral Hepatitis in Riverine Communities from the Western Region of the Brazilian Amazon Basin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.8, 2001.

DE PAULA, A. R. A.; CALOBA, N. V. S.; NAHMIAS, D. et al. Prevalência de hepatite C em manicuristas na cidade de Manaus. Universidade do Estado do Amazonas, 2010.

DIEPOLDER, H. M.; ZACHOVAL, R.; HOFFMANN, R. 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. 1006-07, 1995.

DOMINGUEZ, B. **Revista RADIS**, Comunicação e Saúde. Seção hepatite C n.116, p. 9-14. Abril, 2012.

FALLAHI, P; FERRI, C.; FERRARI, M. S. et al. Cytokines and HCV-Related Disorders. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

FAN, X.; LIU, W.; LI, C. Determination of serum cytokines in individuals with HCV infection. **Zhonghua Shi Yan**, v.14, n.2, p.145-7, 2000.

FIOCRUZ. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/>>. Acesso 01 jan 2012.

FOCACCIA, R.; BARALDO, D.C.M; FERRAZ, M.L.G et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis c patients treated in public and private reference centers in Brazil. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 8, n.5, p. 348-355, 2004.

FONTENOT, J. D; GAVIN, M. A; RUDENSKY, A. Y. Foxp 3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

FRANK, C.; MOHAMED, M.K.; STRICKLAND, G.T.; LAVANCHY, D.; ARTHUR, R.R.; MAGDER, L.S et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. **Lancet**, v. 355, p. 887-91, 2000.

FRASCA, L.; DEL PORTO, P.; TUOSTO, L. et al. Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4⁺ T cells. **J Immunol**, v. 163, p. 650-658, 1999.

FREITAS, S. Z.; DA CUNHA, R. V.; MARTINS, R. M. et al. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 405-8, Jun 2008.

GAO, D. Y.; JIN, G. D.; YAO, B. L. et al. Characterization of the specific CD4⁺ T cell response against the F protein during chronic hepatitis C virus infection. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e14237, 2010.

GATSELIS, N.K.; RIGOPOULOU, E.; STEFOS, A. et al. Risk factors associated with HCV infection in semi-rural areas of central Greece. **Eur J Intern Med**, v.18, n.1, p.48-55, 2007.

GHANY, M. G.; STRADER, D. B.; THOMAS, D. L. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1335-74, Apr 2009.

GIANNITRAPANI, L.; SORESI M.; BALASUS, D. et al. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v.19, n.16, p. 2449-2455, 2013.

GRAY, R. R.; PARKER, J.; LEMEY, P. et al. The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 131, 2011.

GUADAGNINO, V.; STROFFOLINI, T.; CAROLEO, B. et al. Hepatitis C virus infection in an endemic area of Southern Italy 14 years later: evidence for a vanishing infection. **Dig Liver Dis**, v.45, n.5, p.403-7, 2013.

HALFON, P.; TRIMOULET, P.; BOURLIERE, M. et al. Hepatitis C virus genotyping based on 5' noncoding sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.1771-3, 2001.

HALL, C. H.; KASSEL, R.; TACKE, R. S. et al. HCV+ hepatocytes induce human regulatory CD4+ T cells through the production of TGF-beta. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12154, 2010.

HAMMERICH, L.; HEYMANN, F.; TACKE, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.

HANAFIAH, K. M.; GROEGER, J.; FLAXMAN, A. D. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v.57, n.4, 2013.

HELLER, T.; REHERMANN, B. Acute hepatitis C: a multifaceted disease. **Seminars in Liver Disease**, v.25, p.7-17, 2005.

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

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.

HIROISHI, K.; EGUCHI, J.; ISHII, S. et al. Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. E GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 88, p. 7276-7280, 1991.

HOLLINGER F.B. The five viruses: a perspective. **AASLD Postgraduate Course** "Viral hepatitis A to F: An Update, p.2-20,1994.

IDREES, M.; LAL, A.; NASEEM, M. et al. High prevalence of hepatitis C virus infection in the largest province of Pakistan. **J Dig Dis**, v.9, p. 95–103, 2008.

JIMENEZ-SOUSA, M.A.; ALMANSA,R.; LA FUENTE, C. et al. Increased Th1, Th17 and pro-fibrotic responses in hepatitis C-infected patients are down-regulated after 12 weeks of treatment with pegylated interferon plus ribavirin. **European Cytokine Network**, v. 21, n. 2, p. 84–91, 2010.

JOSAHKIAN, J. A.; DE LIMA, G. M.; EUSTÁQUIO, J. M. M. et al. Prevalência de inaptidão sorológica pelo vírus hcv em doadores de sangue no hemocentro regional de uberaba (MG), fundação hemominas. **Revista de patologia tropical**, v. 39, n.4, p. 261-271, 2010.

KATSURAGAWA, T. H.; CUNHA, R. P. A.; SALCEDO, J. M. V. et al. Alta soroprevalência dos marcadores das hepatites B e C na região do alto rio Madeira, Porto Velho,Rondônia, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v.1, p. 91-96, 2010.

KHAYRIYYAH, M. H.; JUSTINA, G.; ABRAHAM, D. F. et al. Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age-Specific Antibody to HCV Seroprevalence. **Hepatology**, v.57, n. 4, 2013.

LEMMERS, A.; MORENO, C.; GUSTOT, T. et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p.646–657, 2009.

LEMM, A.J.; O'BOYLE II, D.; LIU, M. et al. Identification of hepatitis C virus NS5A inhibitors. **Journal of virology**, v. 84, n.1, p. 482–491, 2010.

LI, H.; HUGHES, A. L.; BANO, N. et al. Genetic diversity of near genome-wide hepatitis C virus sequences during chronic infection: evidence for protein structural conservation over time. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19562, 2011.

LIN, W.; KIM, S. S.; YEUNG, E. et al. Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain. **Journal of virology**, v.80, p. 9226-9235, 2006.

LIN, Y.; SAMANTHA, R. S.; SHABAANA, A. K. Th17 cytokines and Vaccine Induced Immunity. **Semin Immunopathol**, v.32, n.1, p.79–90, 2010.

LIU, S.; YANG, W.; SHEN. L. et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. **Journal of virology**, v. 83, p. 2011–2014, 2009.

LOPES, A. P. E.; GRANATO, H. C.; LANZONI, V. et al. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Hepatitis C Virus Antibody Detection Using a Recombinant Protein Derived from the Core Region of Hepatitis C Virus Genome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.717-720, 2000.

MAASOUMY B, PORT K, MARKOVA AA, et al. Eligibility and safety of triple therapy for hepatitis C: lessons learned from the first experience in a real world setting. **Plos**

one, v.8, n.2, 2013.

MAGDER, L.S.; FIX, A.D.; MIKHAIL, N.N. *et al.* Estimation of the risk of transmission of hepatitis C between spouses in Egypt based on seroprevalence data. **Int J Epidemiol**, v.34, p.160-5, 2005.

MAIA, V. P. L.; MARTINS- FILHO, A. O.; TEIXEIRA- CARVALHO, A. *et al.* Hepatitis C Virus Screening and Clinical Monitoring of Biomarkers in Patients Undergoing Hemodialysis. **Journal of Medical Virology**, v.81, p.1220–1231, 2009.

MARQUES, M.; CARDOSO, H.; VALE, A. M. *et al.* Severe acute hepatitis C with spontaneous cure. **Acta Med Port**, v. 24, n. 2, p. 379-84, Mar-Apr 2011.

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON LDE, L. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Rev Assoc Med Bras**, v. 57, n. 1, p. 107-12, Jan-Feb 2011.

MAST, E.E.; HWANG, L.Y.; SETO, D.S.; NOLTE, F.S.; NAINAN, O.V.; WURTZEL. H. *et al.* Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. **Journal Infect Dis**, v.192, p.1880-9, 2005.

MENEGAZZI, P.; REHO, E.; ULIVI, M. *et al.* Rapid and accurate quantification of different HCV genotypes by LightCycler Real Time PCR and direct sequencing of HCV amplicons. **New Microbiologica**, v. 31, n. 2, p. 181-7, Apr 2008.

MILLS, G. H. K. Induction, function and regulation of IL-17 producing T cells. **Eur. J. Immunol**, v. 38, p. 2636–2649, 2008.

MOHAMOUD, A. I.; MUMTAZ, R. G.; RIOME, S. *et al.* The epidemiology of hepatitis C virus in Egypt: a systematic review and data Synthesis. **BMC Infectious Diseases**, v.13, n.288, 2013.

MUBARAC, S.R.; ROCHA, M.C.; SILVA, C. Prevalência de hepatite C em idosos na cidade de Manaus. In: XX Congresso Brasileiro de Hepatologia. **Revista da AMRIGS**. Porto Alegre: Up and Go Tecnomarketing, v.53, n.135, 2009.

MURPHY, D.; CHAMBERLAND, J.; DANDAVINO, R.; SABLON E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa [Abstract]. **Hepatology**, v.46:623A, 2007.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. Tradução Ana Paula Franco Lamber [et al.]. - 7.ed. - **Porto Alegre: Artmed**, 2010.

NAPOLI, J.; BISHOP, A. G.; MCGUINNESS, P. H. *et al.* Progressive Liver Injury in Chronic Hepatitis C Infection Correlates With Increased Intrahepatic Expression of

Th1-Associated Cytokines. **Hepatology**, v. 24, n. 4, 1996.

NAKATANI, M.S.; SANTOS, A. C.; RIEDIGER, N.I. Development of Hepatitis C Virus Genotyping by Real-Time PCR Based on the NS5B Region. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10150, 2010.

NGUYEN, L.H.; NGUYEN, M.H. Systematic review: Asian patients with chronic hepatitis C Infection. **Aliment Pharmacol Ther**, v.37, p. 921–936, 2013.

NOVAIS, M. C.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase. **Rev Biotec Ciên & Desenv**, v. 33, Jul-Dec 2004.

O'BRIEN, T. R.; EVERHART, J. E.; MORGAN, T. R. et al. An IL28B genotype-based clinical prediction model for treatment of chronic hepatitis C. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e20904, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, A. B.; PIMENTA, A. S.; ROJAS, M. F. et al. Prevalence and genotyping of hepatitis C virus in blood donors in the state of Para, Northern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 103-6, Feb 2010.

OSBURN, O.W.; LEVINE, S. J.; CHATTERGOON, M. A. et al. Anti-inflammatory cytokines, pro-fibrogenic chemokines and persistence of acute HCV infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 20, p.404-413, 2013.

OSNA, N.; SILONOVA, G.; VILGERT, N. et al. Chronic hepatitis C: T-helper1/T-helper2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. **Scand J Clin Lab Invest**, v.57, n.8, p.703-10, 1997.

PARANÁ, R.; PAIVA, T.; LEITE, M. R. et al. Infection with hepatitis C virus among health care workers in the Brazilian Western Amazon region (Rio Branco, State of Acre). **Am Journal Trop Med Hyg**, v. 76, n. 1, p. 165-9, 2007.

PARK, Y.; LEE, J. H.; KIM, B. S. et al. New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 6, p. 2253-6, Jun 2010.

PAWLOTSKY, J.M. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. **Antiviral Res**, v. 59, p.1-11, 2003.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, p. 5–19, 2004.

PEREIRA, M.M.B.L.; MARTELLI, M.T.C.; MOREIRA C.R. et al. Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional

study. **BMC Infectious Diseases**, v.13, n.60, 2013.

PERZ, J.F.; FARRINGTON, L.A.; PECORARO, C. et al. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. **42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America**; Boston, MA, USA; Sept 30–Oct 3, 2004.

PICCHIO, G.R.; BARÉ, P.C.; DESCALZI, V.I. et al. High prevalence of infection with a single hepatitis C virus genotype in a small rural community of Argentina. **Liver Int**, v. 26, n.6, p.660-5, 2006.

POLYAK, S. J.; KHABAR, K. S.; PASCHAL, D. M. et al. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein induces interleukin-8, leading to partial inhibition of the interferon-induced antiviral response. **Journal of virology**, v.75, p.6095-6106, 2001.

POYNARD, T.; AFDHAL, N. H. Perspectives on fibrosis progression in hepatitis C: an a la carte approach to risk factors and staging of fibrosis. **Antivir Ther**, v. 15, n. 3, p. 281-91, 2010.

RAFIK, M. M.; HOSNY, M. S. A.; ABDALLAH, O.K. et al. TH1 cytokine response to HCV peptides in Egyptian health care workers: a pilot study. **Virology Journal**, v.10, n.144, 2013.

REHERMANN, B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 1745-54, Jul 2009.

ROBERTS, E.A, YEUNG, L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 36, p. 106-13, 2002.

SABEL, J. qPCR Application Guide. Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting. **Integrated DNA Technologies**, 2011.

SANTOS, B. F.; DE SANTANA, N. O.; FRANCA, A. V. Prevalence, genotypes and factors associated with HCV infection among prisoners in Northeastern Brazil. **World Journal Gastroenterol**, v. 17, n. 25, p. 3027-34, 2011.

SAWADA, L.; PINHEIRO, A. C. C.; LOCKS, D. et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among different exposure categories in the State of Pará, Brazilian Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.1, p. 8-12, 2011.

SARMA, M. P.; ASIM, M.; MEDHI, S. et al. Viral Genotypes and Associated Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma in India. **Cancer Biol Med**, v. 9, p.172-181, 2012.

SBH. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. **GED**, v. 18, p.53-

58,1999.

SCARSELLI, E.; ANSUINI, H.; CERINO, R. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J**, v. 21, p. 5017–5025, 2002.

SEFIDI, J. F.; KEYVANI, H.; MONAVARI, H.S. et al. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Iranian Chronic Infected Patients. **Hepat Mon**, v.13, n.1, e7991, 2013.

SHARMA, A.; CHAKRABORTI, A.; DAS, A. et al. Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. e514-22, Sep 2009.

SHEPARD, W.C.; FINELLI, L.; ALTER, J.M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**, v.5, p. 558–67, 2005.

SHI, C.; PLOSS, A. Hepatitis C Virus Vaccines in the Era of New Directacting Antivirals. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v.7, n.2, p.171-185, 2013.

SILVA, L.C. Hepatites agudas e crônicas. Editora **Sarvier**. 3 edição. São Paulo, 2003.

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

SIMMONDS, P.; ALBERTI A.; ALTER, H.J. et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C virus genomes. **Hepatology**, v.19, p.1321-4, 1994.

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

SOFIAN, M.; AGHAKHANI, A.; FARAZI, A.A. et al. Serum profile of T helper 1 and T helper 2, cytokines in hepatitis C virus infected patients. **Hepat Mon**, v. 12, n.12, e6156, 2012.

SOYLU, R.A.; TUGLU, C.; ARIKAN. E. et al. The Role of Serum Cytokines in the Pathogenesis of Hepatic Osteodystrophy in Male Cirrhotic Patients. **Gastroenterology Research and Practice**, 2012.

SORESI, M.; GIANNITRAPANI, L.; D'ANTONA F. et al. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v.12, p. 563-2568, 2006.

SOUSA, M.G.; OLIVEIRA, S.I.; ANDRADE, O. J.L. et al. Serum levels of Th17 associated cytokines in chronic hepatitis C virus infection. **Cytokine**, v. 60, n.138–142, 2012.

- SPANAKIS, N.E.; GARINIS, G.; ALEXOPOULOS, E.C. et al. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. **J Clin Lab**, v. **16**, p. 40-46, 2002.
- SPANGENBERG, H.C.; VIAZOV, S.; KERSTING, N. et al. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.42, p.828-837, 2005.
- SPARNA, T.; R'ETEY, J.; SCHMICH, K. et al. Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNFalpha/IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes, **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- STEINMANN, E.; PENIN, F.; KALLIS, S. et al. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. **PLoS Pathog**, v.3, n.7, 2007.
- STONE, L. E. A.; GIUGLIANO, S.; SCHNELL, G. et al. Hepatitis C Virus Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP) Triggers Production of Lambda-Interferons by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. **LOS Pathogens**, v. 9, n. 4, 2013.
- STRAUSS, E. Hepatite C. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, p. 69-82, jan-fev, 2001.
- SY, T.; JAMAL, M.M. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci**, v.3, p. 41-46, 2006.
- SZABO, G.; DOLGANIUC, A. Hepatitis C and innate immunity: recent advances. **Clin Liver Dis**. v. 12, n. 3, p. 675-92, x, Aug 2008.
- TAJIRI, H.; MIYOSHI, Y.; FUNADA, S. et al. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. **Pediatr Infect Dis J**, v. 20, p.10-4, 2001.
- TALAAT, R. M.; ESMAIL, A. A.; ELWAKIL, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha - 308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients. **Chinese Journal of Cancer**. v. 31, n. 1, p. 29-35, Jan 2012.
- TANG, X.; WAGONER, J.; NEGASH, A. et al. Functional Characterization of Core Genes From Patients With Acute Hepatitis C. **Journal Infect Dis**, v. 201, n.6, p. 912–922, 2010.
- TAVARES-NETO, J.; ALMEIDA, D.; SOARES, M. C. et al. Seroprevalence of Hepatitis B and C in the Western Brazilian Amazon Region (Rio Branco, Acre): A Pilot Study Carried Out During a Hepatitis B Vaccination Program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.2, p.133-139, 2004.
- TELLINGHUISEN, T.L.; RICE, C.M. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, p. 419-427, 2002.
- TERRAULT, A. N.; DODGE, L. J.; MURPHY, L. E. et al. Sexual Transmission of Hepatitis C Virus Among Monogamous Heterosexual Couples: The HCV Partners Study. **Hepatology**, v.57, n. 3, 2013.

TORRES, L. K. Caracterização sorológica e molecular da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em doadores de sangue do estado do Amazonas.[Tese Doutorado] **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2008.

TORRES, L. K.; MALHEIRO, A.; TATENO, A. et al. Hepatitis C virus in blood donors, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, n. 4, April 2009.

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO. Núcleo de Pós- Graduação. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. **Relatório de Pesquisa**. Brasil, 2010.

VERMEHREN, J.; KAU, A.; GARTNER, B. C. et al. Differences between two real-time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3880-91,2008.

VIEIRA, D. S.; ALVARADO-MORA, M. V.; BOTELHO, L. et al. Distribution of hepatitis c virus (hcv) genotypes in patients with chronic infection from Rondonia, Brazil. **Virology Journal**, v. 8, p. 165, 2011.

VICTORIA, B.M.; VICTORIA, S.F.; TORRES, L.K.; et al. Epidemiology of HIV/HCV coinfection in patients cared for at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. **Braz J Infect Dis**, v.14, n.2, p.135-140, 2010.

WANG, J. H.; PIANKO, M. J.; KE, X. et al. Characterization of antigenic variants of hepatitis C virus in immune evasion. **Virology Journal**, v. 8, p. 377, 2011.

WASLEY, A.; ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis**. 20:1-16, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). *Hepatitis C – 2002*. Geneva: WHO, 2003. **Disponível em:** <<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>>. Acesso em: 01 janeiro 2013.

WOLK, B.; SANSONNO, D.; KRAUSSLICH, H.G. et al. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. **J Virol**, v.74, p. 2293-2304, 2000.

YAMASAKI, T. H.L.; ARCURI, A.H.; JARDIM, G.C.A. et al. New insights regarding HCV-NS5A structure/ function and indication of genotypic differences. **Virology Journal**, v. 9, n.14, 2012.

YEE, L. J.; IM, K.; BORG, B. et al. Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection. **Genes Immun**, v. 10, n. 4, p. 365-72, Jun 2009.

YEN, T.; KEEFFE, E.B.; AHMED, A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. **Journal Clin Gastroenterol**, v.36, p. 47-53, 2003.

YUE, M.; DENG, X.; ZHAI, X. et al. Th1 and Th2 cytokine profiles induced by hepatitis C virus F protein in peripheral blood mononuclear cells from chronic hepatitis C patients. **Immunology Letters**, v.152, p.89-95, 2013.

ZARIFE, M.A.; SILVA, L.K.; SILVA, M.B. et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in northeastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, p.663-668, 2006.

ZENG, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. et al. Sofosbuvir and ABT-450: Terminator of hepatitis C virus?. **World J Gastroenterol**, v.19, n.21, p.3199-3206, 2013.

ZHANG, J.; RANDALL, G.; HIGGINBOTTOM, A. et al. CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. **Virology Journal**, v.78, n. 3, p.1448–1455, 2004.

ZHENG, A.; YUAN, F.; LI, Y. et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. **Virology Journal**, v. 81, p.12465–12471, 2007.

Apêndices



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos o (a) Sr(a) para participar do Projeto de Pesquisa “**Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de pacientes infectados pelo HCV**” que está sendo realizado no município que você reside, o qual consiste na realização de teste rápido para a detecção de Hepatite C. Este teste consiste em uma leve picada no dedo indicador com uma lanceta. Com o auxílio de uma micropipeta será recolhido 10µL de sangue, este será dispensado dentro da cavidade “S” do dispositivo de teste, em seguida será adicionado 4 gotas de tampão diluente. O resultado deverá ser interpretado em 15 a 20 minutos.

Eu, Cristina Melo Rocha, responsável pela realização do projeto, também, venho pedir autorização para coletar (tirar) um pouquinho do seu sangue 10mL (dez mililitros), em caso de resultado positivo para o teste, bem como participar de um questionário específico deste estudo antes da realização do teste, a fim de contribuir para o levantamento epidemiológico.

Vale ressaltar que a realização do teste rápido, bem como, a coleta de sangue será feita com material descartável, eliminando a possibilidade de qualquer contaminação.

O Sr(a) tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da realização do teste rápido ou da coleta de sangue, independente do motivo e sem prejuízo do atendimento que está recebendo.

O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não ganhará nada para realizar o teste rápido para a detecção de Hepatite C. Caso o resultado do teste seja positivo, o(a) Sr(a) será encaminhado para o ambulatório Araújo Lima na rua Afonso Pena n° 1053, bairro Praça 14, próximo a faculdade de medicina, Manaus/AM, afim de ser orientado para o tratamento da doença, pois nesse ambulatório o atendimento para hepatite C é um procedimento de rotina. O Sr(a) poderá também não realizar o teste e procurar atendimento nas duas instituições referentes para hepatite C em Manaus; Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e ambulatório Araújo Lima, neste último o atendimento será realizado pela Dra. Cristina Melo Rocha.

A sua participação é importante para o melhor conhecimento desta doença e de como pode ser melhor diagnosticada. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, ficando a mesma sob sigilo.

Mais informações sobre o projeto e procedimentos de coleta poderão ser obtidas com a pesquisadora pelo telefone (92) 92688823 ou pelo e-mail: cmelorocho@hotmail.com

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui suficientemente informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, por isso concordo em participar da pesquisa.



Assinatura do participante

Impressão do dedo
polegar direito

Pesquisadora Responsável



Ficha epidemiológica do voluntário

IDENTIFICAÇÃO n° _____

DATA: __/__/____

NOME: _____

SEXO: M () F () DATA DE NASCIMENTO: __/__/____ IDADE: _____

ESCOLARIDADE: _____

ENDEREÇO: _____

TEL: _____

COR: BRANCO () NEGRO () PARDO () ORIENTAL () INDÍGENA ()

Heterossexual () Homossexual ()

ESTADO CIVIL: CASADO () UNIÃO ESTÁVEL () SOLTEIRO () SEPARADO () VIÚVO ()

NATURALIDADE: MÃO () INTERIOR DO AMAZONAS () OUTROS ESTADOS DO NORTE ()
OUTROS ESTADOS DO BRASIL () OUTROS PAÍSES ()

PROFISSÃO: PROFISSIONAL DE SAÚDE () manipula sangue () OUTROS ()-----

1. HISTÓRICO DE ICTERÍCIA? NÃO () SIM ()

2. HISTÓRIA FAMILIAR DE HEPATITE: NÃO () SIM () QUEM? _____ QUE
TIPO _____ () NÃO SEI

3. TEM ALGUMA DOENÇA ATUALMENTE? _____

3.1. VAI SEMPRE AO MÉDICO? NÃO () SIM () FREQUENTA CONSULTÓRIO
ODONTOLÓGICO ? NÃO () SIM ()

3.2. JÁ FOI HOSPITALIZADO? NÃO () SIM () QUANTO TEMPO?-----

4. FAZ TRATAMENTO PARA TUBERCULOSE? NÃO () SIM () HIV NÃO () SIM ()

5. JÁ RECEBEU OU DOOU SANGUE: NÃO () SIM () ANO: < 1992 () ≥ 1992 ()

6. JÁ FEZ ALGUMA CIRURGIA? NÃO () SIM () ANO: < 1970 () 1980-1992 () >1992 ()

7. FAZ HEMODIÁLISE? NÃO () SIM ()

8. O (a) SENHOR(a) BEBE?: SIM () NÃO () CACHAÇA () CERVEJA () VINHO () OUTRO ()

8.1. FREQUÊNCIA: DIÁRIA () SEMANAL () MENSAL ()

8.2. TEMPO DE USO: 0-5 ANOS () 5-10 ANOS () 10-20 ANOS () >20 ANOS ()

9. USA DROGAS INJETÁVEIS: NÃO () SIM () JÁ USEI ()

9.1. TEMPO DE USO: 0-5 ANOS () 5-10 ANOS () 10-20 ANOS () >20 ANOS ()

10. TEM TATUAGEM OU PIERCING ? NÃO () SIM ()

11. VAI A MANICURE: NÃO () SIM () QUANTAS VEZES POR SEMANA?-----

12. FAZ ACUPUNTURA ? NÃO () SIM ()

13. FAZ MEDICAÇÃO INJETÁVEL EM FARMÁCIA? NÃO () SIM ()

13.1 () TODA SEMANA () TODO MÊS () OUTROS ()-----

14. VOCÊ FREQUENTA BARBEARIA? NÃO () SIM () QUANTAS VEZES? -----

15. POSSUI QUANTOS PARCEIROS SEXUAIS POR ANO? -----

Orçamento

Material	Custo	Instituição sediadora
Teste rápido para HCV	R\$ 2.900,00	-
Reagentes para extração de RNA	R\$ 880,00	Fiocruz
Reagentes para reação de transcrição reversa	R\$ 800,00	Fiocruz
<i>Taq Man Fast</i> vírus	R\$ 840,00	Fiocruz
Reagentes para reação de PCR em tempo real	R\$2.647,52	Fiocruz
Solução Tampão com EDTA	R\$ 310,56	
Reagentes para reação de PCR convencional	R\$ 700,00	Fiocruz
Reagentes para reação de sequenciamento/genotipagem	R\$ 1.200,00	Fiocruz
Cabine de segurança Biológica classe II	-	Fiocruz
Micropipetas	-	Fiocruz
Termociclador	-	Fiocruz
Vórtex	-	Fiocruz
Termociclador com sistema de detecção em tempo-real	-	Fiocruz
Centrífugas	-	Fiocruz
Seqüenciador automático de DNA	-	Fiocruz
Kit CBA (dosagem de citocinas)	R\$ 5.900,00	Hemoam
Material Plástico	R\$ 2.000,00	Hemoam
Reagentes	R\$ 3.000,00	Hemoam
Valor total do Projeto	R\$ 21.178,08	

Anexos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

I. IDENTIFICAÇÃO

Título: Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de pacientes infectados pelo HCV.

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Pesquisador: Cristina Melo Rocha

Data da Apresentação ao CEP: 05/03/2012

Documentos encaminhados: Carta de encaminhamento, Curriculum do pesquisador responsável, projeto, TCLE, cartas de anuência.

2. OBJETIVOS

Geral:

Caracterizar o perfil epidemiológico, virológico e imunológico de pacientes infectados pelo HCV residentes no município de Iranduba.

Específicos:

- 1) Estimar a prevalência da Hepatite C no município em estudo;
- 2) Identificar fatores de risco para a infecção pelo HCV;
- 3) Descrever os genótipos encontrados nos pacientes do Estudo;
- 4) Analisar o perfil de citocinas em pacientes com sorologia anti-HCV positiva;
- 5) Relacionar genótipo com perfil epidemiológico e citocinas.



3. SUMÁRIO DO PROJETO

Descrição e caracterização da amostra:

414 Amostras de residentes em Iranduba

Critérios de Inclusão:

1) Maiores de 18 anos e residente obrigatório do município em estudo.

Critérios de exclusão:

1) Indígenas, menores de 18 anos e pessoas passando apenas uma temporada pelo municípios.

4. Comentários do CEP frente à resolução CNS 196/96 e resoluções complementares.

O projeto foi reapresentado ao CEP-HEMOAM com as devidas alterações sugeridas no parecer anterior.

5. Parecer do CEP: APROVADO

Data da Reunião: 19/04/2012

Data Parecer: 26/04/2012

Data Novo Parecer: 16/07/12

Data do Parecer Final: 30/07/12


Wilmara Silva
Secretária do Comitê de
Ética em Pesquisa / FHEMOAM



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Gabinete da Pró-Reitora



TERMO DE ANUÊNCIA

Declaro, na qualidade de representante legal da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Instituição Federal do Ensino Superior, estabelecida na Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 – Coroado – Manaus – AM, estar de acordo com a execução do Projeto da discente **Midiã Barbosa Pimentel de Andrade** intitulado: “**Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de pacientes infectados pelo HCV**”, sob a coordenação da **Profa. Dra. Cristina Melo Rocha** do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

Manaus, 18 de julho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Profa. Dra. Jania Suely Bacal de Oliveira
Pró-Reitora

TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que a Secretaria de Saúde do Município de Iranduba está de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de pacientes infectados pelo HCV**” da aluna Midiã Barbosa Pimentel de Andrade, coordenado pela doutora Cristina Melo Rocha, nesse município e prestará total apoio para sua realização.

Iranduba, 11 de Maio de 2012.



Secretária de Saúde do Município de Iranduba



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Termo de Anuência

Assunto: Anuência para realização da pesquisa

Cumprimentado cordialmente V.Sa., aproveito a oportunidade para solicitar desta direção a autorização para a execução do projeto de pesquisa com o título: Caracterização epidemiológica, virológica e imunológica de pacientes infectados pelo HCV, tendo como pesquisadora a aluna Mídia Barbosa Pimentel de Andrade e como coordenadora do projeto doutora Cristina Melo Rocha. Os participantes da pesquisa serão os indivíduos que apresentarem positividade para o teste rápido anti- HCV, no período de coleta de dados do projeto, no município de Iranduba. Solicita-se ainda acesso as informações desses pacientes que utilizarão com frequência os serviços entre outras que possam ser utilizadas.

Sem mais para o momento, reitero votos de elevada estima e consideração.

Atenciosamente,

Cristina Melo Rocha

*De acordo
com a Pesquisa*
UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS