



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



**IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOBIOLOGICAS DA
CO-INFECÇÃO HIV E VÍRUS DA HEPATITE C EM
UMA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO DE
MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS**

MARILÚ BARBIERI VICTORIA

MANAUS

2009

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

MARILÚ BARBIERI VICTORIA

**IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOBIOLOGICAS DA
CO-INFECÇÃO HIV E VÍRUS DA HEPATITE C EM
UMA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO DE
MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS**

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

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

MANAUS

2009

MARILÚ BARBIERI VICTORIA

**IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOBIOLOGICAS
DA CO-INFECÇÃO HIV E VÍRUS DA HEPATITE C EM
UMA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO DE
MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS**

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

Aprovada em 30 de junho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro - Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a. Dr^a. Mariléia Chaves Andrade -Membro
FIOCRUZ-MG

Prof^a. Dr^a. Aya Sadahiro - Membro
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Vale Barbosa - Membro
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira – Membro
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

*Ao **Flamir**, meu grande incentivador e companheiro de todos os momentos.*

*À **Cristian, Lucienne e Gustavo**, pela paciência e horas de ausência.*

*À memória dos meus pais **Antonio e Elda**.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e vontade de vencer que sempre norteou a minha vida.

À minha querida orientadora Adriana, que muito mais que orientar me mostrou o real sentido da pesquisa e do trabalho em equipe e que além de tudo confiou em mim.

Ao meu marido Flamir, pelas sugestões e colaboração prestadas durante o desenvolvimento do estudo.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os seus integrantes pela oportunidade de concretização deste trabalho.

À Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, LAC, Gerência de Virologia e Gerência de DST/AIDS pela contribuição na realização de exames e dados cedidos.

À Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), pela realização de exames.

Ao Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) nas pessoas da Dra. Simone Kashima pelo auxílio na realização dos exames e Dr. Dimas Tadeu Covas por ceder o laboratório para processamento das amostras do HIV.

Ao IMT-SP na pessoa do Dr. José Eduardo Levi, por ceder o laboratório para processamento de amostras do HCV.

Ao estatístico do HEMOAM Felicien Vásquez pelas contribuições nas análises dos resultados.

Aos pacientes que concordaram em contribuir com este estudo e todos àqueles que por ventura não resistiram ao tempo e à doença e não puderam ser incluídos.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa do HEMOAM: Laura, Kátia, João Paulo, Luana, Daniel, Tatiane e Andréa, que de diversas formas contribuíram com esta pesquisa

À FAPEAM e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

*“Aquilo que julgamos já saber é o que,
freqüentemente nos impede de aprender.”*

Claude Bernard

RESUMO

A epidemia mundial da AIDS teve início em 1981, nos Estados Unidos, e pós a introdução dos anti-retrovirais os pacientes infectados com HIV/AIDS passaram a ter uma sobrevida maior surgindo um novo desafio, a co-infecção com o vírus da hepatite C (HCV), a qual já é a principal causa de morte nestes indivíduos. O HCV foi descoberto em 1989 e sua principal via de transmissão, a parenteral, é comum ao HIV, com isso aumentando a prevalência da co-infecção HIV/HCV e estando atualmente, mais de 30% dos infectados pelo HIV também infectados pelo HCV. Existem poucos estudos sobre co-infecção HIV/HCV no Amazonas e o presente estudo oferece uma oportunidade de avaliar a associação destes vírus. O trabalho é do tipo descritivo de uma série de casos e tem o objetivo de estudar as implicações clínicas e imunobiológicas da co-infecção HIV/HCV em uma população de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), no período de 2000 a 2007. Este estudo encontrou uma frequência de pacientes co-infectados HIV/HCV de 4,4% (n=70), com uma média de crescimento anual de 3,6% dos casos. Destes 72,9% eram do sexo masculino, 47,1% tinham entre 30|- 40 anos. Destes 80% possuíam o primeiro grau completo, 50% recebiam até um salário mínimo e 55,7% eram naturais da cidade de Manaus sendo que 94,3% também procedentes da capital. Dos pacientes estudados, 68,6% eram heterossexuais e em 84,3% dos pacientes encontrou-se a promiscuidade sexual como fator de risco. No período do estudo 34,3% dos pacientes foram à óbito. Dos indivíduos co-infectados, apenas 25,7% (n=18/70) comparecerem ao ambulatório de hepatites virais da FMTAM para coleta de material biológico. Nestes pacientes (n=18) a média da AST foi $61,5 \pm 61$ U/L, da ALT $62,2 \pm 37$ U/L e a relação AST/ALT foi $0,88 \pm 0,33$ U/L. Quanto aos lipídeos 38,9% apresentaram colesterol total >200 mg/dL, 83,3% apresentaram HDL ≤ 40 mg/dL, 77,8% tinham triglicérides >150 mg/dL e 33,3% tinham glicemia >110 mg/dL. Dos pacientes incluídos 83,3% usavam esquema HAART sendo que 100% destes faziam uso de inibidor da protease no esquema. Ao aplicar o escore FIB-4 para prever fibrose verificou-se que 77,8% ficou com ponto de corte $<1,45$ e 22,2% com ponto de corte $>3,25$. Quanto às células T CD4⁺ 72,2% tinham <500 cls/mm³ com uma mediana de 271 cls/mm³, quanto ao T CD8⁺ 88,9% tinham ≥ 215 cls/mm³ com uma mediana de 794,5 cls/mm³. A razão CD4⁺/CD8⁺ foi 0,32 cls/mm³. Quanto à carga viral do HIV e do HCV verificou-se uma mediana de 16.911 cópias /mL e de 543.209 cópias/mL, respectivamente. Nesta população 88,9% apresentaram o genótipo 1 do HCV e 94,4% apresentaram o sub-tipo B do HIV. Destes, 83,3% apresentavam Child-Pugh A sendo que 61,1% apresentavam fígado normal na ultrasonografia. Ao dosar as citocinas IL4, IL6, IL8, IL10, IL12 e IFN- γ nestes pacientes verificou-se que apenas a IL6 (p= $<0,001$) apresentou significância estatística principalmente quando correlacionada ao logaritmo da carga viral do HCV (0,031). Os resultados encontrados neste estudo, apesar da baixa prevalência, apresentam crescimento anual da co-infecção provavelmente devido à melhora na investigação da hepatite C nos pacientes com HIV. Estes resultados contribuem para um melhor conhecimento sobre os dados clínicos, epidemiológicos, bem como perfil imunológico dos pacientes co-infectados da região Norte, uma vez que estes dados podem levar à uma maior compreensão da interação destes dois vírus resultando em diagnóstico precoce, e conseqüente redução dos óbitos.

Palavras-chave: co-infecção, HIV, HCV, genótipos, sub-tipos, citocinas

ABSTRACT

The global epidemic of AIDS began in 1981, the United States, and after the introduction of antiretroviral drugs to patients infected with HIV / AIDS have been given a higher survival emerged a new challenge, co-infection with the hepatitis C virus (HCV), which is already the leading cause of death in these individuals. The HCV was discovered in 1989 and its main route of transmission, parenteral, is common to HIV, thus increasing the prevalence of co-infection HIV / HCV and are currently more than 30% of those infected by HIV also infected by HCV. There are few studies on co-infection HIV / HCV in the Amazon and this study provides an opportunity to evaluate the association of these viruses. The work is a description of a number of cases and is intended to study the clinical implications and immunobiologicals of co-infection HIV / HCV in a population of patients in the Tropical Medicine Foundation of Amazonas (FMTAM), in the period 2000 to 2007. This study found a prevalence of patients co-infected HIV / HCV of 4.42% (n = 70), with an average annual growth of 3.6%. Of these 72.9% were male, 47.1% were aged 30 | - 40. Of these 80% had completed the first grade, 50% received up to a minimum wage and 55.7% were natural in the city of Manaus where 94.3% from the capital too. Of the patients studied, 68.6% were heterosexuals and 84.3% of patients there was sexual promiscuity as a risk factor. During the study period 34.3% of the patients died. Co-infected individuals, only 25.7% (n = 18/70) to attend the clinic for viral hepatitis FMTAM for collection of biological material. In these patients (n = 18) the mean AST was 61.5 ± 61 U / L, ALT of 62.2 ± 37 U / L and the AST / ALT was 0.88 ± 0.33 U / L. As for lipids 38.9% had total cholesterol > 200mg/dl, 83.3% had HDL ≤ 40 mg / dL, 77.8% had triglycerides > 150 mg / dL and 33.3% had glucose > 110 mg / dL . Included 83.3% of patients used HAART scheme whereby 100% of these were using the protease inhibitor regimen. In applying the FIB-4 score in predicting fibrosis found that 77.8% with a cutoff point was <1.45 and 22.2% with a cutoff > 3.25. As for CD4 + T cells 72.2% had <500 cls/mm³ with a median of 271 cls/mm³, on the T CD8 + 88.9% had ≥ 215 cls/mm³ with a median of 794.5 cls/mm³. The ratio CD4 + / CD8 + was 0.32 cls/mm³. As the viral load of HIV and HCV there was a median of 16,911 copies / mL and 543,209 copies / mL, respectively. In this population 88.9% had the genotype 1 of HCV and 94.4% had a sub-type B HIV. Of these, 83.3% had Child-Pugh A and 61.1% who had normal liver on ultrasound. When the dose cytokines IL4, IL6, IL8, IL10, IL12 and IFN- γ in these patients found that only the IL6 (p = <0.001) showed statistical significance especially when correlated to the logarithm of the HCV viral load (0.031). The results found in this study, despite the low prevalence, have annual growth of co-infection due to improvement in the research of hepatitis C in patients with HIV. These results contribute to a better understanding of the clinical, epidemiological and immunological profile of patients co-infected in the north, because these data may lead to greater understanding of the interaction of these two viruses resulted in early diagnosis and consequent reduction of deaths.

Keywords: co-infection, HIV, HCV, genotype, sub-types, cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura genômica do HIV-1	24
Figura 2	Estrutura genômica do HCV	27
Figura 3	Fluxograma demonstrativo das etapas envolvidas no desenvolvimento do projeto.	43
Figura 4	(A) Gráfico Dot plot FSC x SSC utilizado para seleção da população linfocitária – R2. (B) Histograma; FL1 x FL2 utilizado para avaliar parâmetros de interesse em populações celulares específicas.	45
Figura 5	Ilustração de uma microplaca de ELISA com 96 poços.	46
Figura 6	Exemplo de diluição seriada para obtenção da curva padrão de citocina durante o ELISA. A concentração inicial de cada citocina varia conforme o kit.	47
Figura 7	Microplaca de ELISA com 96 poços, sendo 02 controles negativos (BK), preenchidos com diluente de ensaio, 16 ocupados com a diluição padrão das citocinas em duplicata (ST1 a ST8) e 78 disponíveis para amostras dos pacientes (SM1 a SM78).	48
Figura 8	Região 5'NCR do vírus da hepatite C do protótipo HCV1, informações do GenBank e localização dos <i>primers</i> mais utilizados na literatura.	59
Figura 9	Distribuição segundo o logaritmo das citocinas de resposta Th2 IL4 (A) e IL10 (B) em relação a doadores de sangue saudáveis e os pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	88
Figura 10	(A) (B) Distribuição segundo o logaritmo das citocinas de resposta Th1 IL12 (A) e IFN- γ (B) em relação a doadores de sangue saudáveis e os pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70).	89

Figura 11 (A) (B) Distribuição segundo o logaritmo das citocinas inflamatórias IL 6 (A) e IL 8 (B) em relação a doadores de sangue saudáveis e dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **90**

Figura 12 Distribuição segundo o logaritmo das citocinas em relação as genótipos do HCV dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **91**

Figura 13 Distribuição segundo o logaritmo das citocinas em relação ao FIB-4 dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **92**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Distribuição segundo a frequência anual de co-infectados HIV/HCV, em pacientes atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=70). **70**
- Gráfico 2** (A) Distribuição da média quanto aos valores de AST e ALT, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18). (B) Relação entre AST e ALT dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18). **75**
- Gráfico 3** Relação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **80**
- Gráfico 4** (A) Distribuição segundo o logaritmo da carga viral do HCV em relação à ALT, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). (B) Distribuição segundo o logaritmo da carga viral do HIV em relação à ALT, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **81**
- Gráfico 5** (A) Distribuição segundo o genótipo do HCV dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). (B) Distribuição segundo o subtipo do HIV dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **83**
- Gráfico 6** (A) Distribuição segundo a média de ALT em relação ao Child Score dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18). (B) Distribuição segundo as alterações ultra-sonográficas dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). **85**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüências dos iniciadores para a amplificação das regiões gênicas	51
Tabela 2	Sistema das reações de PCR para a região <i>gag</i>	52
Tabela 3	Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para <i>gag</i>	52
Tabela 4	Sistema das reações de PCR para a região <i>pol</i>	53
Tabela 5	Condições de ciclagem das reações de PCR para <i>pol</i>	53
Tabela 6	Sistema das reações de PCR para a região <i>env</i>	53
Tabela 7	Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para <i>env</i>	54
Tabela 8	<i>Primers</i> da região 5'UTR do genoma do HCV utilizados nos ensaios moleculares.	59
Tabela 9	Alterações ultra-sonográficas encontradas nos pacientes co-infectados HIV/HCV (N=18/70).	65
Tabela 10	Classificação do escore de gravidade de Child-Pugh	66
Tabela 11	Pontos de corte do escore FIB-4	67
Tabela 12	Distribuição segundo os dados demográficos e sócio-econômicos dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=70).	72
Tabela 13	Distribuição segundo a opção sexual, fatores de risco para aquisição da co-infecção e evolução para o óbito, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=70).	73

Tabela 14	Distribuição quanto aos valores de colesterol, glicemia, HDL e triglicerídeos dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	76
Tabela 15	Distribuição quanto ao uso do esquema HAART para o HIV em relação aos níveis de triglicerídeos dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	77
Tabela 16	Distribuição segundo a mediana e os quartis (Q_1 e Q_3) para $CD4^+$, $CD8^+$, razão $CD4^+:CD8^+$ e Carga Viral para HIV e HCV dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	79
Tabela 17	Distribuição segundo o escore FIB-4 dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	84
Tabela 18	Distribuição segundo o Child Score e USG dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	86
Tabela 19	Distribuição segundo o Child Score e USG em relação ao FIB-4 dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	87
Tabela 20	Análise da correlação segundo os logaritmos das citocinas em relação a carga viral do HIV e HCV dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHC	Carcinoma hepatocelular
CTA	Centro de testagem e aconselhamento
CRF	Formas recombinantes circulatórias
DC	Células dendríticas
DDI	Didanosina
D4T	Estavudina
DM2	Diabete melito tipo 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)
EH	Esteatose hepática
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
GGT	Gama glutamil-transpeptidase
GP	Glicoproteína
HAART	Terapia anti-retroviral altamente eficaz
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDV	Vírus da hepatite Delta
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IDSA	Infectious Diseases Society of America

IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IP	Inibidores da protease
ITRN	Inibidor da transcriptase reversa não-análogo
LOG	Logarítmo
MEC	Matriz extra-celular
NAFLD	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
NASH	Esteatohepatite não-alcoólica
NCBI	Nucleotide sequence database
NK	Natural killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
ORF	Open reading frames
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PG	Picogramas
PKR	Proteína kinase
RNA	Ácido ribonucléico
RNI	Razão de normalização internacional
RT	Transcrição reversa
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SM	Síndrome metabólica
TAP	Tempo de atividade da protrombina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGFβ1	Citocina fibrogênica
TNF	Fator de necrose tumoral
UDI	Usuário de droga injetável
URF	Única variedade de forma recombinante
USA	Estados Unidos da América
USG	Ultra-sonografia
USP	Universidade de São Paulo
USPHS	United States Public Health Service

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Características epidemiológicas da co-infecção hiv/hcv	18
2.2 Biologia viral do HIV e HCV	20
2.3 Imunopatogênese da co-infecção HIV/HCV	27
2.4 História natural da co-infecção HIV/HCV	33
2.4.1 Impacto do HIV em pacientes portadores do HCV	33
2.4.2 Impacto do HCV em pacientes portadores do HIV	36
OBJETIVOS	39
METODOLOGIA	40
4.1 Descrição da área de estudo	40
4.2 Desenho epidemiológico do estudo	40
4.3 Critérios de inclusão no estudo	40
4.4 Critérios de exclusão no estudo	41
4.5 Seleção e abordagem dos pacientes	41
4.6 Coleta do material biológico	41
4.7 Grupo controle para análise das citocinas	44
4.8 Análise do perfil imunológico celular através da citometria de fluxo	44
4.9 Análise do perfil de citocinas em sangue periférico	45
4.10 Técnicas moleculares do HIV	49
4.10.1 Extração do DNA pró-viral do HIV	49
4.10.2 Quantificação do DNA extraído para HIV	50
4.10.3 Amplificação por <i>nested</i> PCR	50
4.10.4 Sistema da reação da PCR para controle da qualidade do DNA	51
4.10.5 Sistema da reação da PCR para as regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>	52
4.10.6 Seqüenciamento e genotipagem do HIV	54
4.10.7 Análises filogenéticas	55
4.11 Técnicas moleculares do HCV	55
4.11.1 Extração do RNA do plasma	55
4.11.2 Concentração da amostra plasmática	56
4.11.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)	56
4.11.4 Teste qualitativo de PCR – <i>Nested</i> PCR	57
4.11.5 Identificação dos produtos de PCR	60

4.11.6	PCR qualitativo de produto para identificação dos genótipos do HCV por seqüenciamento	61
4.11.7	Purificação dos produtos amplificados	61
4.11.8	Semi-quantificação dos produtos purificados	62
4.11.9	Reação de seqüenciamento e purificação do produto	62
4.11.10	Seqüenciamento	63
4.11.11	Análise das seqüências	63
4.11.12	Determinação da carga viral	64
4.11.13	Controle de contaminação	64
4.11.14	Genotipagem do HCV	65
4.11.15	Armazenamento e guarda do material	65
4.12	Exame ultra-sonográfico	65
4.13	Análise pelo escore de gravidade Child-Pugh	66
4.14	Escore FIB-4	66
4.15	Metodologia estatística	67
4.16	Aspectos éticos	68
RESULTADOS		69
5.1	Aspectos gerais da população	69
5.2	Características demográficas da população	70
5.3	Fatores de risco e evolução dos pacientes	73
5.4	Características laboratoriais da população	74
5.5	Atividade funcional e fibrose hepática	84
5.6	Perfil imunológico da população	87
DISCUSSÃO		94
6.1	Aspectos gerais da população	94
6.2	Características demográficas da população	95
6.3	Fatores de risco e evolução dos pacientes	97
6.4	Características laboratoriais da população	99
6.5	Atividade funcional e fibrose hepática	106
6.6	Perfil imunológico da população	109
CONCLUSÕES		113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		115
ANEXOS		139

Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Victoria, Marilú Barbieri

V645i Implicações clínicas e imunobiológicas da co-infecção HIV e vírus da hepatite C em uma população atendida na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas / Marilú Barbieri Victoria. - Manaus: UFAM, 2007.

144 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Malheiro

1. Hepatite C 2. Infecções por HIV 3. Co-infecções I. Adriana, Malheiro II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.98(811.3)(043.2)

INTRODUÇÃO

A epidemia mundial da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) que hoje vivemos teve seu início em 1981, nos Estados Unidos (CDC, 1981). Entretanto, o seu agente etiológico, o HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), somente foi identificado dois anos após, em 1983, quase que simultaneamente por pesquisadores franceses e americanos (BARRE-SINOUSI et al., 1983; GALLO et al., 1983).

No final desta década também foi identificado o agente etiológico da hepatite C, até então conhecida como hepatite não-A não-B (NANB). O vírus da Hepatite C (HCV) emergiu como a segunda principal epidemia após o vírus da imunodeficiência humana (HIV) dentro das duas décadas passadas, e a co-infecção HIV/HCV representa um problema de saúde pública mundial crescente (CHOO et al., 1989; KUO et al., 1989).

A associação da infecção do HIV com o HCV ocorre com frequência devido ao fato de ambos compartilharem as mesmas vias de transmissão o que aumenta a possibilidade de co-infecção HIV/HCV, estimando-se uma prevalência mundial de mais de 30% de casos desta associação infecciosa (CORVINO et al., 2007).

Estudos demonstram que a infecção pelo HCV tem sua história natural modificada nos pacientes infectados pelo HIV, evoluindo com maior viremia e formas rapidamente progressivas (GREUB et al., 2000; KOZIEL & PETERS, 2007; SORIANO et al., 2001; SULKOWSKI, 2001), porém os estudos são controversos a respeito da evolução do HIV nestes pacientes (GREUB et al., 2000; MARTIN et al., 2001; ROCKSTROH et al., 2005).

De acordo com o *United States Public Health Service* (USPHS) e a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) a hepatite C é considerada uma doença oportunista da AIDS, com uma história natural incompleta e ainda carente de estudos imunopatogênicos consensuais.

No Amazonas existem poucos estudos sobre a co-infecção HIV/HCV, mas dados recentes revelam a ascensão do número de casos de infecção pelo HCV, sendo considerado atualmente um dos principais agente etiológico de hepatopatia crônica na população portadora do HIV atendida na FMTAM (BOLETIM-FMTAM, 2007).

A interação destes vírus é objeto de enorme preocupação, sendo considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública a ser enfrentado por profissionais e autoridades de saúde de todo o mundo. Os relevantes aspectos epidemiológicos da co-infecção HIV/HCV, a inexistência de estudos clínicos consistentes na região sobre esta associação infecciosa, bem como as características sócio-culturais singulares ainda mal compreendidas desta população, justificaram a realização deste estudo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA CO-INFECÇÃO HIV/HCV

O declínio da mortalidade devido às infecções oportunistas em pacientes infectados pelo HIV desde o início da introdução da terapia anti-retroviral altamente eficaz (HAART) levou a um aumento na morbidade e mortalidade relacionada às infecções pelos vírus das hepatites B (HBV) e C (HCV) (ROSENTHAL et al., 2007).

Aproximadamente um terço dos indivíduos com HIV infectam-se com HCV e os co-infectados também apresentam um risco aumentado para insuficiência hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), quando comparados com pacientes mono-infectados pelo HCV (LARSEN et al., 2008).

Além da co-infecção os indivíduos podem apresentar respostas imunológicas alteradas ao HAART e risco aumentado de hepatotoxicidade à terapia anti-retroviral (MATTHEWS & DORE, 2008).

Estima-se que no mundo há 33,2 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, 1.7 milhões na América Latina, sendo que mais de 40% destas pessoas vivem no Brasil (WHO/ UNAIDS, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê uma prevalência global da hepatite C em 3% da população, existindo cerca de 180 milhões de portadores, com grandes diferenças na sua distribuição geográfica. Atualmente ocorrem 35 mil novos casos por ano, principalmente em usuários de drogas injetáveis (UDI) (WHO, 2008).

Atualmente, no mundo, há em torno de 4 a 5 milhões de pacientes co-infectados pelo HIV e vírus da hepatite C (HCV). Nos Estados Unidos e Europa a prevalência da hepatite C foi diagnosticada entre 25% e 30% dos pacientes HIV positivos, e até 10% dos pacientes com HCV estão infectados pelo HIV (ALTER, 2006; KLENERMAN & KIM, 2007; POL & SORIANO, 2008).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Prevenção das Hepatites Virais estima que, a partir de estudos já realizados no país, a prevalência da co-infecção HIV/HCV varia de 17% a 36% dos casos, com ampla variação entre as diversas regiões estudadas (BOLETIM SBI, 2006).

O Programa Estadual de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS de São Paulo com o objetivo de descrever o perfil dos usuários que realizaram testagem para o HIV nos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) entre 2000 e 2007 verificaram 13% de co-infecção HIV/HCV (BEP, 2008).

Monteiro et al. (2004) estudando indivíduos infectados com HIV na região de Belém, encontrou uma prevalência de 16% de infecção pelo HCV. Carvalho et al., (2009) no Recife estudando co-infectados HIV/HCV encontrou uma prevalência de 4,1% considerada baixa quando comparada com trabalhos da literatura, possivelmente devido às diferenças regionais dos fatores de risco de infecção pelo HCV.

Já é conhecido que o HCV e o HIV têm modalidades de transmissão similares, porém a eficiência da transmissão de cada um dos vírus é diferente, quanto à transmissão do HCV é mais eficiente através da exposição ao sangue contaminado ou a hemoderivados e principalmente através do uso de drogas injetáveis (UDI) (MONTI et al., 2008).

A taxa de transmissão vertical e perinatal é relativamente baixa (3-6%), entre as pacientes com HCV, embora aumente duas vezes quando a mãe é HIV positiva (MAST et al., 2005).

Em populações de alto risco como usuários de drogas injetáveis (UDI) a co-infecção está presente em 72% e 95%, nos heterossexuais entre 9% e 27% e nos homens que fazem sexo com homens (HSH) ocorre entre 1% e 12% (CHENG et al., 2007; LARSEN et al., 2008; POL & SORIANO, 2008).

Um padrão evolutivo da epidemiologia da infecção pelo HIV tem sido evidenciado em vários países das Américas, incluindo o Brasil. Diferenças na distribuição de casos de acordo com os fatores de risco têm sido encontradas na presente década quando comparadas a 1980.

Inicialmente, a infecção pelo HIV era predominante em homossexuais masculinos ou bissexuais, hemofílicos ou em quem realizava transfusão sanguínea. Entretanto, nos últimos anos, houve um aumento significativo da transmissão do HIV em usuários de drogas injetáveis e principalmente em heterossexuais com prática sexual desprotegida. Por outro lado, como a transmissão do HCV ocorre, principalmente, pela via parenteral, os indivíduos portadores do HIV que são usuários de drogas injetáveis apresentam risco quatro vezes maior de se infectarem com o HCV (SZWARCOWALD et al., 2000).

No Brasil, na região Nordeste, apenas 8,4% dos pacientes adquire o HIV através do uso de drogas injetáveis, diferente das regiões Sudeste e Sul do País que apresentam frequência mais elevada 25,8% e 30,7%, respectivamente. (CARVALHO et al., 2009).

A transmissão sexual do HCV é ineficiente e o risco relacionado aos diferentes tipos de atividade sexual é desconhecido. Entretanto, existem evidências de que aumente a transmissão do HCV entre homens com HIV que fazem sexo com homens (HSH). Um recente estudo de coorte mostrou que a incidência encontrada da infecção pelo HCV entre homens que fazem sexo com homens HIV- positivos, dobrou após o ano 2000 (VAN DE LAAR et al., 2007).

Um estudo realizado em Amsterdam sobre a prevalência do HCV entre HSH encontrou um aumento significativo das taxas nos últimos anos quando comparado com anos anteriores a 2000 (15%). Estes números crescentes e infecções agudas sugerem uma propagação rápida do HCV nos indivíduos HIV positivos (URBANUS et al., 2008).

A introdução do esquema HAART melhorou significativamente a expectativa de vida dos pacientes infectados pelo HIV, porém as complicações da hepatite C tornaram-se mais aparentes, seja como cirrose descompensada ou como fator de risco importante em pacientes que utilizam as drogas anti-retrovirais devido à hepatotoxicidade (THEIN et al., 2008).

2.3 BIOLOGIA VIRAL DO HIV E HCV

O HIV é um membro do gênero *Lentivirus* da família *Retroviridae* e compreende os vírus HIV-1 e HIV-2, este mais restrito geograficamente de menor potencial patogênico devido ao fato de ser menos virulento. Caracteriza-se por ter como material genético um RNA positivo de 9 kb, realizando seu ciclo biológico através de um cDNA intermediário. É

um retrovírus de duas cadeias simples positivas de RNA, com 100-120nm de diâmetro (BRÍGIDO & RODRIGUES, 2006).

A maioria dos retrovírus depende de três genes: *gag* (significa grupo antígeno), *pol* (de polimerase) e *env* (de envelope), que são proteínas estruturais. Porém outros genes estão presentes no HIV-1 como *tat* e *rev*, que são proteínas regulatórias essenciais à replicação e outros como *vpu*, *vpr*, *vif*, e *nef* que são proteínas acessórias e irão expressar diversos constituintes da partícula viral. O gene *pol* irá expressar a formação da transcriptase reversa, integrase e protease. O gene *vpu* é importante no processo de saída do vírus da célula do hospedeiro enquanto que o *vif* parece afetar a gênese morfológica do vírus (REQUEJO, 2006).

O RNA viral é retrotranscrito no citoplasma e um complexo de pré-integração composto do cDNA e de algumas proteínas virais do hospedeiro migram para o núcleo onde através da enzima integrase integra-se ao genoma do hospedeiro. O pró-vírus pode permanecer latente até o momento do início da sua transcrição, processo dependente de proteínas virais e outros fatores de transcrição celular (BRÍGIDO & RODRIGUES, 2006).

As principais células infectadas pelo HIV são os linfócitos T, macrófagos e as células dendríticas, sendo que as células dendríticas, presentes na mucosa, parece ser as primeiras células a serem infectadas pelo HIV-1, tendo um papel importante na disseminação da infecção. Este tropismo é predominantemente determinado pelos receptores de superfície celular requeridos pelo HIV para unir e entrar na célula. (DONG et al., 2007).

Vários trabalhos sugerem que a infecciosidade do vírus HIV é principalmente determinada pelas interações iniciais que se estabelecem durante a entrada do vírus na célula. O HIV penetra nessas células unindo-se ao receptor da célula T CD4⁺ por meio de uma molécula encontrada na superfície chamada gp120. Uma vez unido ao CD4⁺, o HIV, para completar a fusão se ligará às proteínas na superfície da célula humana, conhecidas como CCR5 e CXCR4. Desta interação resulta a fusão entre o invólucro do HIV e a membrana da célula com conseqüente liberação do nucleocapsídeo no interior do citoplasma celular (OSWALD-RICHTER et al., 2007).

A variabilidade genética do HIV é reconhecida como um problema em potencial para o diagnóstico e tratamento do HIV/AIDS, assim como para o desenvolvimento de vacinas efetivas, o que torna importante o monitoramento da distribuição global e da dinâmica dos diferentes subtipos de HIV e CRFs (formas recombinantes circulatórias). Esta grande variabilidade genética do HIV-1 pode ser explicada pela alta taxa de erro da transcriptase

reversa e pela ocorrência de eventos de recombinação e, juntamente com uma alta taxa de replicação viral no hospedeiro, leva à emergência de variantes virais divergentes (McCUTCHAN, 2006; TAYLOR et al., 2008).

A análise filogenética do HIV-1 demonstra a existência de três grupos distintos: M (*Main* - principal), N (*New* - novo) e O (*Outlier*), sendo o grupo M responsável pela pandemia global. Embora os grupos de M e N sejam encontrados nos chimpanzés, evidências recentes sugerem que o grupo O possa ter sido originado dos gorilas (TAYLOR et al., 2008).

Desde a introdução em seres humanos, o grupo M foi descrito como uma entidade filogenética principal do HIV-1. O grupo M é composto de 11 subtipos nomeados de A a K, além de mais de 15 CRFs que circulam entre as populações em torno do globo. Com relação ao grupo O não há nenhuma classificação análoga dos subtipos, porém se propôs uma classificação em cinco conjuntos filogenéticos designados I a V. O HIV-2 também apresenta variantes que são classificadas em cinco distintos subtipos nomeados A a E (McCUTCHAN, 2006; REQUEJO, 2006).

O subtipo A é responsável por 80% das infecções pelo HIV na África ocidental e 30% na África Oriental (HOLGUIN et al., 2002), e na Europa Oriental este subtipo tem se disseminado desde 1995, principalmente nos países da antiga União Soviética (BOBKOV et al., 2001).

O subtipo B é característico da epidemia em países centrais, sendo predominante na Europa Ocidental, América do Norte e Japão. Na América Latina e Caribe, o HIV-1 B também é a principal variante, embora nosso país e países limítrofes, como Argentina, apresentem uma proporção importante de outras variantes, como o HIV-1 F (BRÍGIDO & RODRIGUES, 2006).

No Brasil predomina o subtipo B seguido pelos subtipos F e C, com proporção pequena do subtipo D (BONGERTZ et al., 2001; CARIDE et al., 2000; COUTO-FERNANDEZ et al., 1999; GADELHA et al., 2003). O Sul do Brasil, ao contrário do observado no restante das Américas, tem prevalência importante do subtipo HIV-1 C. Na Argentina, Bolívia, Peru, Paraguai, Uruguai, Venezuela e também nas ilhas do Caribe estes mesmos subtipos foram encontrados desde meados de 1990 (CASTRO et al., 2003; VAUGHAN et al., 2003).

O Subtipo C representa 60% das infecções pelo HIV no mundo, predominantemente no Leste da África e Sul da Ásia (KOCH et al., 2001; LJUNGBERG et al., 2002). Também

tem sido reportado na Malásia e no Sudoeste China, o que pode refletir que o vírus se espalha através das ligações com a Índia onde este subtipo é predominante (TRIPATHY et al., 2005).

Na Tanzânia (África) o subtipo C tem uma prevalência de 50% seguido pelos subtipos A e B. O recente epicentro do subtipo C do HIV foi verificado na África do Sul que envolve Botswana, Zimbabue, Malawi, Zâmbia, Namíbia, se espalhando para a Índia, Nepal e China. Na Europa, mais precisamente na Escócia, o subtipo C também aumentou desde 2000, principalmente devido à transmissão dos indivíduos com exposição evidente fora do Reino Unido tal como ocorreu nos países africanos e asiáticos (YERLY et al., 2004).

No Estado do Amazonas, em trabalho descrito pelo nosso grupo, foi identificado o subtipo C, o qual ainda não havia sido relatado nesta região. Também se encontrou os subtipos B e F, bem como a forma recombinante BF (CUNHA et al., 2007).

O Subtipo D é responsável por 5% a 40% nos países do Leste da África e África Central onde tem circulado junto com o subtipo A (LAUKKANEN et al., 2000). O subtipo E (rebatizado como CRF01_AE) tem sido comum no Vietnã e nos países vizinhos, na maioria em UDI infectados. O subtipo E foi predominante encontrado na Tailândia (>80%), com uma proporção pequena do subtipo B, também em UDI (CHAKRABARTI et al., 2000).

O Subtipo F tem sido mais comum na Europa Oriental, principalmente na Romênia (OP DE COUL et al., 2000), e é também encontrado na América do Sul (RAMOS et al., 1999; RIOS et al., 2003). O Subtipo I foi primeiramente identificado no Chipre e na Grécia em meados de 1990 e de lá se espalhou para a região do Mediterrâneo (KOSTRIKIS et al., 1995; PAPA et al., 1998).

Os subtipos A, E, G, H, J e K foram descritos na Burkina Faso, Mali, Nigéria, na Costa do Marfim, Gabão e na República Democrática do Congo, de onde se espalharam para o Sul da Europa e Ásia (BAILES et al., 2003).

Em decorrência do elevado grau de variabilidade genética, a evolução do HIV durante o período de infecção persistente, pode atingir taxas de diversidade por volta de 1% ao ano. Nesse processo, o vírus apresentou modificações no fenótipo com a emergência de variantes mais agressivas, capazes de infectar novos tipos celulares e escapar de mecanismos imunológicos e da ação de terapias medicamentosas (BRÍGIDO & RODRIGUES, 2006).

Alguns estudos indicam que os subtipos do HIV-1 apresentam propriedades imunológicas diferentes. Os Subtipos A e D diferem na relação para o uso do co-receptor. A maioria de isolados do subtipo A usam o tropismo do receptor CCR5 unindo às células T. Em

contraste, a maioria de isolados do subtipo D usa o co-receptor CXCR4. Entretanto o tropismo CCR5/CXCR4 duplo não foi observado entre eles ainda (McCUTCHAN, 2006; MENU et al., 1999).

Estima-se que mais de 90% dos genes responsáveis pelo desenvolvimento e a manutenção do fenótipo da resistência e de não-progressão ao longo prazo para infecção pelo HIV ainda não foram descobertos. Uma melhor compreensão molecular sobre a resistência da doença HIV-induzida depende do controle de mecanismos anti-retrovirais naturais. Entretanto, os estudos sistemáticos para elucidar estes fatores são complicados devido a heterogeneidade dos indivíduos infectados pelo HIV, quanto à diversidade genética, afiliações étnicas, idade, gênero, estágio da doença, bem como características familiares individuais (DEVICO & GALLO, 2004).

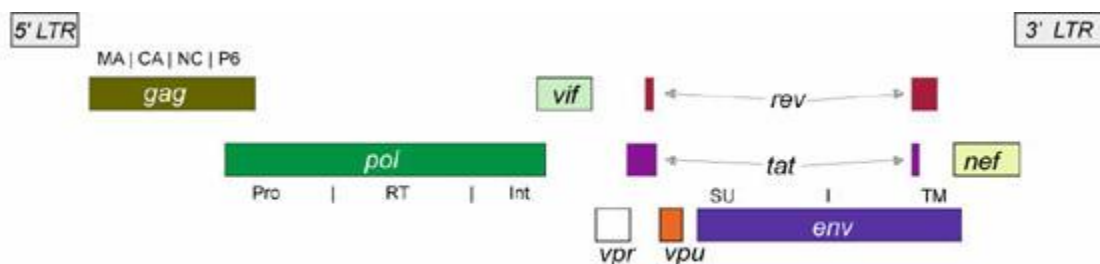


Figura 1. Estrutura genômica do HIV-1.

Fonte: Retirado de: <http://www.aids.harvard.edu/research/discoveries.html>

O HCV está classificado na família *Flaviviridae* como um gênero separado dos *Flavivirus* e *Pestivirus*, pois, apesar de apresentar uma estrutura genômica semelhante a estes, em nível de seqüência, o HCV não se aproxima muito de nenhum deles. Para este novo gênero foi proposto o nome *Hepacivirus*, pertencente à ordem *Nidovirales* (CHOO & PINHO, 2007).

O HCV possui forma esférica com 50 nm de diâmetro, nucleocapsídeo envelopado e seu genoma é constituído por uma molécula de RNA fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 9.400 nucleotídeos. Nesta seqüência, encontra-se uma única longa fase de leitura aberta (ORF) que compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos, constituída por proteínas estruturais e não estruturais (CHOO & PINHO, 2007).

A meia vida do HCV foi estimada em 2,7 horas, sendo geradas 10^{12} partículas virais por dia, isto, junto com uma taxa elevada de mutação, estimada em 10^{-3} substituições do nucleotídeo por ano, induz a uma grande heterogeneidade em suas apresentações, conhecidas como *quasispecies* (MAJOR & FEINSTONE, 1997).

A replicação dos vírus RNA não envolve mecanismos de reparo, acarretando uma porcentagem muito maior de erros de incorporação de nucleotídeos, como ocorre nos vírus DNA. Desta forma, qualquer população de vírus RNA é formada *quasispecies*, ou seja, um conjunto de moléculas muito semelhantes, que guardam características gerais em comum, mas por outro lado, heterogêneas devido às diferenças nas seqüências dos nucleotídeos. Este fenômeno também ocorre com o HCV e desempenha importante papel no desenvolvimento da infecção viral, permitindo a seleção de variantes mais resistentes, sob a pressão da resposta imunológica do hospedeiro (COO & PINHO, 2007).

O surgimento de *quasispecies* impede que o sistema imunológico elimine a infecção pelo HCV. Além disso, mutações na população viral podem ser responsáveis por mecanismos de resistência às drogas e pela dificuldade encontrada no desenvolvimento de uma vacina contra este vírus (SILVA & NIEL, 2006).

Foram identificados em várias partes do mundo seis genótipos diferentes, designados por números arábicos de 1 a 6 e isolados mais de 100 subtipos (intimamente relacionados a um genótipo principal) identificados por letras a seguir do número: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 5a, e 6a (POYNARD et al, 2003).

Os genótipos do HCV tem uma distribuição geográfica variável nas diferentes regiões do globo, refletindo, provavelmente, a história epidemiológica do vírus e o modo de transmissão da doença entre os hospedeiros (MC OMISH et al. 1994; SILINI et al., 1995; SIMMONDS et al., 1990; SIMMONDS et al., 1996).

O genótipo 1 é o mais prevalente em 40% a 80% da população mundial infectada. Alguns genótipos do HCV como 1a, 1b, 2a e 2b, têm distribuição em todo o mundo, outros como o 5a e 6a, são somente encontrados em regiões geográficas específicas. No Oeste Europeu e nos Estados Unidos os genótipos mais freqüentes são 1a, 2b, 2a, 2b e 3a. Na África central é mais encontrado o genótipo 4a. Na África do Sul e em Hong Kong, os tipos mais freqüentes são o 5a e o 6, respectivamente. No extremo oriente, no Japão, em Taiwan e, provavelmente, em parte da China, os mais freqüentes são 1b, 2a e 2b; sendo que o genótipo 6 apresenta localização geográfica reduzida (FOCACCIA et al., 2007).

No Brasil há poucos estudos de soro-prevalência de genótipos. Um dos estudos realizados sobre a distribuição dos genótipos foi coletado de pacientes cronicamente infectados pelo HCV, em laboratórios de diferentes cidades do país, o qual demonstrou que 64,9% eram 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 freqüente, inclusive na Região Norte; o genótipo 2 foi mais prevalente na Região Centro-Oeste, especialmente no Mato Grosso, enquanto que o genótipo 3 foi mais comum na Região Sul; os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados, somente no estado de São Paulo e até o momento não houve descrição de casos de infecção pelo genótipo 6 no Brasil (CAMPIOTTO et al., 2005; FOCACCIA et al., 2007).

Estudos sugerem que genótipos específicos como o genótipo 1 podem ser mais citopáticos (DUSHEIKO et al., 1994) ou podem induzir uma progressão mais rápida da doença do que outros genótipos (KOBAYASHI et al., 1996). O Genótipo 1 foi o genótipo mais fortemente associado com infecção crônica pelo HCV (AMOROSO et al., 1998). O risco de cirrose e carcinoma hepatocelular foi mais evidente em indivíduos que apresentam o genótipo 1b do que aqueles que apresentam os genótipos 2 e 3 (BELLENTANI et al., 1999). Entretanto, outros autores relataram que os genótipos do HCV e a carga viral não influenciam a progressão da doença (EASL, 1999; POYNARD et al., 1997).

Embora existam controvérsias acerca da influência dos genótipos do HCV na história natural da hepatite C, estudos sugerem que a infecção pelo genótipo 1b se associa a doença hepática mais grave, similar ao que ocorre com o genótipo 4 e ambos também não respondem bem ao tratamento com IFN- α (POZZATO et al., 1991; 2005).

Em um estudo realizado por Harris et al. (2007) verificou que o clareamento espontâneo do HCV ocorreu mais em pacientes com o genótipo 1, porém verificou que nos que permaneceram positivos a infecção pareceu ser mais agressiva do que naqueles que tinham os genótipos 2 ou 3 do HCV.

Outros estudos não concordam com a associação entre gravidade e genótipos sugerindo que os genótipos emergiram como fator preditivo de resposta à terapia antiviral (RAMALHO et al., 1997; SARMENTO et al., 2001; YAMADA et al., 1994).

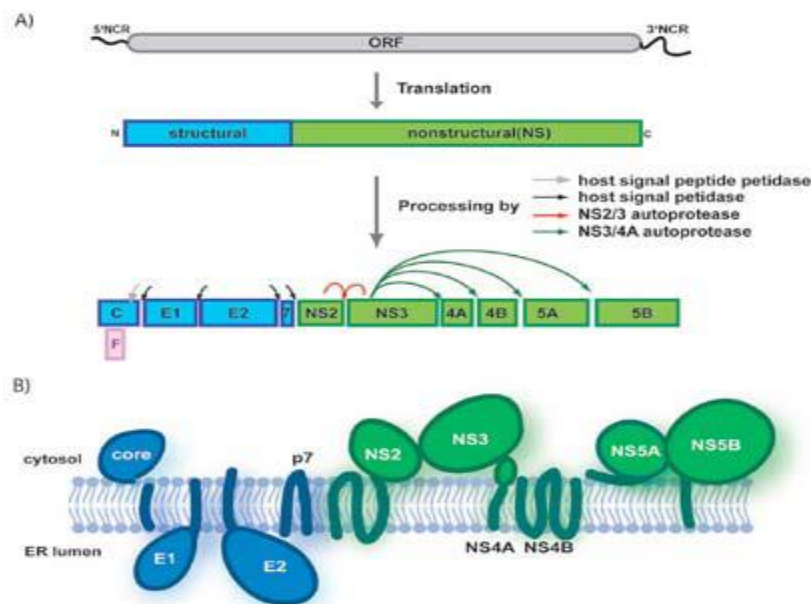


Figura 2. Estrutura genômica do HCV.

Fonte: *apud* Tellinghuissen, T. L. et al. Journal of Virology p. 8853-8867, 2007.

2.3 IMUNOPATOGÊNESE DA CO-INFECÇÃO HIV/HCV

A maioria das infecções virais induz resposta imune humoral e celular a fim de limitar a propagação viral e criar uma memória imunológica que protege o organismo de re-infecções. Entretanto, alguns vírus apresentam mecanismos complexos que estabelecem uma infecção persistente nos hospedeiros imunocompetentes (BARRETT et al., 2008).

A importância da resposta imune adaptativa nas infecções virais é bem conhecida. Muitos trabalhos focalizaram na resposta humoral das células T no controle de infecções pelo HIV e HCV, sendo identificada uma grande variedade de estratégias imune de evasão, porém a resposta imune inata permanece obscura (RACANELLI & REHERMANN, 2003).

Ambos os vírus HIV e HCV são constituídos por genoma RNA, e a conformação viral do RNA descrita para os dois vírus mostra uma variabilidade na sua seqüência. Devido ao fato destes vírus serem parasitas intracelulares, as interações com a célula do hospedeiro são requeridas em todas as etapas do ciclo de replicação viral, induzindo uma resposta celular à infecção. Os aspectos relacionados à imunidade inata e o papel das células dendríticas na resposta imune adaptativa ao HIV e ao HCV são de real importância no processo da co-infecção, porém os mecanismos que levam o HCV a evadir as defesas imunes do hospedeiro,

estabelecendo uma infecção persistente, permanecem desconhecidos (GATIGNOL et al., 2007).

A correlação da co-infecção com o HIV e a baixa contagem periférica de células T CD4⁺ no sangue está associada com a piora da doença hepática pelo HCV, sendo esta associação encontrada em 48% dos co-infectados e 21% de indivíduos mono-infectados pelo HIV (MORISHIMA et al., 2007). Estudos em chipanzés mostraram que a depleção *in vivo* de células T CD4⁺ e T CD8⁺ impede a eliminação do vírus C (GRAKOUÏ et al., 2003; SHOUKRY et al., 2003).

Alguns estudos têm sugerido que a imunossupressão induzida pelo HIV compromete a resposta imune ao HCV. Entretanto, outros estudos mostraram que a contagem de células T CD4⁺ não está relacionada com a resposta reduzida das células T (CAPA et al., 2007) sendo possível que um defeito qualitativo nas células T CD4⁺ que resultam da infecção pelo HIV seja o responsável pela diminuição da resposta específica do HCV nos pacientes co-infectados (ROE & HALL, 2008).

Roe & Hall (2008) recentemente encontraram diminuições em níveis das expressões do receptor CXCR3 nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes co-infectados quando comparados com os aqueles mono-infectados pelo HCV. Contudo, a expressão CXCR3 diminuída em células T CD8⁺ foi mostrada também durante os estágios avançados da infecção pelo HIV (BRAINARD et al., 2007).

Quando o receptor CXCR3 é expresso predominantemente nas células do tipo Th1 estes achados sugerem que há um esgotamento destas células contribuindo para a redução da capacidade da resposta imune HCV específica, observada em pacientes co-infectados HIV/HCV. Além disso, a falta de expressão do receptor CXCR3 nos linfócitos poderia resultar no recrutamento anômalo das células do tipo Th1 no fígado, levando a uma diminuição das células Th1, contribuindo para a formação de uma imunidade HCV específica defeituosa em pacientes co-infectados (ROE & HALL, 2008).

Na infecção concomitante HIV/HCV ocorre a perda do controle imunológico, levando a níveis aumentados da carga viral do HCV e doença hepática mais agressiva. A resposta imune-celular, particularmente da secreção de IFN- γ , parece ser importante no controle do vírus C. Uma resposta T CD4⁺ HCV específica está associada com o clareamento do vírus. As células T CD8⁺ HCV específicas estão diminuídas na infecção crônica pelo HCV,

relacionando-se com o declínio na contagem das células T CD4⁺ na co-infecção com o HIV (HARCOURT et al., 2006).

Estudos também mostram que a infecção crônica pelo HCV favorece uma destruição mais rápida dos linfócitos T CD4⁺ em pacientes HIV positivos, assim como a presença do HIV pode aumentar a severidade da infecção pelo HCV promovendo aumento na replicação e perda de células T CD4⁺ (GRAHAM et al., 2004; SORIANO et al., 2004).

A replicação do HCV produz variabilidade na seqüência conduzindo a elevadas taxas de erro a que se chama de *quasispecies*. Ao estudar a variabilidade genética do HCV em oito pacientes co-infectados HIV/HCV, um grupo de pesquisadores encontrou um elevado grau de reconstituição imune, indicando uma associação direta entre a diversidade na seqüência com a reconstituição da função do sistema imune, e quando ocorre a melhora deste, como efeito paradoxal, há progressão da doença hepática (WANG et al., 2006).

Pesquisadores suíços avaliando indivíduos co-infectados sem uso de antivirais verificaram que níveis mais altos de carga viral do HCV e os genótipos 2 e 4 estavam diretamente associados com depleção de células T CD4⁺, além de outros fatores preditivos também encontrados como o sexo feminino e a transmissão do HIV através de contato homossexual masculino (RAUCH et al., 2008).

Um estudo recente em biópsias de fígado de pacientes co-infectados demonstrou uma freqüência similar dos linfócitos, porém com uma porcentagem mais baixa de células T CD4⁺ quando comparado a biópsias de pacientes somente com HCV. O acúmulo no fígado de células T HIV- específicas na co-infecção HIV/HCV pode servir como opositor ao HIV na progressão mais rápida da doença hepática (VALI et al., 2008) .

Os mecanismos pelos quais estes dois vírus interagem não são claros, e definir estas interações é importante para a eficácia do tratamento dos indivíduos co-infectados. As citocinas são peças fundamentais na resposta imunológica às infecções virais repercutindo diretamente na inibição da replicação viral e na regulação da resposta do hospedeiro (PAL & SCHNAPP, 2004). .

Tovo et al. (2007) estudando as diferenças nos padrões de secreção das citocinas na resposta ao HCV em indivíduos com co-infecção HIV/HCV e em mono-infectados pelo HCV, observaram que pode haver diminuição da secreção de IL-10 pelas células T CD4⁺ intra-hepáticas em resposta às proteínas estruturais do HCV em co-infectados, sugerindo uma possível implicação da IL-10 na progressão da doença relacionada ao HCV. Os pacientes que

progridem para a doença crônica atenuaram as respostas de células T CD4⁺ do tipo Th1 e diminuíram as respostas de T CD4⁺ do tipo Th2 com produção predominante de IL-4 e de IL-10.

Outras citocinas foram implicadas também na progressão acelerada da doença hepática nos pacientes co-infectados. Estudos mostraram que hepatócitos expostos à proteína E2 do envelope do HCV produziram a citocina IL-8 de maneira dose-dependente. A produção de IL-8 estava mais aumentada na presença da proteína E2 do HCV e da glicoproteína gp120 do envelope do HIV. Isto sugere que pode haver uma resposta inflamatória realçada nos hepatócitos em cima da exposição simultânea à E2 do HCV e à gp120 do HIV, sendo possível que as proteínas estruturais do HCV e do HIV possam lesar os hepatócitos ainda não infectados (BALASUBRAMANIAN et al., 2003).

As múltiplas estratégias de evasão do sistema imune criada pelo HCV na infecção crônica também envolve a resposta à produção de citocinas. Um recente trabalho investigou a resposta *in vitro* das citocinas às proteínas estruturais e não-estruturais do HCV nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, infectados pelo HIV, infectados pelo HCV e co-infectados. O mesmo concluiu que a indução seletiva de IL-10 em indivíduos sem infecções e principalmente nos infectados pelo HIV tem um papel em estabelecer a infecção crônica pelo HCV e inversamente, a atenuação desta resposta, uma vez que a infecção crônica é estabelecida, leva ao desenvolvimento de fatores favoráveis à patogênese hepática (BARRETT et al., 2008).

Diversos estudos mostraram que as concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias em pacientes infectados pelo HCV estão associadas com uma piora da doença hepática. Foi demonstrado que a desregulação das citocinas apresentam um papel importante na patogênese da infecção pelo HIV. Os níveis no soro das interleucinas IL-1, IL-6 e do TNF- α estão elevadas nestes indivíduos, aumentando a replicação viral (FARINATI et al., 2006; ZEKRI et al., 2005).

Outros estudos compararam níveis intra-hepáticos do mRNA nos pacientes co-infectados HIV/HCV com os aqueles infectados somente pelo HCV e demonstraram que os pacientes co-infectados apresentam níveis elevados de IFN- γ e TNF- α , e o aumento no mRNA de IFN- γ está associado com um maior dano histopatológico (BLACKARD et al., 2006; GONZALEZ et al., 2008; SITIA et al., 2006).

Abbate, et al. (2004) estudando pacientes co-infectados HCV/HIV encontraram níveis aumentados de mRNA de IFN- α intra-hepáticos, e correlacionaram com um aumento na carga viral do HIV. Os níveis do mRNA do receptor IFNAR-1 de IFN- α e da proteína efetora principal PKR (proteína quinase) de IFN- α estavam abaixo do nível da detecção, indicando que mesmo que houvesse uma expressão forte de IFN- α , haveria uma resposta imune danificada à ativação de IFN- α . Esta inabilidade de montar uma resposta imune eficiente ao IFN- α pode também contribuir com a aceleração da fibrose hepática.

Blackard et al. (2006) realizaram um dos primeiros estudos comparando reguladores intra-hepáticos da resposta imune quanto à inflamação e à fibrose em indivíduos mono-infectados pelo HCV e co-infectados com o HIV. Surpreendentemente encontraram taxas mais baixas de citocinas, particularmente TNF- α , IL-8 e IL-10, entre pacientes co-infectados HIV/HCV. Além disso, verificaram que o INF- γ não era detectável durante a co-infecção e que níveis de INF- α e INF- β eram mais elevados nos fígados que tinham menos fibrose sugerindo um papel protetor destas citocinas.

Estes autores também demonstraram que o HIV aumenta a fibrose no fígado de pessoas co-infectadas pelo HCV através da indução da expressão do TGF β 1, sugerindo um mecanismo importante pelo qual o HIV com TGF β 1 aumentado e IFN- γ diminuído, podem promover a persistência do HCV (BLACKARD et al., 2006).

A fibrogênese tende a prosseguir mais rapidamente quando os estímulos pró-fibrogênicos adicionais estão presentes. Assim, a co-infecção pode contribuir mais para a fibrose hepática em pessoas HCV positivas induzindo a expressão TGF β 1, sugerindo que uma falha na produção de citocinas pode ocorrer em pacientes co-infectados. O fator de transformação β 1 que induz a produção da citocina fibrogênica (TGF β 1) é também um regulador importante da fibrose hepática e pode ser produzido durante a infecção pelo HIV (BLACKARD et al., 2006; PAL & SCHNAPP, 2004).

As células NK contribuem para a defesa inata do indivíduo através da citólise e pela produção das citocinas tais como o IFN- γ . As células CD56⁺ e CD3-NK constituem em média 13% das células mononucleares do sangue periférico humano. A maioria das células NK (90%) são CD56^{dim}, que são os mediadores principais da citotoxicidade da NK e uma minoria das células NK (10%) é CD56^{bright} que exercem somente fraca atividade citotóxica mas agem como uma fonte importante de citocinas imunoregulatórias (MEIER et al., 2005).

O desenvolvimento e a maturação das células NK são influenciadas fortemente pelas citocinas inatas como a IL-15 que é produzida por diversos tipos de células como as células dendríticas maduras (DCs) em resposta a IFN- α/β e também a IL-15 está envolvida na ativação e na manutenção homeostática das células do sistema imune inato e adaptativo. Uma diminuição da IL-15 pode levar também a uma redução das células NK na co-infecção ocasionando alterações significativas no sistema imune destes pacientes, uma vez que, em ambas as infecções HIV e HCV pode-se encontrar uma distribuição alterada destas células. Sendo assim os níveis reduzidos no soro de IL-15 podem constituir um mecanismo subjacente para explicar as anormalidades encontradas nas células NK nestas duas infecções virais (MATTEI, et al., 2001).

O HIV por si só consegue evitar a ativação do sistema imunológico quando interage com as células dendríticas, as quais juntamente com os macrófagos e os linfócitos queiscentes representam os reservatórios do HIV, permitindo-lhe a re-população do sistema imunitário após a interrupção do tratamento e é muito provável que as células dendríticas sejam a primeira porta de entrada do HIV durante uma nova infecção, pois estas têm habilidade de induzir e coordenar a imunidade relacionada às células T (RINALDO, 2009).

Os hepatócitos estão sujeitos a taxas mais elevadas de destruição celular devido à inflamação intra-hepática contínua causada pela infecção crônica pelo HCV. A apoptose representa um papel importante nos danos mediados pelo vírus C no fígado com indução de receptores apoptóticos, primeiramente em consequência da resposta imune do paciente e posteriormente devido às proteínas virais do HCV. A apoptose dos hepatócitos descrita durante a infecção crônica causada pelo HCV está correlacionada com o grau do dano hepático (BANTEL et al., 2001; CALABRESE et al., 2000).

Recentemente, diversos relatos sugeriram que o aumento nos níveis da apoptose pode representar um papel importante na progressão acelerada da doença hepática em pacientes co-infectados. Os efeitos das proteínas do envelope do HCV e do HIV nos hepatócitos foram estudados usando um modelo *in vitro* de co-infecção. Após a estimulação dupla, expondo simultaneamente as proteínas E2 do HCV e gp120 do HIV, foi observado um aumento da apoptose (MUNSHI et al., 2003).

Apesar dos diversos trabalhos demonstrarem importante papel do sistema imune na co-infecção HIV/HCV novos estudos são necessários para explicar os mecanismos moleculares e imunológicos responsáveis pela persistência do HCV e pela progressão da

doença hepática assim como estratégias terapêuticas para o manejo dos pacientes co-infectados (ROE & HALL, 2008).

2.4 HISTÓRIA NATURAL DA CO-INFECÇÃO HIV/HCV

Como o HIV e o HCV compartilham as mesmas vias de transmissão, a co-infecção é relativamente freqüente, havendo concomitância de hepatite C em cerca de um terço dos indivíduos HIV positivos (SULKOWSKI et al., 2000).

A doença hepática pelo HCV é atualmente descrita pelo estágio e pela velocidade de progressão da fibrose no fígado, classificados em progressores rápidos (menos de 20 anos), progressores intermediários (entre 20-30 anos) e progressores fibróticos lentos (após 30 anos). Este modelo de progressão pode ser aplicado aos pacientes co-infectados HIV/HCV, no qual diversos estudos demonstraram que o número de portadores HIV/HCV considerados progressores rápidos é bem maior e a deficiência da imunidade celular, refletida pela baixa contagem de células T CD4⁺ parece explicar este achado (DI MARTINO et al., 2001; GARCIA-SAMANIEGO et al., 1997; PUOUTI et al., 2001; SOTO et al., 1997).

2.4.1 Impacto do HIV em pacientes portadores do HCV

A co-infecção induz a um pior prognóstico de ambas as infecções, dificultando a resposta imunológica do hospedeiro. Neste contexto, a debilidade imunológica causada pelo HIV acaba conduzindo à rápida evolução do curso natural da infecção pelo HCV, reduzindo de aproximadamente 30 para sete anos o comprometimento hepático com aparecimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC), que constituem causas de morte em pacientes infectados com HIV (CORVINO et al., 2007).

Os efeitos desta associação viral têm sido extensamente estudados, e a maioria dos estudos sugere piora da história natural da hepatite C em pacientes co-infectados pelo HIV. Sabe-se que a evolução clínica da hepatite C na co-infecção com o HIV é determinada pela imunossupressão associada ao HIV, acelerando o curso da hepatite C. Isto foi demonstrado pela primeira vez em dados do estudo *American Multicenter Hemophilia Cohort Study*, onde 10% dos hemofílicos adultos com co-infecção HIV/HCV desenvolviam falência hepática após

um período de 10-20 anos, mesmo antes do aparecimento de infecções oportunistas definidoras de AIDS ou neoplasias (DARBY et al., 1997; EYSTER et al., 1993).

Dante et al. (2008) analisando pacientes co-infectados, verificaram que o vírus HIV pode influenciar a história natural da hepatite C principalmente no momento da infecção aguda pelo HCV, através da resposta das células T específicas. Concluíram que a co-infecção com o HIV está associada com um aumento das taxas de persistência do HCV e uma falta de células T CD4⁺ de resposta específica, sugerindo que a perda celular na resposta imune contra o HCV durante a doença aguda pode contribuir para o fracasso do controle do HCV ou eliminação precoce do vírus, nos pacientes co-infectados pelo HIV.

O efeito do HIV sobre o HCV foi sumarizado em uma meta-análise de estudos múltiplos que avaliaram a correlação entre a co-infecção do HIV e a progressão da doença no fígado demonstrando que a presença do HIV está associada com um maior risco relativo de dano hepático severo e cirrose quando comparado com pacientes mono-infectados pelo HCV (GRAHAM et al., 2001; KOZIEL & PETERS, 2007).

Mohsen et al. (2003) demonstraram em um estudo que alguns fatores, além da imunossupressão, estão associados ao desenvolvimento mais rápido da fibrose hepática nos co-infectados, como a duração da infecção pelo HCV maior que 15 anos, contagem de células T CD4⁺ menor que 250 células/mm³ e ALT maior que 80 UI/L.

Alguns estudos têm sugerido que a progressão mais rápida da doença hepática estaria relacionada com a diminuição significativa das células T CD4⁺ e que os pacientes co-infectados evoluiriam para cirrose e complicações em 6,9 anos enquanto que os mono-infectados levariam em média 23,2 anos (CANCHIS et al., 2004; ROE & HALL, 2008).

Outro fator a considerar na patogenia da co-infecção é o papel da carga viral do HCV, onde o RNA-HCV sérico é mais alto (0,5-1 log em média) em pacientes co-infectados com HIV em comparação àqueles mono-infectados pelo HCV e apresenta uma correlação inversa com o nível de imunodeficiência (HARRIS et al., 2001; POYNARD et al., 1997).

Porém muitos estudos não conseguiram demonstrar qualquer correlação significativa entre os títulos de RNA-HCV e o grau de dano hepático, mas casos de carcinoma hepatocelular já foram descritos em indivíduos co-infectados, demonstrando que este parece ocorrer em idades mais jovens e mais precocemente nesta população (GARCIA-SAMANIEGO et al., 2001).

Também vale ressaltar que nestes pacientes co-infectados a taxa de resposta ao tratamento do HCV é 10-15% mais baixa quando comparado com os pacientes HCV mono-infectados, podendo estar relacionado a elevada carga viral, obtendo melhores respostas nos genótipos 2 e 3 em relação ao genótipo 1 (HALL & ROE, 2008; KLENERMAN & KIM, 2007; MATTHEWS & DORE, 2008).

Um dos fatores que deve ser considerado na evolução da hepatite C é a influência da terapia HAART contra o HIV, uma vez que a presença do HCV é fator preditivo para o desenvolvimento de hepatotoxicidade pelo HAART. Há descrições de que a toxicidade mitocondrial e micro-esteatose induzida por inibidores da transcriptase reversa podem potencializar a agressão hepática induzida pelo vírus C. O risco de hepatotoxicidade induzida por drogas em co-infectados é de três a quatro vezes superior aos mono-infectados, o que parece estar diretamente relacionado à severidade da doença hepática (CORVINO et al., 2007; SORIANO et al., 2002)

As razões para a progressão acelerada da doença hepática nestes pacientes co-infectados não foram totalmente esclarecidas, mas algumas evidências apontam para anormalidades da resposta imune mediada por células e um aumento nas taxas de apoptose, os quais podem ser responsáveis em parte pelo dano hepático (HALL & ROE, 2008).

As citocinas podem ser produzidas praticamente por todos os núcleos das células do corpo, incluindo as células hepáticas. Há crescentes evidências de que várias citocinas mediam a inflamação hepática, apoptose, fibrose e necrose das células hepáticas, mas paradoxalmente podem também mediar a regeneração dos tecidos após a lesão hepática. Entre as várias citocinas, o TNF- α surgiu como um fator chave nos vários aspectos da doença hepática. Alguns dos mais importantes dados sobre a importância do TNF- α foi demonstrado através de um modelo animal quanto a patogênese da alcoólica e não-alcoólica esteato-hepatite. Através de dados de estudos clínicos, estes resultados indicam que o TNF- α é um mediador não só do início da esteatose hepática, mas também na transição para estágios mais avançados da lesão hepática (TILG & DIEHL, 2000).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) pode também contribuir para a severidade da doença hepática no grupo de pacientes co-infectados, pois a esteatose é uma condição clínico-patológica comum nestes pacientes, caracterizada por depósito de lipídeos nos hepatócitos. O espectro da lesão hepática varia de esteatose macrovesicular simples para esteato-hepatite, fibrose avançada e cirrose (SAAS et al., 2005).

Embora a patogênese exata da NAFLD permaneça desconhecida, a hipótese mais aceita é que diversas agressões estão envolvidas nesta condição. Em primeiro lugar, como resultado da resistência à insulina, há uma maior síntese e retenção de triglicérides no hepatócito, levando à esteatose macrovesicular. É provável que uma menor oxidação de ácidos graxos, por disfunção mitocondrial, possa contribuir para esta alteração. A segunda agressão é geralmente atribuída ao *stress* oxidativo, que causa peroxidação de lipídeos na membrana do hepatócito, produção de citocinas que são, em parte, responsáveis pela progressão da esteatose para esteato-hepatite e cirrose. Toxinas bacterianas, hiperprodução de citocinas (especialmente TNF- α), alteração dos estoques de ATP e da atividade da enzima citocromo P450 Cyp2E1 parecem ser gatilhos importantes para a progressão da doença e fibrogênese (ÂNGULO, 2002).

A NAFLD faz parte da síndrome metabólica e é particularmente freqüente em pacientes co-infectados HIV/HCV que parece ter os mesmos fatores de risco para esteatose que os pacientes mono-infectados pelo HCV, porém no HIV somam-se o uso dos anti-retrovirais. A síndrome metabólica compreende um espectro de alterações que incluem a resistência à insulina, diabetes melito tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, obesidade (central ou visceral) e dislipidemia (CAVALHEIRA & SAAD, 2006).

Um estudo realizado por pesquisadores do Johns Hopkins School of Medicine descobriram que a esteatose hepática estava presente em 40% de uma coorte de 112 indivíduos co-infectados. Eles também verificaram que o risco de esteatose hepática foi maior em pessoas que recebiam tratamento com d4T, pois tanto a esteatose microvesicular como a utilização de ITRN (inibidores da transcriptase reversa não-análogos) estão implicados na toxicidade mitocondrial e sugerem que no tratamento clínico dos pacientes co-infectados, especialmente daqueles que já apresentam esteatose, este grupo de medicamentos deve ser evitados ou utilizados com cautela (McGOVERN et al., 2006).

2.4.2 Impacto do HCV em pacientes portadores do HIV

Em contra partida, vários estudos têm sido realizados a fim de determinar a influência da hepatite C na evolução do HIV para AIDS e morte (ROCKSTROH et al., 2005). Todavia, pelo menos quatro estudos independentes provaram que a infecção crônica pelo HCV pode

atuar como um co-fator na progressão da doença pelo HIV (GREUB et al., 2000; MARTIN et al., 2001).

Um estudo de coorte suíço demonstrou que o HCV acelera a progressão da doença pelo HIV. Esse estudo observou que o HCV foi independentemente associado com o aumento no risco de progressão para a AIDS e morte. Também demonstrou que o HCV pode prejudicar a reconstituição imune após a terapia HAART. Indivíduos portadores do HCV foram menos capazes de obter aumento na contagem de células T CD4⁺, de pelo menos 50 células/mm³, em um ano após o início dos anti-retrovirais, quando comparados com indivíduos sem HCV (GREUB et al., 2000; MILLER et al., 2005).

Piroth et al. (1998) utilizaram uma coorte longitudinal para demonstrar que a presença da infecção pelo HCV acelerou a progressão clínica e imunológica em estágios precoces da infecção pelo HIV entre UDI e HSH. Lesens et al. (1999) relataram rápida progressão para AIDS em pacientes co-infectados após o desenvolvimento de doença hepática progressiva em hemofílicos.

Sabin et al. (1997) também mostraram que pacientes co-infectados com HCV genótipo 1 evoluíram mais rapidamente para AIDS ou morte que aqueles co-infectados com outros genótipos, independente da idade e da contagem de células T CD4⁺.

Em contraste, um grande estudo realizado em pacientes co-infectados ao longo de um período de seis anos não encontrou aumento na taxa de progressão para AIDS ou morte, também não verificaram aumento da progressão para AIDS em usuários de drogas injetáveis (ROCKSTROH et al., 2005).

Outro estudo mostrou resultado semelhante quando não encontrou diferença na sobrevida entre pacientes co-infectados e mono-infectados pelo HIV. O risco de desenvolvimento de uma doença definidora de AIDS em pacientes com contagem de células T CD4⁺ < 200 cl/mm³ também não foi diferente entre os grupos (ROE & HALL, 2008).

No entanto, este problema ainda não é consensual na literatura, pois alguns autores observaram que a presença ou ausência do HCV em pacientes com HIV não alterou a progressão clínica e imunológica da doença pelo HIV ou a sobrevida dos pacientes (DORUCCI et al., 1995; STAPLES et al., 1999), bem como à resposta à terapia HAART quanto ao aumento da contagem de células T CD4⁺ (ROCKSTROH et al., 2005).

Alguns trabalhos sugerem que o HCV não afeta diretamente a progressão da doença causada pelo HIV (BONACINI et al., 2004; LINCOLN et al., 2003; ROCKSTROH et al.,

2005). Entretanto, a co-infecção com o HCV parece ter uma influência negativa na tolerabilidade ao esquema HAART. Até 30% dos pacientes com HIV interrompem o tratamento anti-retroviral por causa dos níveis anormais das enzimas do fígado, e os estudos mostraram que o HCV aumenta o risco desta hepatotoxicidade associado ao HAART, levando a maiores taxas de descontinuidade do tratamento nos pacientes co-infectados (MELVIN et al., 2000; SULKOWSKI et al., 2002).

Sabe-se até o momento que o seguimento longo de vários estudos de coorte estão tentando demonstrar de forma mais consistente uma influência significativa da hepatite C no curso da infecção pelo HIV (ROE & HALL, 2008).

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever as características clínicas e imunobiológicas da co-infecção HIV/HCV em uma população de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes co-infectados relacionando-os com o perfil imunológico.
2. Determinar os genótipos do vírus C e subtipos do HIV, bem como a carga viral de ambos os vírus na população de pacientes co-infectados, através de técnicas de biologia molecular.
3. Estudar o perfil da resposta imune celular e de citocinas dos pacientes co-infectados HIV/HCV.

METODOLOGIA

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), centro de referência no ensino, pesquisa e assistência das doenças infecciosas e parasitárias no Estado do Amazonas. Possui uma unidade de internação e serviços de urgência e emergência. Na sua estrutura é dotado de ambulatórios especializados para atendimento de pacientes com doenças infecciosas, entre eles o ambulatório de hepatites virais e o ambulatório de DST/AIDS.

4.2 DESENHO EPIDEMIOLÓGICO DO ESTUDO

O estudo é do tipo descritivo de uma série de casos para caracterização clínica, imunológica e molecular dos pacientes co-infectados HIV/HCV atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2007.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO

Pacientes com diagnóstico sorológico (ELISA) para as infecções pelo HIV e HCV.

Naturais da Amazônia Ocidental Brasileira.

Idade acima de 12 anos e ambos os sexos.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO NO ESTUDO

Pacientes com infecções mistas HIV/HBV e ou HDV.

4.5 SELEÇÃO E ABORDAGEM DOS PACIENTES

A fim de identificar a população co-infectada pelo HIV e HCV atendida na FMTAM no período de 2000 a 2007, procedeu-se um levantamento no banco de dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), banco de dados da Coordenadoria de DST/AIDS do Estado do Amazonas e Gerência de Virologia da FMTAM.

Optou-se por realizar o estudo a partir do ano 2000, pelo fato de não termos dados armazenados relativos às hepatites virais anterior a este ano. Ressaltamos que ao longo deste período a Instituição passou por modernização de seus ambulatórios e laboratórios, entre elas, a informatização dos dados de pacientes atendidos a partir de 2005, bem como a integração à rede de informações do Ministério da Saúde dos casos de AIDS.

Os pacientes selecionados foram convocados a comparecer no ambulatório de hepatites virais. Durante a consulta médica os mesmos responderam a um questionário clínico-epidemiológico onde foram registrados dados de identificação, epidemiológicos e clínicos referentes à evolução das duas doenças (ANEXO A).

Os pacientes só foram incluídos após concordarem com sua inclusão no estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMTAM sob processo nº 2857/2007.

4.6 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os pacientes co-infectados que compareceram ao ambulatório de hepatites foram encaminhados ao laboratório de pesquisa do HEMOAM (Fundação Hemocentro do Amazonas), para a coleta de uma amostra de 30 mL de sangue, que foi realizada pelo corpo técnico da Fundação. As amostras foram coletadas através de punção venosa em seis tubos EDTA (Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA) e um tubo PPT/*Plasma Preparation Tube* (Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Metodologia

O material foi identificado e centrifugado a 200 rpm durante 10 minutos. O plasma foi separado em tubos eppendorf livres de RNase de 1,5 mL e armazenado a -80°C . Parte do material desta coleta foi enviado para o Hemocentro de Ribeirão Preto e o restante da amostra foi processada no HEMOAM.

Dos pacientes também foi coletada outra alíquota de 10 mL de sangue no Laboratório de Análises Clínicas da FMTAM, para realização de hemograma e exames bioquímicos, os quais fazem parte da rotina do atendimento destes pacientes no momento da consulta, e os resultados foram registrados em uma ficha de resultados de exames (ANEXO B).

Como podemos observar na Figura 3, a seleção, avaliação e coleta de exames dos pacientes seguiu um fluxograma em todas as etapas do estudo.

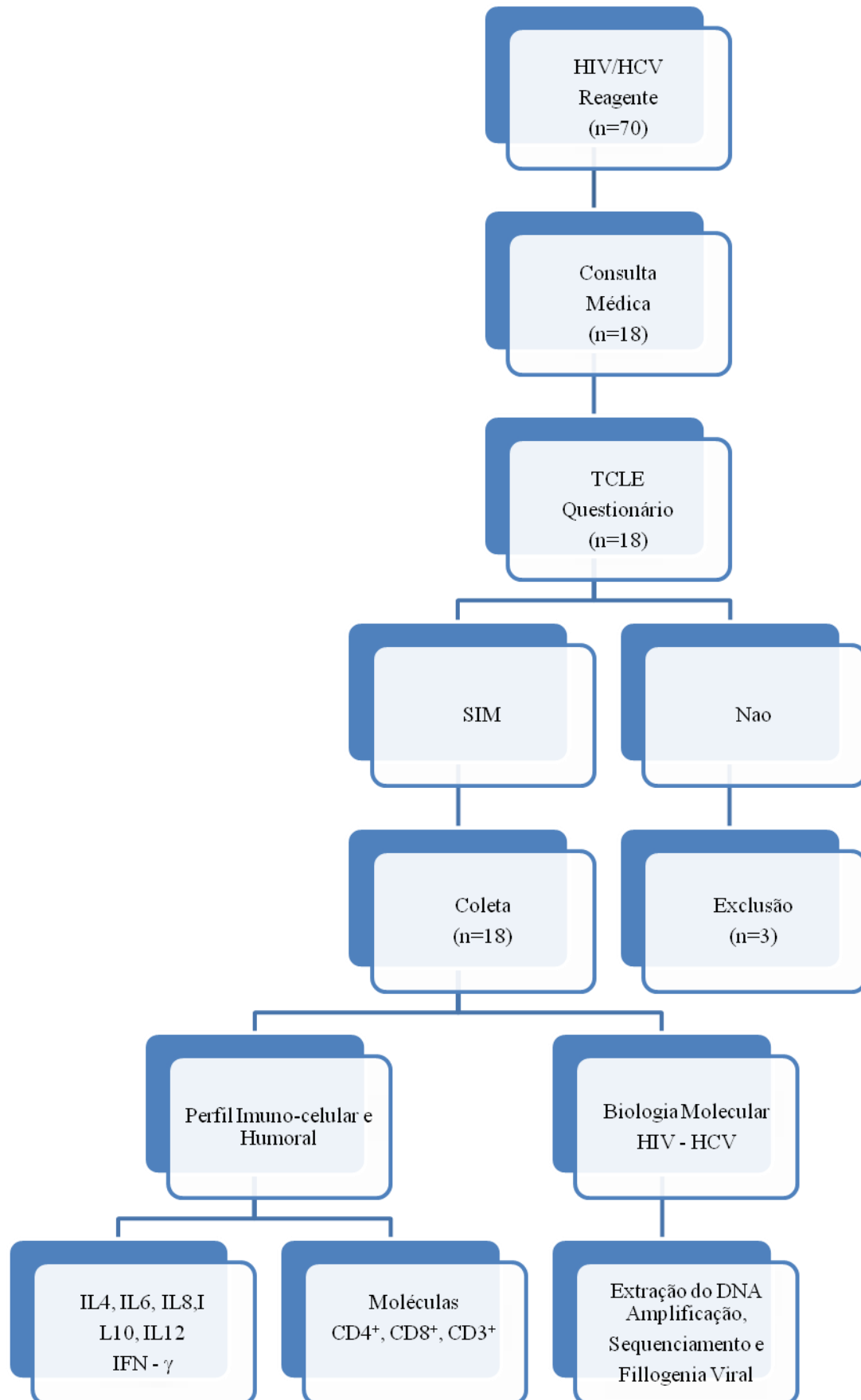


Figura 3: Fluxograma demonstrativo das etapas envolvidas no desenvolvimento do projeto.

4.7 GRUPO CONTROLE PARA ANÁLISE DAS CITOCINAS

A fim de comparação realizamos o perfil das citocinas de 36 pacientes saudáveis doadores de sangue da Fundação HEMOAM. Estes pacientes só foram incluídos no estudo após assinarem o termo de consentimento. Para cada paciente co-infectado foi selecionado aleatoriamente dois doadores saudáveis. As citocinas destes pacientes saudáveis serviram de parâmetro comparativo para os pacientes co-infectados.

4.8 ANÁLISE DO PERFIL IMUNOLÓGICO CELULAR ATRAVÉS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Amostras de 50 µL de sangue venoso coletada com EDTA foram incubadas com anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os marcadores de superfície celulares avaliados: anti-CD8⁺ (code MHCD0801, lote 08090506, marca CALTAG) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD4 (code MHCD0404, lote 23031206, marca CALTAG) marcados com ficoeritrina (PE) e anti-CD3 (code MHCD0306, lote 60010708, marca CALTAG) marcado com terceira cor, foram colocados no fundo dos tubos.

Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2 mL de Solução de lise. Em seguida lavadas com 2 mL de PBS (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas por 7 minutos, a 1300 rotações por minuto. Posteriormente desprezou-se o sobrenadante por inversão e adicionou-se 300 µL de PBS a 1% de formaldeído.

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

A identificação das populações celulares de interesse foi realizada utilizando-se o programa Cell-Quest. Primeiro identificou-se a população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, utilizando gráficos “dot plot” onde a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) (Figura 4A).

Após a seleção da região de interesse, foi analisada a intensidade de fluorescência apresentada pelas células marcadas nesta região, através de histograma de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (Figura 4B).

Após a definição das regiões, o percentual de células positivas foi determinado utilizando-se um histograma simples de análise das regiões. Os resultados obtidos foram anexados na ficha de acompanhamento dos pacientes padronizada para este estudo (ANEXO B).

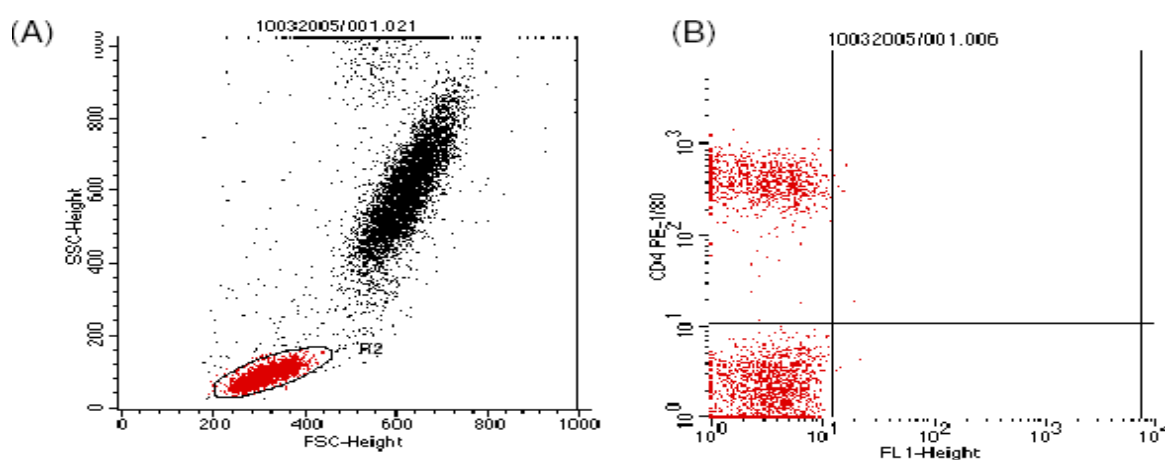


Figura 4: (A) Gráfico Dot plot FSC x SSC utilizado para seleção da população linfocitária – R2. (B) Histograma; FL1 x FL2 utilizado para avaliar parâmetros de interesse em populações celulares específicas.

4.9 ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS EM SANGUE PERIFÉRICO

Foi quantificada a concentração sérica das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL12, IFN gama e TNF em pg/mL através de ELISA, utilizando-se os reagentes do *kit* BD OptEIA[®] (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), específico para cada citocina.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços sensibilizadas com 100µL de Anticorpo de Captura (anticorpo primário) diluído em Tampão de Cobertura ou tampão de ligação, PBS 10X (*Phosphate-Buffered Saline*, 10 vezes concentrado, que é a solução estoque), PBS 1X (solução de trabalho), diluente de ensaio (à base de PBS 1X e soro fetal bovino), tampão de lavagem (à base de PBS 1X e Tween 20), solução de trabalho do padrão de cada citocina, de cada anticorpo primário, e solução de bloqueio (ácido fosfórico 1M ou, preferencialmente,

Metodologia

ácido sulfúrico 2M), conforme orientação do *kit* de cada citocina (para IL4, diluição 1:500; para as demais citocinas, diluição 1:250). As placas foram envoltas com papel alumínio e incubadas “*overnight*” a 4°C (Figura 5).

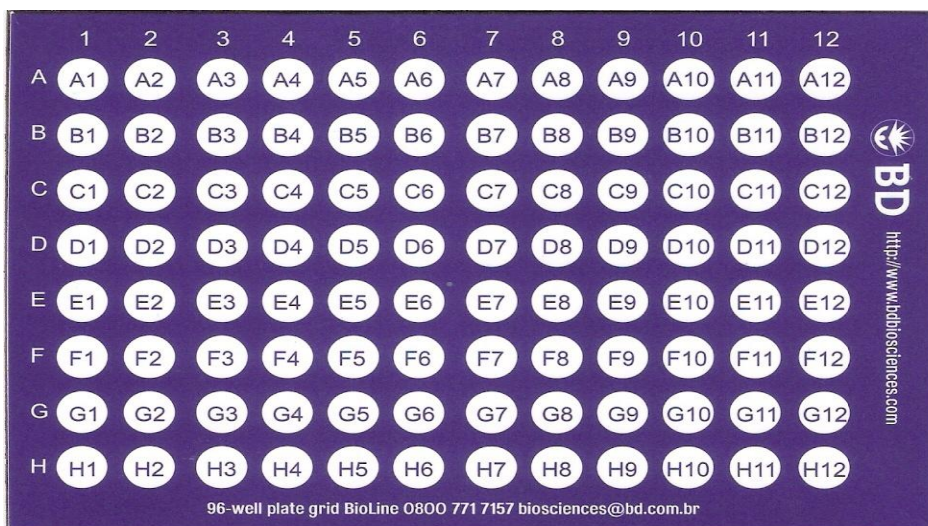


Figura 5: Ilustração de uma microplaca de ELISA com 96 poços.

No dia seguinte, os poços eram aspirados e lavados 3 vezes com 300µL de Tampão de lavagem (PBS 1X com 0,05% de Tween-20 – por exemplo: 500mL de PBS 1X + 250µL de Tween-20) em lavadora automática de ELISA Atlantis Microplate Washer (Asys HITECH, Eugendorf, Áustria). Depois da última lavagem, as placas eram invertidas em papel absorvente para remover qualquer tampão residual.

A seguir, foram adicionados 200µL de Diluente de Ensaio (32 mL PBS 1X com 3,2 mL Soro bovino Fetal; pH 7,0) em cada poço, para inibir ligações energéticas entre as moléculas de anticorpo primário por ligantes inespecíficos. A placa foi novamente envolvida com papel alumínio e incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Após o padrão liofilizado alcançar a temperatura ambiente, o frasco com a solução estoque era cuidadosamente aberto em câmara de fluxo para evitar perda de material. Reconstituiu-se o padrão liofilizado com 1mL de H₂O deionizada, deixando-o em repouso por pelo menos 15 min. antes das diluições. Uma vez reconstituído, o volume inicial foi aliqotado em frascos de polipropileno com 50µl em cada e congelados a -80 °C.

A curva padrão de citocinas foi calculada a partir da concentração inicial do *kit* específico para cada citocina, sendo titulada de 1:2 por meio de diluições seriadas em diluente de ensaio, cujos tubos foram gentilmente agitados a cada transferência de volume (Figura 6).

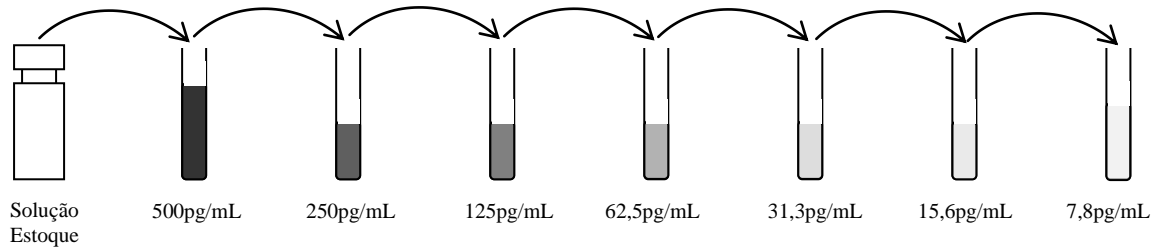


Figura 6: Exemplo de diluição seriada para obtenção da curva padrão de citocina durante o ELISA. A concentração inicial de cada citocina varia conforme o kit.

Finalizada a incubação com diluente de ensaio, aspirou-se e lavou-se a placa novamente, com o mesmo procedimento utilizado após a incubação com o anticorpo primário.

Concluída esta etapa, aplicou-se na placa 100µL de cada tubo da diluição seriada (aplicado em duplicata nos poços ST), bem como de cada amostra (nos poços SM) e controle negativo (diluente de ensaio nos poços BK), conforme exposto na Figura 2. Envolveu-se a placa com papel alumínio e incubou-se a temperatura ambiente por 2 horas (Figura 7).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BK	ST1 500pg/ mL	ST2 250pg/ mL	ST3 125pg/ mL	ST4 62,5pg/ mL	ST5 31,3pg/ mL	ST6 15,6pg/ mL	ST7 7,8pg/ mL	ST8 3,9pg/ mL	SM	SM	SM
B	BK	ST1 500pg/ mL	ST2 250pg/ mL	ST3 125pg/ mL	ST4 62,5pg/ mL	ST5 31,3pg/ mL	ST6 15,6pg/ mL	ST7 7,8pg/ mL	ST8 3,9pg/ mL	SM	SM	SM
C	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
D	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
E	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
F	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
G	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
H	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM

Figura 7: Microplaca de ELISA com 96 poços, sendo 02 controles negativos (BK), preenchidos com diluente de ensaio, 16 ocupados com a diluição padrão das citocinas em duplicata (ST1 a ST8) e 78 disponíveis para amostras dos pacientes (SM1 a SM78).

A placa foi, então, novamente aspirada e lavada, porém com 5 ciclos de lavagens nesta etapa. Preparou-se a solução reveladora com anticorpo secundário + reagente SAV-HRP (*Streptavidine-Horseradish Peroxidase* que é um conjugado de anticorpo monoclonal de camundongo contra Imunoglobulina G humana, marcado com peroxidase de rábano silvestre - *Armoracia rusticana*), específica para cada citocina e foram aplicados 100µL em cada poço. A placa foi envolta com papel alumínio e incubada à temperatura ambiente por mais 1 hora, sendo possível notar a coloração azulada nos poços em que houve reação (cuja intensidade é proporcional à tonalidade do azul).

Terminado este período, a placa foi aspirada e lavada novamente, porém com 7 ciclos no total. Foram adicionados 100µL de Solução de Substrato (Substrato A (H₂O₂) + Substrato B (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina ou TMB) em cada poço. A placa foi novamente envolta com papel alumínio e incubada à temperatura ambiente por 30min. Em seguida, acrescentou-se 50µL de Solução de Bloqueio em cada poço, finalizando a reação.

A absorbância de luz a 450nm foi medida em até 30 min. após a parada da reação, em leitora automatizada Expert Plus Microplate Reader (Asys HITECH), com geração de análises e gráficos de correlação logarítmica entre a absorbância de luz e a concentração sérica de cada citocina.

4.10 TÉCNICAS MOLECULARES DO HIV

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto (USP), pois as técnicas moleculares a serem utilizadas ainda estão sendo padronizadas no HEMOAM e na FMTAM.

4.10.1 Extração do DNA pró-viral do HIV

O processo consistiu na extração do DNA pró-viral a partir do sangue total (parte celular) preservado a -20°C , utilizando-se o *GFX Genomic Blood DNA Purification Kit* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o descongelamento do sedimento celular, foi acrescentado 900 μL do tampão de lise de glóbulos vermelhos (*RBC lysis solution*) a microtubos de 1,5 mL contendo 300 μL de sangue. A mistura foi homogeneizada por inversão manual dos tubos e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 20 s, sendo desprezado o sobrenadante e adicionados 500 μL da solução de extração, seguido de homogeneização em agitador magnético e incubação por 5 min. a temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura foi transferida para uma coluna e centrifugada a 8000 rpm por 1 min., desprezando-se o filtrado. À coluna foi acrescentado 500 μL de solução de extração e centrifugada a 8000 rpm durante 1 min. Foi descartado o filtrado, acrescentado 500 μL de solução de lavagem e centrifugado novamente a 12000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo micro-tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 100 μL de água estéril (Milli-Q), seguido de incubação por 1 min. O DNA então foi recuperado a partir de uma centrifugação de 8000 rpm por 1 min. e estocado a -20°C .

Aos tubos de polipropileno de 15 mL foram acrescentados de 7 a 10 mL do tampão de lise de glóbulos vermelhos gelados (*RBC Lysis Buffer*) de acordo com o volume de sangue. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 15 min. e centrifugada a 2500 rpm durante 20 min. sendo desprezado o sobrenadante. A lavagem de glóbulos vermelhos foi repetida conforme descrito anteriormente. Ao sedimento lavado, foram adicionados 1,5 mL do tampão de lise de glóbulos brancos (*WBC Lysis Buffer*), seguido de homogeneização em agitador magnético e incubação por 30 min. a 55°C . Após a incubação, foram acrescentados 200 μL de SDS 10% e 500 μL de reagente precipitante de proteínas e submetido à agitação vigorosa por

30 s. Novamente, a mistura foi incubada em banho-maria a 55°C durante 15 min. e centrifugada a 2500 rpm por 20 min. O sobrenadante límpido foi transferido para um novo tubo de 15 mL, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, e foi adicionado etanol absoluto, na proporção de duas vezes o volume do sobrenadante. Após homogeneização branda, o DNA foi recuperado em micro-tubos de 1,5 mL e diluído em 200 µL de água estéril (Milli-Q) e estocado a -20°C.

4.10.2 Quantificação do DNA extraído para HIV

Após homogeneização e dissolução completa do DNA extraído das amostras, foram realizadas diluições do DNA a 1:200 em água Milli-Q e a leitura da absorbância em espectrofotômetro (*Gene Quant II RNA/DNA Calculator*, Pharmacia Biotech) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O resultado da absorbância a 260 nm obtido foi multiplicado por 10, para a obtenção da concentração do DNA em µg/µl.

4.10.3 Amplificação por *nested* PCR

O produto da extração foi submetido à amplificação molecular por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em ciclador térmico *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Com a finalidade de verificar a integridade do DNA, foi realizada uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores para o controle endógeno que amplifica uma região do gene da β-globina localizado no cromossomo 11 humano.

Para as regiões *gag*, *pol* e *env*, foi utilizada a estratégia de *nested-PCR*, que consiste em duas etapas de amplificação consecutivas. Na primeira etapa de amplificação, utilizou-se um par de iniciadores externos para cada uma das três regiões. O produto da primeira reação foi submetido a uma segunda etapa de amplificação, com um par de iniciadores localizados internamente à seqüência de nucleotídeos da primeira amplificação. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1

Sequências dos iniciadores para a amplificação das regiões gênicas em estudo

REGIÕES	DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIAS 5' – 3'
<i>Gag</i>	Externos	H1 G777 TCA CCT AGA ACT TTG AAT GCA TGG G
		H1 P202 CTA ATA CTG TAT CAT CTG CTC CTG T
		C1 GGTCAGCCAAAATTACCCTATA
		C2 GGAAATGTGGAAAGGAAGGACA
		H11584 AAA GAT GGA TAA TCC TGG G
		G17 TCC ACA TTT CCA ACA GCC CTT TTT
	Internos	SK ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGA
	C2 GGAAATGTGGAAAGGAAGGACA	
<i>Pol</i>	Externos	K1 CAGAGCCAACAGCCCCACCA
		K2 TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA
	Internos	F1 GTTGACTCAAGATTGGTTGCAC
		F2 GTATGTCATTGACAGTCCAGC
<i>Env</i>	Externos	ED5 ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
		ED12 AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG
	Internos	ED31 CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG
		ED33 TTACAGTAGAAAAAT TCCCCTC

4.10.4 Sistema da reação da PCR para controle da qualidade do DNA

Para β -globina, o sistema da reação de PCR foi composto por: 2,0 μ L de DNA genômico, 2,5 μ L de tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.5), 1,0 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM, 3,0 μ L do *pool* de dNTPs (75 mM de cada desoxirribonucleotídeo), 2,0 μ L de cada iniciador a 10 pmoles/ μ L, 0,3 μ L de *Taq* DNA polimerase a 5U/ μ L e 12,2 μ L de H_2O Milli-Q, totalizando um volume final de 25,0 μ L.

A reação foi inicialmente conduzida durante 35 ciclos em ciclador térmico, cada ciclo sob as seguintes condições: 94°C durante 1 min.; 55°C durante 1 min. e 72°C durante 1 min. Ao término dos 35 ciclos, o produto de amplificação foi mantido durante 10 min. a 72°C. Após este intervalo as amostras foram mantidas a 4°C.

4.10.5 Sistema da reação da PCR para as regiões *gag*, *pol* e *env*

O sistema e as condições de ciclagem para as reações de PCR para as três regiões analisadas foram compostos de acordo com o descrito nas tabelas abaixo. O volume de DNA e de alguns reagentes utilizados varia entre algumas amostras e, conseqüentemente varia o volume de H₂O para completar o volume final da reação (Tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

Tabela 2

Sistema das reações de PCR para a região *gag*

Primeira reação		Segunda reação	
Reagentes	Quant. (µL)	Reagentes	Quant. (µL)
H ₂ O	9,7 – 12,7	H ₂ O	31,5
Tampão/BSA	5,0	Tampão/BSA	5,0
dNTP 75 mM	3,0	dNTP 75 mM	4,0
iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/ µL	1,0	iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/ µL	2,0
iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/ µL	1,0	iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/ µL	2,0
Taq DNA pol 5U/L	0,3	Taq DNA pol 5U/L	0,5
DNA	2,0 – 5,0	Produto da 1 ^a reação	5,0
Volume total	25,0	Volume total	50,0

Tabela 3

Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para *gag*

Temperatura	Tempo	N ^o de ciclos
94 ^o C	2 min.	-
94 ^o C	30 s	-
55-60 ^o C	30 s	35
72 ^o C	1 min. E 30 s	-
72 ^o C	10 min.	-
4 ^o C	∞	-

Tabela 4

Sistema das reações de PCR para a região *pol*

Primeira reação		Segunda reação	
Reagentes	Quant. (µL)	Reagentes	Quant. (µL)
H ₂ O	7,7 – 10,8	H ₂ O	29,5 – 35,2
Tampão/BSA	5,0	Tampão/BSA	5,0
dNTP 75 mM	2,0-3,0	dNTP 50-100 mM	2,5-4,0
iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/ µL	1,0-2,0	iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/ µL	1,0-3,0
iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/ µL	1,0-2,0	iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/ µL	1,0-3,0
Taq DNA pol 5U/L	0,2-0,3	Taq DNA pol 5U/L	0,3-0,5
DNA	2,0 – 5,0	Produto da 1 ^a reação	5,0
Volume total	25,0	Volume total	50,0

Tabela 5

Condições de ciclagem das reações de PCR para *pol*

Primeira reação			Segunda reação		
Temperatura	Tempo	N ^o de ciclos	Temperatura	Tempo	N ^o de ciclos
94 ^o C	3 min.	-	94 ^o C	3 min.	-
94 ^o C	30 s	-	94 ^o C	1 min.	-
55 ^o C	30-55 s	35	55 ^o C	30-55 s	35
72 ^o C	2 min.	-	72 ^o C	1 min.	-
72 ^o C	10 min.	-	72 ^o C	10 min.	-
4 ^o C	∞	-	4 ^o C	∞	-

Tabela 6

Sistema das reações de PCR para a região *env*

Primeira reação		Segunda reação	
Reagentes	Quant. (µL)	Reagentes	Quant. (µL)
H ₂ O	11,7	H ₂ O	30,5
Tampão/BSA	5,0	Tampão/BSA	5,0
dNTP 75 mM	3,0	dNTP 50-100 mM	5,0
iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/ µL	1,0	iniciador <i>forward</i> 5 pmoles/ µL	2,0
iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/ µL	1,0	iniciador <i>reverse</i> 5 pmoles/ µL	2,0
Taq DNA pol 5U/L	0,3	Taq DNA pol 5U/L	0,5
DNA	3,0	Produto da 1 ^a reação	5,0
Volume total	25,0	Volume total	50,0

Tabela 7

Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para *env*

Temperatura	Tempo	N ^o de ciclos
94 ^o C	1 min.	3
55 ^o C	1 min.	
72C	1 min.	
94 ^o C	15 s	35
55 ^o C	45 s	
72 ^o C	1 min.	
72 ^o C	10 min.	-
4 ^o C	∞	-

4.10.6 Seqüenciamento e genotipagem do HIV

Todos os produtos amplificados por PCR foram purificados pelo sistema PROMEGA Wizard PCR Preps DNA *Purification System*, conforme especificações do fabricante.

Os produtos amplificados e purificados das amostras de sangue PCR positivas foram seqüenciadas através do método enzimático de terminação da cadeia, inicialmente descrito por Sanger et al. (1977) utilizando-se o Kit *ABI Prism Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*. O protocolo de reação foi conduzido conforme especificações do fabricante, adicionando-se ao produto do PCR, os *primers* e a solução e seqüenciamento *Big Dye terminator*. Os tubos contendo todos os reagentes foram levados a um termociclador por 25 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: 95^oC durante 10 segundos, 50^oC durante 20 segundos, 72^oC durante 4 minutos; após este intervalo as amostras foram mantidas a -4^oC.

Após o término desta reação foi realizada a precipitação da reação de seqüenciamento. Ao material foram adicionados 80 µL de isopropanol absoluto seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Esta mistura de reação foi centrifugada a 865 g por minuto a 5^oC. As micro-placas foram invertidas e novamente centrifugadas a 24 g por 1 minuto. Foram realizadas lavagens com 200 µL de etanol gelado a 70% e em seguida, as micro-placas foram secas por pelo menos 1 hora à temperatura ambiente.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% foi realizada no aparelho *ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer*, 1500 V, temperatura de 51^oC, durante 6 a 8 horas. Os eletroferogramas

obtidos foram analisados por meio de *software ABI Analysis Data Collection* e convertidos com auxílio do *software DNA Sequencing Analysis* versão 3.3.

4.10.7 Análises filogenéticas

Foi realizado o alinhamento das seqüências de nucleotídeos dos isolados virais usando-se *Softwares* específicos como o Clustal W versão 1.8, e DAMBE (*Data Analysis in Molecular Biology and Evolution*) – versão 4.0.24 (XIA; XIE, 2001). Em seguida, as seqüências em estudo foram alinhadas juntamente com as seqüências de nucleotídeos de protótipos dos genes seqüenciados existentes em bancos de dados *NCBI (Nucleotide Sequence Database)*. As seqüências obtidas do alinhamento múltiplo foram editadas no programa GeneDoc versão 2.6 para correção manual de possíveis artefatos gerados pelos programas de alinhamento.

A partir das seqüências alinhadas e editadas, a árvore filogenética foi construída usando os pacotes de programa *Philip (PHYLogeny Inference Package)* versão 3.5, usando os modelos de *Neighbour Joining (NJ)* e *Maximum Likelihood (ML)*.

4.11 TÉCNICAS MOLECULARES DO HCV

4.11.1 Extração do RNA do plasma

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) sob responsabilidade do Dr. José Eduardo Levi.

A extração do RNA das amostras foi realizada a partir de 140µL de soro utilizando-se o Kit QIAamp[®] Viral RNA (Qiagen, Uniscience do Brasil-SP). As amostras foram inicialmente lisadas em tampão de denaturação para inativação de RNases e para assegurar o isolamento de RNA intacto. As condições de tamponamento foram ajustadas para promover uma ótima ligação do RNA à coluna. O RNA fica ligado à coluna e os contaminantes foram eficientemente lavados e retirados em duas etapas utilizando-se dois diferentes tampões de lavagem (PBS 1X com 0,05% de Tween-20 (p.ex.: 500mL de PBS 1X + 250µL de Tween-20). O RNA foi diluído em um tampão especial livre de RNase que favorece a estocagem e

também o uso direto do RNA. O RNA extraído ficou livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes e inibidores, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida ao término da extração do RNA, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA).

4.11.2 Concentração da amostra plasmática

Para algumas amostras que possam apresentar reatividade no Nested PCR, mas que não apresentem amplicon com sinal bom na reação de PCR utilizando-se o par de *primers* HC 11/18 (que gera um produto amplificado apropriado para o seqüenciamento e genotipagem do vírus da Hepatite C), foi necessário realizar procedimento de concentração plasmática para posteriormente realizar o procedimento de extração de RNA.

A concentração foi realizada submetendo-se cerca de 700 µL de plasma a centrifugação a 30.000 X g por 1 hora a 4°C.

O pellet obtido foi re-suspenso em 140 µL de plasma residual no fundo do tubo. Este material concentrado foi submetido à extração de RNA como descrito anteriormente.

Foi realizado um ensaio deste procedimento utilizando-se amostras controles de painel cedido por Levi, J. E. (Laboratório de Virologia do IMT-SP). As amostras de concentração conhecida apresentam 250 cópias de RNA viral/ML, e 1000 cópias/ML e 1000 cópias/ML respectivamente.

4.11.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a reação de Transcrição Reversa (RT), utilizando-se a enzima Transcriptase Reversa Moloney Murine Leukemia Vírus (M-MLV) (Invitrogen[®]Brasil) que utiliza moléculas de RNA fita simples, na presença de *Random Hexamers N6 (Random primers)* para sintetizar fitas de DNA. A reação foi realizada montando-se um mix (Mix I) de volume final de 69,2µl contendo 8,0µl de Tampão de PCR 10x concentrado, com concentração final 1X (Invitrogen[®] Brasil - Minus MgCl₂), 6,4µl de dNTP's (2,5mM) com concentração final de 0,2mM (Invitrogen[®]Brasil), 8,0µl de MgCl₂ (50mM) obtendo concentração final de 5mM (Invitrogen[®]Brasil), 2,0µl de Inibidor Recombinante de Ribonuclease (40U/µl) resultando numa concentração final de 1U/µl

Metodologia

(RNaseOUT™ – Invitrogen® Brasil), 0,8µl de DTT (dithiothreitol) (0,1M) com concentração de 0,001M (Invitrogen® Brasil) e 44,0µL de RNA.

Esta mistura foi submetida a condições de 65° C por 5 minutos para provocar desnaturação das estruturas secundárias da fita de RNA. Em seguida foi preparado outro mix (Mix II) contendo 4,0µl de *Random Primers* (50 µM) com concentração final de 2,5 µM (Invitrogen®), 1,0µL de M-MLV (200U/µl) com concentração final de 2,5 U/ µl e 6,0µl de H₂O DEPC (UltraPure™ DEPC-treated Water apropriada para uso com RNA e preparada por incubação com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) e depois autoclavada para remover o DEPC (Invitrogen®). À reação inicial (Mix I) foram adicionados 11,0µl do Mix II. Em seguida a reação foi submetida a 22°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos.

Após a síntese de cDNA os mesmos foram utilizados imediatamente para ensaios de PCR ou *Nested PCR* como descrito a seguir ou congelados a -20°C para uso posterior.

4.11.4 Teste qualitativo de PCR – *Nested PCR*

Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), segundo os princípios descritos por Mullis et al., (1986, 1987), utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Os *primers* foram desenhados a partir da região conservada 5'NCR do genoma do HCV (Smith ,D.B, et al., 1995). A figura 6 demonstra a região 5'NCR do vírus da hepatite C do protótipo HCV1 e localização dos *primers* mais utilizados na literatura e a tabela 2 mostra os *primers* que foram utilizados neste estudo (Figura 8 e tabela 8).

REGIÃO NÃO-CODIFICANTE 5'(5'NCR):

LOCUS **HPCHCJ1** 9502 bp ss-RNA VRL 28-APR-1994
 DEFINITION Hepatitis C virus genomic RNA for polyprotein precursor, complete genome.
 ACCESSION D10749 NID g221586
 KEYWORDS polyprotein.
 SOURCE hepatitis C virus (individual_isolate HC-J1) cDNA to genomic RNA.
 ORGANISM Hepatitis C virus

Metodologia

Viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; *Flaviviridae*; Hepatitis C-like viruses.

REFERENCE 1 (sites)

AUTHORS Okamoto et al. (1990)

TITLE The 5'-terminal sequence of the hepatitis C virus genome

JOURNAL Jpn. J. Exp. Med. 60, 167-177 (1990)

MEDLINE 91013116

HC11 P32

-341 gccagccccctgatggggg^{aga}gcgacactccac cat^{aga}gaatcac tcccctgtgaggaaactactg

P33 KY80 SM3

-281 tctttcacgcgaaagcgtct agccatggcgttagtatgagtgctgagcctccaggac

-221 ccccctcccgggagagccatagtggtctgcggaaccggtagtacaccggaattgccag

P48

-161 gacgaccgggtcctttcttgatc^aaacccgtcaatgctggagatttgggcgcgcccc

P36 KY78

-101 gcaagactgctagccgagtagtgtgggtcgcgaaaggccttggtactgcctgatagg

HC18 Core

-41 gtgcttgcgagtgccccgggaggctcgtagaccgtgcacc ATGagcacg

ptc3= 5´AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG 3´ COMEÇA IMEDIATAMENTE APÓS O SM2

NCR4 =5´ACTGCCTGATAGGGTGCTGGAGAGTG 3 QUASE IGUAL AO KY78

HC11(sense)/HC18(antisense) = 331 pb

P32(sense)/P36(antisense)= 220 pb

P33(sense)/P48 (antisense)= 145 pb

KY80(sense)/KY78(antisense)= 244 pb (Amplicor)

HC11/KY78= 300pb P32/KY78= 269pb P33/KY78= 249pb

HC11/P36= 255pb P32/P48= 165pb P33/P36= 200pb

HC11/P48= 191pb P33/HC18= 264pb SM2/HC18= 264pb

SM2/P36= 186pb SM2/P48= 129pb SM2/KY78= 233pb

LEGENDA

tgtgg = Primer fita 5'

gcacc = Primer fita 3'

ggtctg = REGIÃO NCR SMITHS (GENOTIPAGEM)

t^{aga} = nucleotídeos presentes nos *primers* mas diferindo da seqüência de HCV utilizada

OBS SM2 = *Primer 5'* de maior conservação de acordo com Smith et al. (1995), *Primer 2*

Figura 8: Região 5' NCR do vírus da hepatite C do protótipo HCV1, informações do GenBank e localização dos *primers* mais utilizados na literatura.

Tabela 8

Primers da região 5'UTR do genoma do HCV utilizados nos ensaios moleculares

Primer	Seqüência 5' → 3'
	UCV 5'UTR primers
P32 (sense)	CTGTGAGGAACTACTGTCTT
P36 (antisense)	AACACTACTCGGCTAGCAGT
P48 (sense)	GTTGATCCAAGAAAGGACCC
P33 (sense)	TTCACG CAGAAAGCGTCTAG
HC11 (sense)	GGCGACTCCACCATAGATCACT
HC18 (antisense)	GGTGCACGGTCTACGAGACCT

A reação de PCR “*nested*” utilizando *primers* da 5'NCR foi usada considerando-se que o limite de sensibilidade desta é de 1-10 cópias de HCV-RNA/mL (OKAMOTO et al., 1990). Wendel et al. (2007), padronizaram a reação de *Nested* PCR utilizando os pares de *primers* P32 (*sense*) / P36 (*antisense*) e P33 (*sense*) / P48 (*antisense*) e demonstraram que o limite de detecção foi de 100 UI/mL (“hit rate” de 99%-capacidade de detecção entre amostras sabidamente reativas).

A reação foi realizada montando-se um mix de volume final de 25µl contendo 2µl de Tampão de PCR 10x (Invitrogen® - Minus MgCl₂) com concentração final de 1X, 1,6µl de dNTP's (2,5mM) com concentração final de 0,16mM (Invitrogen®-Brasil), 1,4µl de MgCl₂ (50mM) com concentração final de 2,8mM (Invitrogen®), 0,5µl do *Primer* P32 (*sense*) (10µM) com concentração final de 0,2 µM, 0,5µl do *primer* P36 (*antisense*) (10µM) com

concentração final de 0,2 μM (Invitrogen, Brasil), 0,25 μL de Platinum Taq DNA Polimerase (5U/ μL) obtendo concentração final de 1,25U/ μL (Invitrogen[®], Brasil), 1,5 μL de glicerol (57%) com concentração final de 3,42mM (Invitrogen[®], Brasil), 1 μL de Cresol red (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) com concentração final de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 11,25 μL de H₂O deionizada e 5 μL de cDNA. Esta mistura foi submetida a condições de 95° C por 5 minutos para provocar desnaturação das fitas seguido de 35 ciclos nas seguintes condições: 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto e no fim a 72° C por 7 minutos. Esta primeira etapa gera produto amplificado de 220 pb.

Em seguida foi preparado outro mix contendo os mesmos volumes e proporções do mix anterior com a substituição pelo par de *primers* P33 (como *sense*) e P48 (como *antisense*) e o material *template* por 5 μL do produto amplificado da reação anterior. O produto amplificado do *Nested* PCR foi de 145 pb.

As análises foram realizadas no termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburgo, Alemanha.

4.11.5 Identificação dos produtos de PCR

O Produto amplificado foi identificado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose Ultrapure[™] – Invitrogen Life Technologies) em TAE 1X (DNA Typing Grade TAE Buffer – GIBCO – Invitrogen Corporation (2mM Tris- Acetato e 50mM EDTA) corado com Brometo de Etídio (0,35 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Para tal foram misturados 5 μL do produto final de *Nested* PCR com 5 μL do tampão de Azul de Bromofenol 2X.

Além das amostras foram também submetidos à corrida nos géis marcadores de peso molecular de 100pb (Invitrogen[®]) como padrão.

Os géis foram digitalizados através de um sistema para captação e análise de imagens (Alpha Innotec/AlphaEase FC).

4.11.6 PCR qualitativo de produto para identificação dos genótipos do HCV por seqüenciamento

As amostras que apresentaram presença de RNA no plasma ou na “Buffy Coat” foram submetidas a outra reação em cadeia da Polimerase – PCR que gerou um produto amplificado de 308 pb ideal para análise dos genótipos do HCV através da técnica de seqüenciamento.

A reação foi realizada montando-se uma mistura de volume final de 50µl contendo 5µl de Tampão de PCR 10x (Invitrogen® - Minus MgCl₂) com concentração final de 1X, 3,2µL de dNTP's (2,5mM) com concentração final de 0,16mM (Invitrogen®, Brasil), 1µL do *Primer* HC11(*sense*) (10uM) com concentração final de 0,2 µL, 1µL do *primer* HC18 (*antisense*) (10uM) com concentração final de 0,2 µL (Invitrogen, Brasil), 0,5µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) com concentração final de 2,5U/µL (enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 5µL de Glicerol (57%) com concentração final de 5,7mM (Invitrogen®, Brasil), 2µL de Cresol red (2,5µg/UL) com concentração final de 0,1 µg/UL, 22,3µL de H₂O deionizada e 10µL de cDNA. Nesta mistura não foi acrescentado MgCl₂ considerando que no cDNA sintetizado já existe uma concentração final de 1mM de MgCl₂. Esta mistura foi submetida a condições de 95°C por 5 minutos para provocar desnaturação das fitas seguido de 40 ciclos nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e no fim a 72 °C por 7 minutos.

As análises foram realizadas no termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient, Hanburg, Germany. Foi corrido um gel de agarose como descrito anteriormente a fim de identificar a presença dos amplicons correspondentes e de planejar as etapas posteriores para o seqüenciamento dos produtos.

4.11.7 Purificação dos produtos amplificados

A purificação dos produtos amplificados foi feita com a utilização de colunas do Kit Microcon Centrifugal Filter Devices ® (Milipore). Para cada produto de PCR foi utilizada uma coluna sobre um tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 300µL de H₂O MiliQ ultra-pura no topo da coluna sem tocar a membrana; posteriormente foram adicionados todo volume do produto de PCR (cerca de 50µL) no centro da coluna sem tocá-la; As colunas foram centrifugadas por 15 minutos a 550 x g, à temperatura ambiente. Em seguida as colunas foram

invertidas sobre outro tubo de 1,5 ml limpo e estéril e foram adicionados 35µL de água MiliQ no centro da coluna e a mesma foi novamente centrifugada por 5 minutos a 650 x g.

4.11.8 Semi-quantificação dos produtos purificados

Após purificação foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (Ultrapure™ Invitrogen®) contendo 0,5µl/mL de brometo de etídio em tampão TAE 1X (50X - Invitrogen®) para favorecer uma semi-quantificação do produto amplificado para posterior seqüenciamento, utilizando como marcador 4µl do marcador Low Mass Ladder (Gibco®).

Para tal, foram aplicados 5µl do tampão de corrida (Loading Buffer 2x- Invitrogen®) e 5µL do produto amplificado e purificado aplicando-se a mistura de 10µL no gel de agarose. Esta etapa de semi-quantificação permitiu uma comparação visual da intensidade das bandas da amostra com o marcado. Desta forma, foi possível a semi-quantificação do produto amplificado de modo a permitir o uso de aproximadamente 100 ng do material na reação de seqüenciamento.

4.11.9 Reação de seqüenciamento e purificação do produto

Baseando-se na semi-quantificação descrita anteriormente, cerca de 100ng de produto amplificado foi adicionado a um micro-tubo com 3,2 pmol do *primer* HC11 (*sense*), 2µL de Mix ABI PRISM Big Dye Terminator ready reaction (Applied Biosystem Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA), 4,4µL de Save Money (Tris-HCl 200 mM (pH 9,0) e 5mM de MgCl₂). A extensão enzimática foi realizada em termociclador Eppendorf durante 25 ciclos de 96° C por 10 segundos para desnaturação do DNA molde, 50° C por 10 segundos, para anelamento do *primer* e 60° C por 4 minutos para extensão.

O produto foi novamente purificado visando a remoção de excesso de dideoxinucleotídeos “terminadores” presentes na reação, através do método de precipitação. Para tal foi adicionado 80µL de isopropanol (75%) à reação de seqüenciamento e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (protegido da luz) e foi realizada centrifugação entre 15.000 e 20.000 x g por 20 minutos. Então, foi descartado o sobrenadante por aspiração, seguido de lavagem com 160µL de etanol a 80%, seguido de agitação em vortex por 15

segundos, centrifugação por 5 minutos (20.000 g), e aspiração do sobrenadante. Após secagem do pellet a 45° C por 10 minutos as amostras foram re-suspensas utilizando-se 4µL de loading buffer (Applied Biosystem Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA).

4.11.3 Seqüenciamento

Foi montado o gel de eletroforese utilizando-se o Kit Long Ranger Acrilamide® (CAMBREX Bio Science Rockland Inc. ME- EUA) segundo recomendações do fabricante.

A eletroforese do gel de acrilamida foi realizada no seqüenciador ABI PRISM TM 377 Applied Biosystems Incorporation, Foster City, California, EUA.

No momento anterior a aplicação no gel foi feita a desnaturação da amostra a 95° C por 2 minutos e as amostras foram mantidas em gelo para em seguida serem aplicados 2µL de cada amostra no gel de seqüenciamento.

O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o software ABI 377-96 collection v. 2.6.

4.11.11 Análise das seqüências

A genotipagem foi feita através da edição e alinhamento das seqüências das regiões 5'NCR, utilizando o programa *Sequence Navigator* v.3.4 (Applied Biosystems), em conjunto com as seqüências padrão obtidas do GenBank, verificando os genótipos de cada amostra através do acesso on-line para consulta ao banco de dados do Los Alamos *National Laboratory* nos Estados Unidos conforme descrito por Kuiken et al. (2006). As análises das seqüências foram realizadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP.

4.11.12 Determinação da carga viral

A determinação da carga viral foi realizada através da técnica de amplificação de ácidos nucleicos através do kit Amplicor HCV MonitorTM Test (Roche) v.2.0.

Este ensaio baseia-se em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo usando iniciadores específicos complementares do HCV; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo; e detecção dos produtos amplificados fixos à sonda por determinação colorimétrica.

Esta metodologia baseada em PCR permitiu a determinação precisa da carga viral presente no soro/plasma, pela inclusão de um controle, um RNA artificial, contendo as mesmas regiões de ligação dos *primers* ao HCV-RNA, mas com outra sequência nucleotídica entre os *primers*. Os produtos de RT-PCR foram hibridizados com uma sonda interna imobilizada em placa de 96 poços. Os *primers* foram marcados com molécula de biotina, o que permitiu a posterior detecção e leitura por sistema enzimático como os utilizados nas reações sorológicas rotineiras. A relação entre as leituras óticas derivadas do HCV-RNA e do controle, cujo número de cópias incluído na reação é conhecido, permitiu estimar a carga viral da amostra. De acordo com o fabricante, o limite inferior deste método é de 600 UI/mL e o superior é de 850.000 UI/mL.

4.11.13 Controle de contaminação

O controle da contaminação por produtos de PCR (“amplicons”) foi realizado através de estratégias de controle de separação. A separação das três etapas da reação: extração (sala 1), transcrição reversa e preparo da reação PCR (sala 2) e amplificação e detecção (sala 3), foi realizada em três salas distintas com material dedicado para cada sala. Além disso, foi observado o fluxo de circulação de pessoal respeitando não retornar às salas de extração (Sala 1) e sala de preparação de reação de PCR (sala 2) após ter entrado na sala de amplificação e detecção (Sala 3). Também foi utilizada irradiação com luz ultra-violeta sobre as bancadas utilizadas nas fases de preparo de reação de PCR e manipulação de amplicons. O uso de hipoclorito de sódio 10% sobre as bancadas, maçanetas termocicladores e outros objetos também foi regularmente praticado.

4.11.14 Genotipagem do HCV

A genotipagem foi feita através de reação de cadeia de polimerase, variante transcriptase reversa, e da edição e alinhamento das seqüências das regiões 5'NCR e NS5b, utilizando o programa SEQUENCER e comparando-se os genótipos de cada amostra às seqüências-padrão obtidas do GenBank (disponível na Internet).

4.11.15 Armazenamento e guarda do material

O material foi armazenado na Fundação HEMOAM sob guarda da pesquisadora responsável pelo projeto, como determinado pela Resolução 196/96 e foi utilizado somente para o que se propõe no estudo. Para pesquisa futura será apresentado um novo projeto ao CEP.

4.12 EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO

Foi solicitado dos pacientes co-infectados HIV/HCV que compareceram ao ambulatório de hepatite na FMTAM, a realização de exame de investigação ultra-sonográfica do abdome superior segundo os critérios estabelecidos por Cerri & Rocha (1993), para determinação de sinais de insuficiência hepática crônica, ficando assim estabelecido (Tabela 9).

Tabela 9

Alterações ultra-sonográficas encontradas nos pacientes co-infectados HIV/HCV (N=18/70)

<i>Alterações ultra-sonográficas</i>	<i>Código</i>
Fígado normal	1
Atenuação do feixe sonoro	2
Fígado heterogêneo	3
Fígado contraído	4

4.13 ANÁLISE PELO ESCORE DE GRAVIDADE CHILD-PUGH

O escore de gravidade Child-Pugh é usado para classificar a gravidade da doença hepática, utilizando alguns dos fatores que seriam mais significativos no paciente com cirrose. A classificação, no entanto, tem sido utilizada por décadas na prática clínica como um modo de classificar, ainda que de modo grosseiro, o paciente cirrótico em três estágios (A, B e C), com grau progressivo de complicações da cirrose, mesmo assim (Tabela 10).

Tabela 10

Classificação do escore de gravidade de Child-Pugh¹

Encefalopatia hepática	ausente	1-2	3-4
Ascite	ausente	leve	moderada/severa
Albumina	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8
Bilirrubina total	< 2,0	2,0-3,0	> 3,0
Tempo de protrombina	1-4	4-6	> 6
Pontos:	1	2	3

A: 5-6 pontos (leve) B: 7-9 pontos (moderado) C: 10-15 pontos (grave)

Notas: ¹soma-se os pontos para cada um dos cinco itens;

4.14 ESCORE FIB-4

Foi desenvolvido um novo modelo denominado FIB-4 para prever fibrose com base na relação entre quatro coeficientes de regressão.

O índice FIB-4 é calculado de acordo com a seguinte equação:

IDADE (anos) x AST (U/L) x CONTAGEM DE PLAQUETAS (x1000) x ALT (U/L)

Tabela 11

Pontos de corte do escore FIB-4

FIB-4	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
< 1,45	70%	74%	42%	90%
> 3,25	22%	97%	65%	82%

VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo

O escore FIB-4 com valor <1,45 tem um valor preditivo negativo de 90% para excluir Fibrose avançada, enquanto que um valor > 3,25 tem um valor preditivo positivo de 65% para prever fibrose avançada. No entanto, o índice FIB-4, bem como outros modelos biológicos, não foi validado para prever cirrose (STERLING et al., 2006).

4.15 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A amostra utilizada na análise foi composta por 18 pacientes co-infectados HIV/HCV atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) no período de 2000 a 2007 e 36 doadores de sangue saudáveis da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM.

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas de frequência, sendo que para as variáveis CD4⁺, CD8⁺ e carga viral foram calculadas as medianas e os quartis, pois os dados apresentavam distribuição assimétrica. No caso das citocinas, devido à assimetria e a grande quantidade de zeros, foram calculados os logaritmos somando uma unidade a cada valor das variáveis. Na comparação das médias, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância fixado em 5% (VIEIRA, 2004). Foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson para análise do Logaritmo da IL6 com a carga viral do HCV. Os *Softwares* utilizados nas análises dos dados foram o Mintab versão 14 e o Epi-Info versão 3.5 para *Windows* que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC (www.cdc.gov/epiinfo).

Para analisar a frequência do HCV nos casos notificados de AIDS no período do estudo foi utilizado o intervalo de confiança ao nível de 95%, sendo adotado nível de significância igual a 0,05 em todas as análises.

4.16 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da FMTAM em 15/08/2007 sob Processo n^o 2857/2007, estando de acordo com as normas previstas na Resolução N^o 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

5. RESULTADOS

5.1 ASPECTOS GERAIS DA POPULAÇÃO

Inicialmente, a fim de determinar a população a ser estudada, buscamos os dados dos pacientes no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, no qual de 2000 a 2007 encontramos um total de casos de AIDS acumulados no Brasil de 209.975 casos, na Região Norte de 8.903 casos e no Amazonas de 2.653 casos, representando 1,3% do total de casos do país (BRASIL, 2008).

Na região Norte, o Amazonas encontra-se em segundo lugar perdendo apenas para o Estado do Pará. Esta população apresenta entre homens e mulheres uma razão de 2:1, tendência esta que vem se mantendo desde 1999 no Amazonas, enquanto no Brasil a razão atual é de 1,5:1 (BRASIL, 2008).

O presente estudo encontrou 2.653 casos de AIDS no Amazonas notificados no SINAN no período do estudo, sendo que destes apenas 1.582 (59,6%) dos pacientes realizaram exame sorológico para hepatite C (HCV), sendo reativo para o HCV em 70 pacientes, representando 4,4% com IC 95% (3,49 – 5,59) de co-infecção dos pacientes atendidos na FMTAM no período do estudo.

A dupla infecção HBV/HCV foi encontrada em dois pacientes e a tripla infecção HBV/HCV/HDV foi identificada em apenas um paciente, os quais foram excluídos do estudo.

Resultados

Como podemos verificar, de acordo com a curva gráfica anual de pacientes co-infectados observou-se crescimento dos casos, saindo de 1,45% no ano de 2000 para 5,03% no ano de 2007, mostrando um pico isolado no ano de 2001 (5,06%), revelando uma média de crescimento de $3,6\% \pm 1,2$ ao ano dos casos de co-infecção HIV/HCV (Gráfico 1).

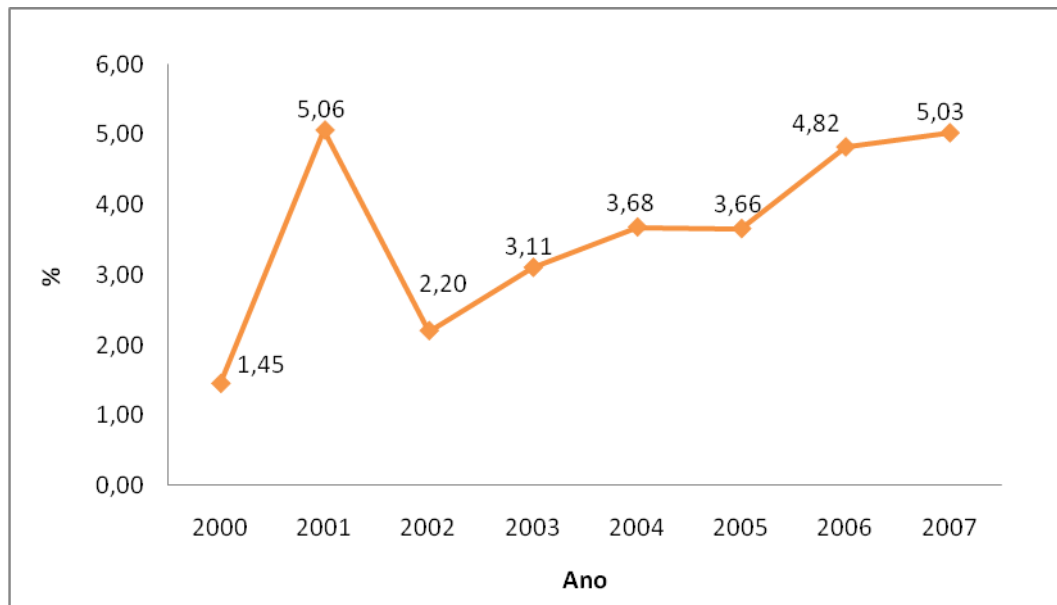


Gráfico 1. Distribuição segundo a frequência anual de co-infectados HIV/HCV, dos pacientes atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=70).

5.3 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO

Como mostra a tabela 12, em relação ao gênero da população de pacientes co-infectados HIV/HCV (n=70), observou-se que a co-infecção ocorreu em 72,9% (n=51) dos homens e 27,1% (n=19) das mulheres.

A faixa etária entre 30|- 40 anos correspondeu a 47,1% (n=33) dos pacientes seguido da faixa etária entre 40|- 50 anos 20,0% (n=14). A idade média da população de co-infectados foi 38,5 anos $\pm 10,2$ com amplitude variando entre 20 a 67 anos

Resultados

Quanto ao grau de escolaridade o primeiro grau completo foi observado em 80% (n=56) da população, 12,8% (n=9) possuem o segundo grau e 2,9% (n=2) possuem o nível superior, sendo que 4,2% (n=3) destes pacientes se declararam analfabetos no momento da entrevista.

O ganho mensal de até um salário mínimo foi observado em 50% (n=35) dos pacientes, 22,9% (n=16) informaram receber até dois salários mínimos, 7,1% (n=5) informaram receber de 4 a 6 salários mínimos e 20% (n=14) encontravam-se desempregados no momento da entrevista.

Em relação à origem dos pacientes observou-se que 55,7% (n=39) eram naturais de Manaus (AM), 21,4% (n=15) eram naturais do interior do Estado do Amazonas e 22,9% (n=16) eram de outros estados. A maioria era procedente de Manaus, 94,3% (n=66) e apenas 5,7% (n=4) eram do interior do estado do Amazonas, não havendo registro de pacientes de outros estados.

Tabela 12

Distribuição segundo os dados demográficos e sócio-econômicos, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=70).

Variáveis (n = 70)	f _i	%
Sexo		
Masculino	51	77,9
Feminino	19	27,1
Idade (anos)		
20 --- 30	11	15,7
30 --- 40	33	47,1
40 --- 50	14	20,0
50 --- 60	10	14,3
≥ 60	2	2,9
Média ± DP	38,5 ± 10,2	
Amplitude	20 - 67	
Escolaridade		
Analfabeto	3	4,3
Primeiro grau completo	56	80,0
Segundo grau completo	9	12,8
Nível superior completo	2	2,9
*Renda (salários mínimos)		
Desempregado	14	20,0
≤ 1	35	50,0
2 a 3	16	22,9
4 a 6	5	7,1
Naturalidade		
Manaus	39	55,7
Interior do Amazonas	15	21,4
Outros estados	16	22,9
Procedência		
Manaus	66	94,3
Interior do Amazonas	4	5,7

f_i = frequência absoluta simples

*Salário mínimo nacional: R\$ 414,00

5.3 FATORES DE RISCO E EVOLUÇÃO DOS PACIENTES

Ao avaliarmos os fatores de risco associados à co-infecção nossos dados demonstraram que acordo com a opção sexual a heterossexualidade foi informada por 68,6% (n=48) dos pacientes, seguido de 22,8% (n=16) de homossexuais e 8,6% (n=6) informaram ser bissexuais. A promiscuidade sexual, definida como mais de dois parceiros em seis meses, foi verificada em 84,3% (n=59) dos pacientes, sendo que 47,1% (n=33) informaram ter adquirido algum tipo de DST (doenças sexualmente transmissíveis), 34,3% (n=24) informaram ser comunicantes de pessoas HIV positivas [parceiro(a) portador(a) do vírus HIV] e 21,4% (n=15) referiram fazer uso de droga injetável.

No período de 2000 a 2007 foi observada a ocorrência de 34,3% (n=24) de óbitos entre a população de pacientes co-infectados (n=70) (Tabela 13).

Tabela 13

Distribuição segundo a opção sexual, fatores de risco para aquisição da co-infecção e evolução para o óbito, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=70)

Variáveis (n= 70)	f _i	%
Opção sexual		
Heterossexual	48	68,6
Homossexual	16	22,8
Bissexual	6	8,6
Parceiro (a) com HIV	24	34,3
DSTs	33	47,1
Uso de drogas injetáveis	15	21,4
> 2 parceiros (6 meses)	59	84,3
Óbito	24	34,3

f_i = frequência absoluta simples

5.4 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO

Para análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais convocamos os pacientes para comparecerem a uma consulta no ambulatório da FMTAM. No entanto, dos pacientes co-infectados identificados no período de 2000 a 2007 (n=70), apenas 25,7% (n=18/70) responderam à convocação e compareceram ao ambulatório de hepatites virais. Após a consulta procedeu-se a coleta de sangue para exames hematológicos, bioquímicos, exames de imunologia celular e humoral e exames moleculares.

Os resultados deste estudo demonstraram que as aminotransferases AST (aminotransferase do aspartato) e ALT (aminotransferase da alanina), apresentaram tendência ao aumento, porém não significativo, com discreta variação em relação às médias, de AST $61,5 \pm 61$ e de ALT $62,2 \pm 37$, respectivamente, demonstrando que as aminotransferases apresentaram comportamento similar nesta população (Gráfico 2A).

A análise da concentração de AST demonstrou que os valores estavam alterados em 33,3% (n=6), enquanto que os valores de ALT estiveram alterados em 66,7% (n=12) dos pacientes estudados.

Vários índices bioquímicos têm sido propostos para a avaliação não invasiva da fibrose hepática, de forma individual ou em diferentes combinações, entre eles está o índice AST/ALT (razão de um pelo outro). Ao ser aplicado na população estudada verificou-se que a relação foi menor que 1, significando que a população tem tendência a apresentar síndrome metabólica (Gráfico 2B).

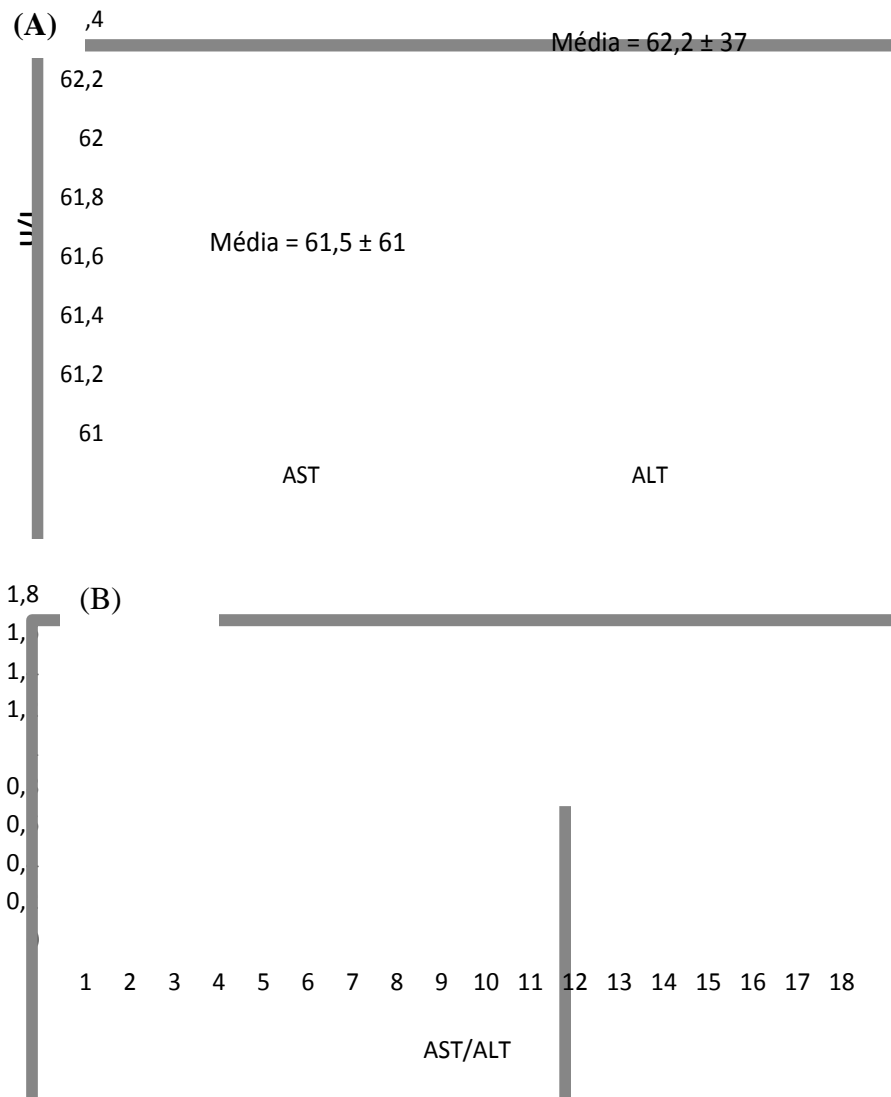


Gráfico 2: (A) Distribuição da média quanto aos valores de AST e ALT, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18). (B) Relação entre AST e ALT dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

*Valor normal da AST ≤ 40 U/L

*Valor normal da ALT ≤ 43 U/L

Resultados

Outro parâmetro analisado neste estudo foi o resultado das lipoproteínas e glicemia dos 18 pacientes estudados, dos quais verificou-se que 61,1% (n=11) apresentavam colesterol total ≤ 200 mg/dL e 38,9% (n=7) > 200 mg/dL. Quanto à glicose 66,7% (n=12) apresentaram glicemia normal e 33,3% (n=6) tinham glicose acima de 110 mg/dL, apesar de nenhum dos pacientes se declararem diabéticos no momento da pesquisa. Observou-se também que 83,3% (n=15) dos pacientes apresentaram HDL ≤ 40 mg/dL e 16,7% (n=3) > 40 mg.dL. Quanto aos triglicerídeos 22,2% (n=4) apresentaram concentração ≤ 150 mg/dL e 77,8% (n=14) tinham triglicerídeos > 150 mg/dL. (Tabela 14).

Tabela 14

Distribuição quanto aos valores de colesterol, glicemia, HDL e triglicerídeos dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18)

Variáveis (n = 18)	f_i	%
Colesterol total (mg/dL)		
≤ 200	11	61,1
> 200	07	38,9
Glicemia (mg/dL)		
≤ 110	12	66,7
>110	06	33,3
*HDL (mg/dL)		
≤ 40	15	83,3
> 40	03	16,7
Triglicerídeos (mg/dL)		
≤ 150	04	22,2
> 150	14	77,8

f_i = frequência absoluta simples

*Valor ideal do HDL (lipoproteína de alta densidade): > 40 mg/dL

Resultados

Como mostra a tabela 15 o esquema HAART para o HIV foi utilizado por 83,3% (n=15) dos pacientes, sendo que destes 100% (n=15) tinham incluído no esquema anti-retroviral um inibidor da protease (IP). Quanto ao tratamento do HCV, 38,9% (n=7) tinham usado anti-virais e todos já haviam concluído o tratamento no momento da pesquisa.

Ao correlacionar o uso do esquema HAART com aos níveis de triglicerídeos na população estudada, verificou-se que dos pacientes que usavam o esquema HAART 66,7% (n=10) apresentavam níveis de triglicerídeos ≥ 150 mg/dL e 33,3% (N=5) tinham níveis < 150 mg/dL. Dos pacientes que não tratavam o HIV 100% (n=3) apresentaram triglicerídeos ≥ 150 mg/dL.

Tabela 15

Distribuição quanto ao uso do esquema HAART para o HIV em relação aos níveis de triglicerídeos dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

Triglicerídeos	*HAART				
	Sim		Não		Total
	f_i	%	f_i	%	
< 150	5	33,3	-	-	5
≥ 150	10	66,7	3	100,0	13
Total	15	83,3	3	16,7	18

f_i = frequência absoluta simples

*HAART: terapia anti-retroviral altamente eficaz

Outro fator importante utilizado para o monitoramento dos pacientes com HIV é a caracterização dos linfócitos T CD4⁺, assim como a relação CD4⁺ /CD8⁺ da população estudada, desta forma utilizou-se estes valores para fazer associações com as análises imunológicas.

Resultados

Como pode-se observar na tabela 16 quanto aos resultados da contagem das células T CD4⁺ da população estudada observou-se que 72,2% (n=13) dos pacientes apresentavam < 500 cls/mm³ e 27,8% (n=5) tinham contagem de T CD4⁺ ≥ 500 cls/mm³. A mediana foi de 271 cls/mm³ com 1^o e 3^o quartil de 169 e 566 cls/mm³, respectivamente, apresentando uma amplitude de 15-1.307 cls/mm³. Quanto às células T CD8⁺ verificou-se que 88,9% (n=16) apresentavam ≥ a 215 cls/mm³ e 11,1% (n=2) < 215 cls/mm³. A mediana foi de 794,5 cls/mm³ com 1^o e 3^o quartil de 558 e 1529 respectivamente, com uma amplitude de 154-2.272 cls/mm³.

Quando avaliou-se a razão CD4⁺/CD8⁺ os resultados demonstraram uma mediana de 0,32 cls/mm³ com 1^o e 3^o quartil de 0,22 e 0,45 cls/mm³, respectivamente, apresentando uma amplitude de 0,08-1,50 cls/mm³ (Tabela 16).

Como podemos verificar no gráfico 3, ocorreu uma inversão da relação T CD4⁺/T CD8⁺ demonstrando uma razão de 1:3, ou seja um linfócito T CD4⁺ para 3 linfócitos T CD8⁺.

Ainda na tabela 16 também foi demonstrado os resultados da carga viral do HIV e HCV dos 18 pacientes estudados. Os dados demonstraram que a mediana da carga viral do HIV foi 16.911 cópias /mL, com 1^o e 3^o quartil de 6.975 e 29.273 cópias/mL respectivamente, com uma amplitude de 5.300 a 148.137 cópias/mL, sendo que nenhum dos pacientes apresentavam no momento da pesquisa carga viral indetectável. Por outro lado, ao avaliar a carga viral do HCV da população estudada verificou-se uma mediana de 543.209 cópias/mL, com 1^o e 3^o quartil de 292.321 e 775.453 cópias/mL respectivamente, com uma amplitude de 47.819 a 98.185.000 cópias/mL. Diferente do observado para o HIV, 33,3% (n=6) tinham carga viral indetectável, sendo que 7 deles haviam sido tratados.

Tabela 16

Distribuição segundo a mediana e os quartis (Q_1 e Q_3) para $CD4^+$, $CD8^+$, razão $CD4^+ : CD8^+$ e Carga Viral para HIV e HCV dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

Variáveis (n = 18)	f_i	%
Contagem de $CD4^+$ cels/mm³		
< 500	13	72,2
\geq 500	5	27,8
Mediana	271	
$Q_1 - Q_3$	169 - 566	
Amplitude	15 - 1.307	
Contagem de $CD8^+$ cels/mm³		
< 215	2	11,1
\geq 215	16	88,9
Mediana	794,5	
$Q_1 - Q_3$	558 - 1529	
Amplitude	154 - 2.272	
Razão $CD4^+ : CD8^+$		
Mediana	0,32	
$Q_1 - Q_3$	0,22 - 0,45	
Amplitude	0,08 - 1,50	
Carga viral HIV (cóp/mL)		
Mediana	16.911	
$Q_1 - Q_3$	6.975 - 29.273	
Amplitude	5.300 - 148.137	
Carga viral HCV (cóp/mL)		
Mediana	543.209	
$Q_1 - Q_3$	292.321 - 775.453	
Amplitude	47.819 - 98.185.000	

f_i = frequência absoluta simples; Q_1 = primeiro quartil (25%) e Q_3 = terceiro quartil (75%).

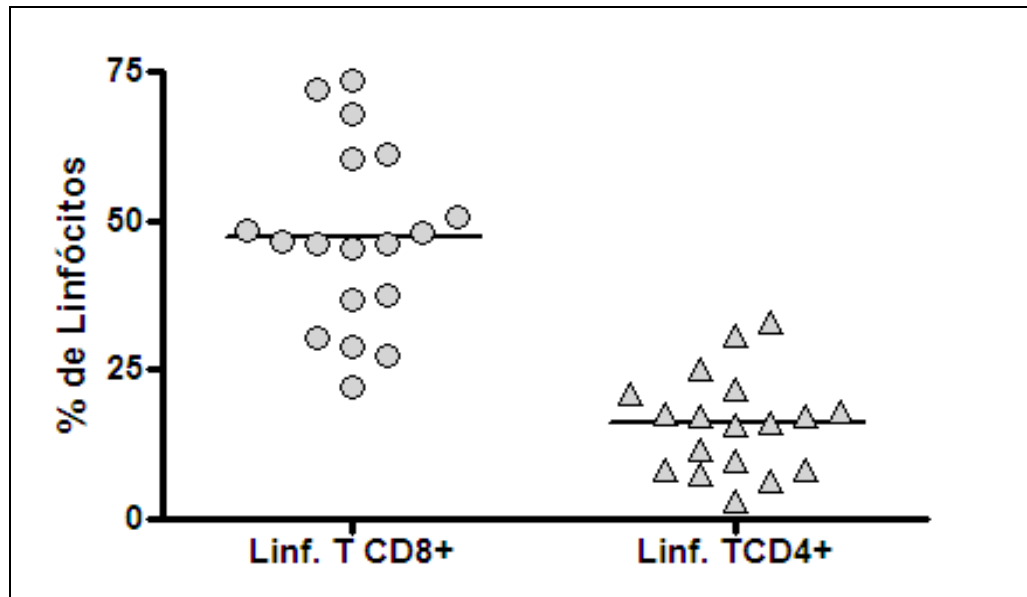


Gráfico 3 : Relação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos pacientes co-infetados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

Outra análise importante foi a correlação da carga viral do HCV (Log) em relação aos resultados de ALT apresentados pelos pacientes. Como podemos observar não houve correlação ($p=0,745$) entre eles, porém pode-se verificar uma tendência à correlação positiva, ou seja, quanto maior a carga viral do HCV, maior a concentração de ALT (Gráfico 4A).

Por outro lado, não foi observado nos resultados dos pacientes nenhuma correlação em relação à carga viral do HIV (Log) em relação aos resultados de ALT (Gráfico 4B).

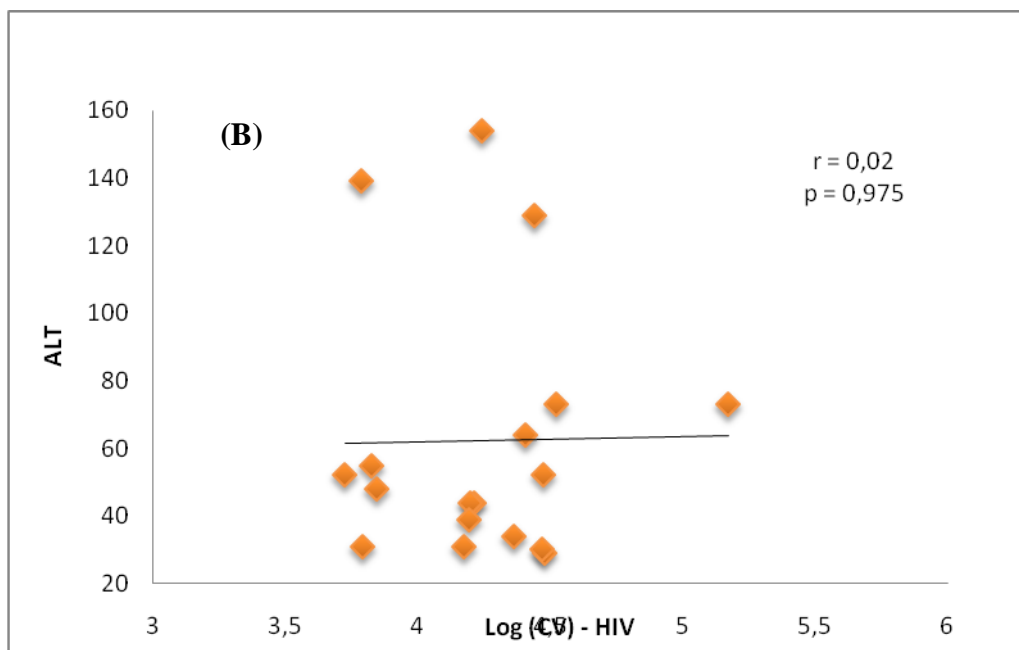
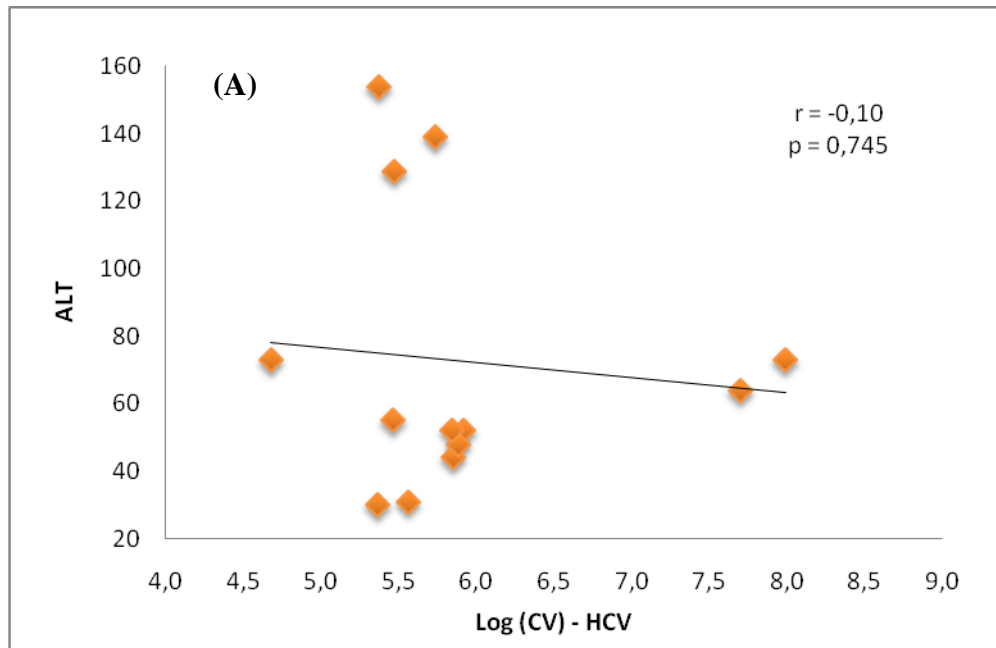


Gráfico 4: (A) Distribuição segundo o logaritmo da carga viral do HCV em relação à ALT, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007. (B) Distribuição segundo o logaritmo da carga viral do HIV em relação à ALT, dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70).

Resultados

Através da técnica de biologia molecular e genotipagem foi possível analisar os genótipos e subtipos dos vírus HCV e HIV em amostras obtidas dos pacientes co-infectados.

Podemos observar em relação ao HCV que 88,9% (n=16) dos pacientes apresentavam o genótipo 1 e 11,1% (n=2) apresentavam o genótipo 3, sendo que os demais genótipos até então conhecidos não foram encontrados nesta população (Gráfico 5A).

Para o subtipo do HIV, verificou-se que 94,4% (n=17) tinham o subtipo B e apenas um paciente apresentou o subtipo F, não podendo afastar a possibilidade de tratar-se de uma forma recombinante BF, porém sugerindo que outros estudos serão necessários para confirmar estes dados (Gráfico 5B).

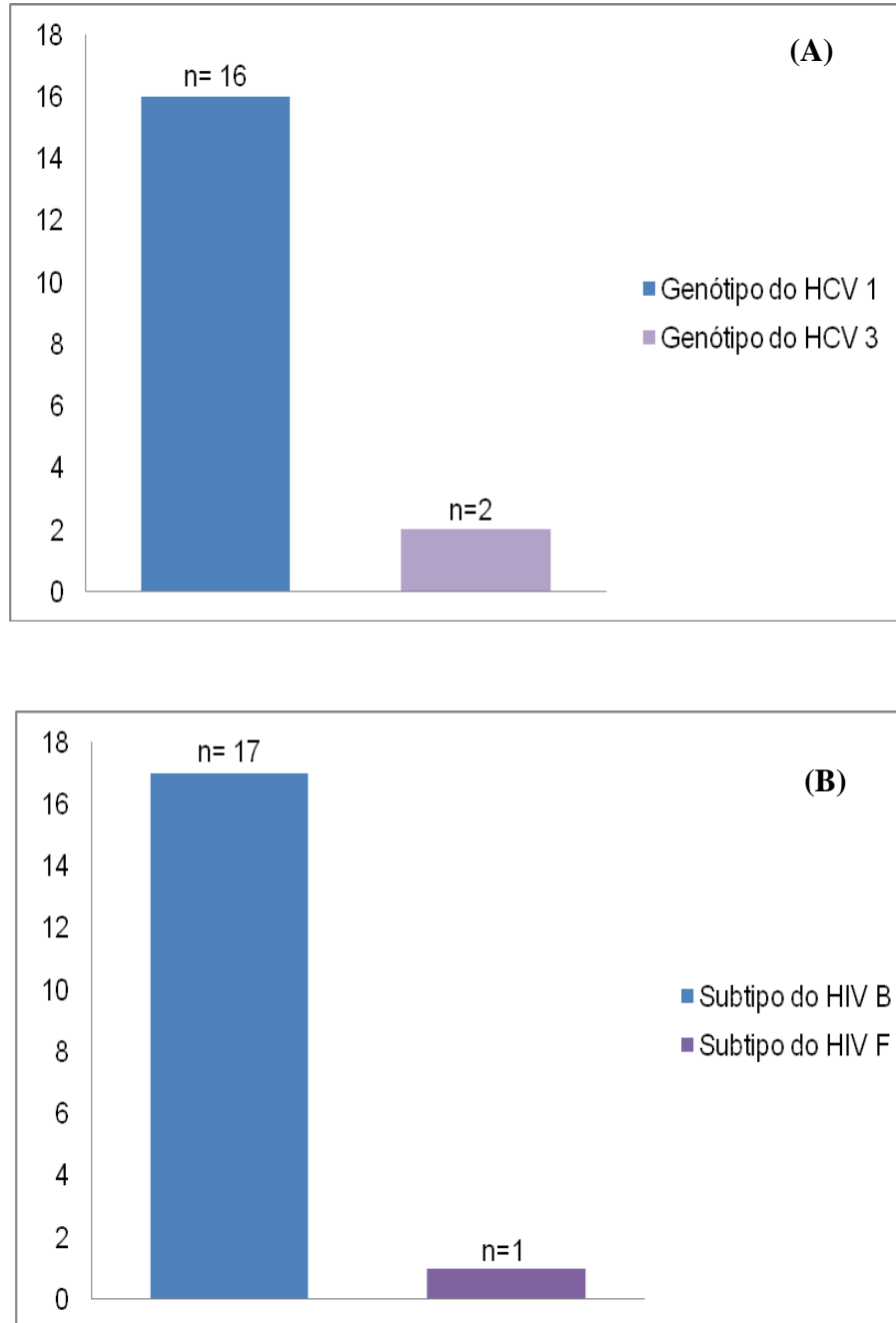


Gráfico 5: (A) Distribuição segundo o genótipo do HCV dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70). (B) Distribuição segundo o subtipo do HIV dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70).

5.5 ATIVIDADE FUNCIONAL E FIBROSE HEPÁTICA

A partir do modelo denominado FIB-4 desenvolvido para avaliar a fibrose hepática com base na relação entre quatro coeficientes de regressão (idade, AST, contagem de plaquetas e ALT), verificou-se que 77,8 (n=14/18) dos pacientes ficaram abaixo do ponto de corte < 1,45, que representa um valor preditivo negativo de 90% para excluir fibrose avançada e 22,2% (n= 4/18) ficou acima do ponto de corte > 3.25 que representa valor preditivo positivo para 65% dos casos em prever fibrose avançada. Este escore foi utilizado neste estudo para avaliar o grau de fibrose hepática dos pacientes (Tabela 17).

Tabela 17

Distribuição segundo o escore FIB-4 dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

FIB-4 (n= 18) (valor de corte)	f_i	%
< 1,45	14	77,8
> 3,25	4	22,2

f_i = frequência absoluta simples

O escore de Child-Pugh tem sido utilizado para classificar e quantificar gravidade e prognóstico da doença hepática crônica, através da avaliação da encefalopatia, ascite, albumina, bilirrubina total e tempo de atividade da protrombina.

Observou-se que nos pacientes estudados 83,3% (n=15) apresentavam Child A (leve), 11,1% (n= 2) apresentaram Child B (moderado) e apenas um paciente apresentou Child C (grave) (Gráfico 6A).

O exame ultra-sonográfico do abdome superior realizado na população estudada revelou que 61,1% (n=11) dos pacientes apresentavam fígado normal à ultra-sonografia, 27,9% (n=5) apresentavam atenuação do feixe sonoro, o que sugere esteatose hepática, 5,5% (n=1) apresentavam fígado heterogêneo e 5,5% (n=1) fígado contraído, sugerindo o aparecimento de cirrose (Gráfico 6B).

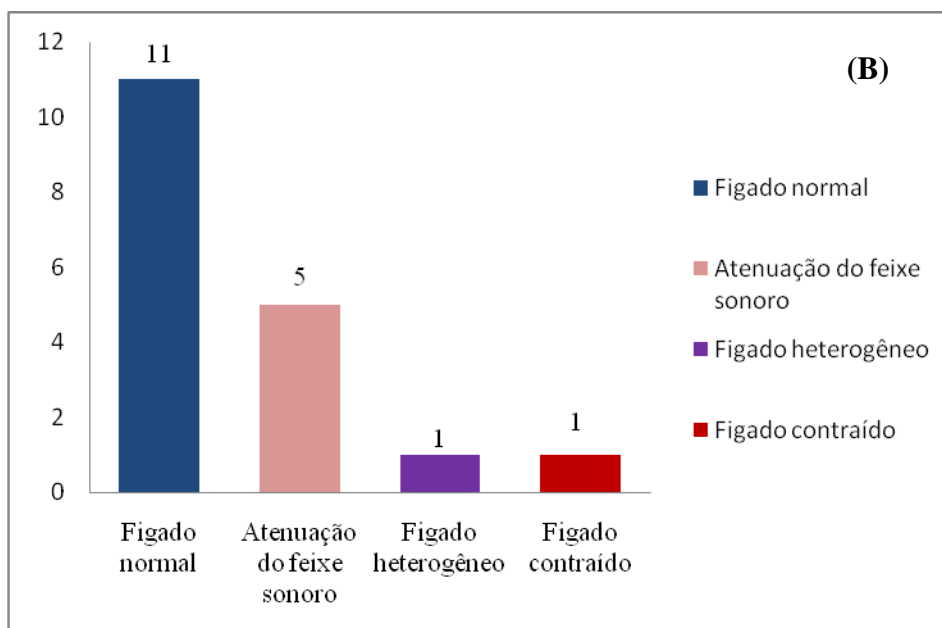
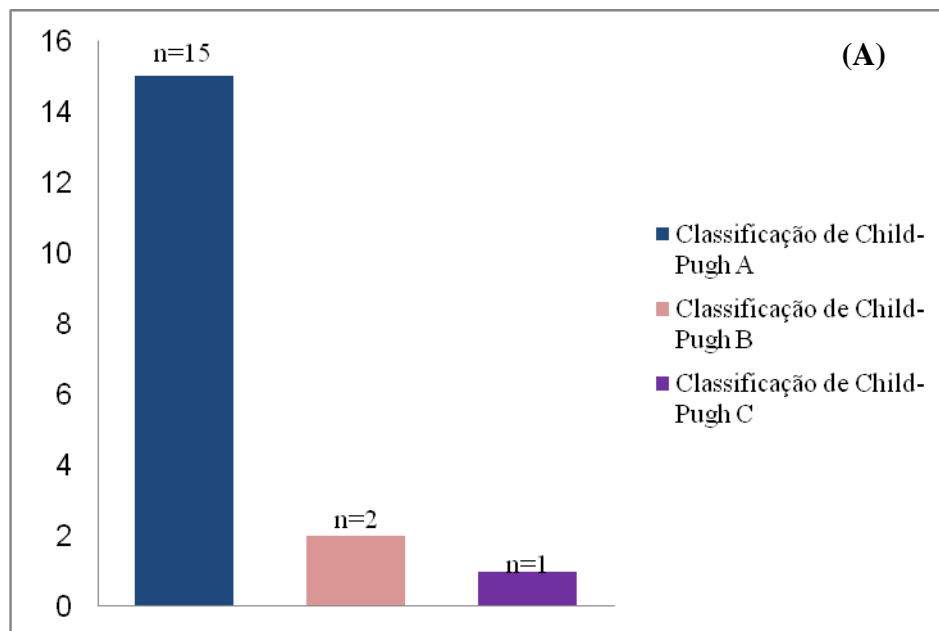


Gráfico 6: (A) Distribuição segundo a média de ALT em relação ao Child Score dos pacientes co-infetados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18). (B) Distribuição segundo as alterações ultrasonográficas dos pacientes co-infetados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70).

A: 5-6 pontos (Leve) B: 7-9 pontos (Moderado) C: 10-15 pontos (Grave)

Resultados

Tanto o escore de Child-Pugh como os achados ultra-sonográficos podem auxiliar na avaliação indireta das alterações hepáticas, portanto, ao correlacionar estes dois parâmetros na população estudada verificou-se que dos pacientes com USG alterada de um total de 7 pacientes 57,1% (n=4) tinham Child A, 28,6% (n=2) apresentavam Child B e 14,3% (n=1) apresentavam Child C. Quanto aos aspectos ultra-sonográficos normais observou-se que de um total de 11 pacientes 100% (n=11) apresentavam Child A (tabela 18).

Tabela 18

Distribuição segundo o Child Score e USG dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

Child-Pugh	USG				
	Alterado		Normal		Total
	f _i	%	f _i	%	
A (leve)	4	57,1	11	100,0	15
B (moderado)	2	28,6	-	-	2
C (grave)	1	14,3	-	-	1
Total	7	38,9	11	61,1	18

f_i = frequência absoluta simples;

A: 5-6 pontos (Leve) B: 7-9 pontos (Moderado) C: 10-15 pontos (Grave)\

Para melhor compreensão das análises clínicas e laboratoriais correlacionamos os parâmetros do FIB-4, Child-Pugh e alterações ultra-sonográficas. Verificou-se que quando os pacientes apresentavam USG alterada 66,7% (n=2) ao adotar o ponto de corte do FIB-4 < 1,45 tinham Child A e 33,3% (n=1) tinham Child B. Ao adotar o ponto de corte do FIB-4 > 3,25 observou-se que de um total de 4 pacientes 50% (n=2) tinham Child A e 25% (n=1) tinham o Child B e C, respectivamente. Ao correlacionar o FIB-4 e Child-Pugh com os aspectos ultra-sonográficos normais observou-se que ao adotar o ponto de corte do FIB-4 < 1,45 de um total de 11 pacientes 100% (n=11) tinham Child A. E ao adotar o ponto de corte do FIB-4 > 3, 25 não houveram pacientes com ultra-sonografia normal (Tabela 19)

Tabela 19

Distribuição segundo o Child Score e USG em relação ao FIB-4 dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

FIB-4 / Child Score	USG				
	Alterado		Normal		Total
	f _i	%	f _i	%	
FIB-4 < 1,45					
A (leve)	2	66,7	11	100,0	13
B (moderado)	1	33,3	-	-	1
C (grave)					
Total	3	21,4	11	78,6	14
FIB-4 > 3,25					
A (leve)	2	50,0	-	-	2
B (moderado)	1	25,0	-	-	1
C (grave)	1	25,0	-	-	1
Total	4	100,0	-	-	4

f_i = frequência absoluta simples

5.6 PERFIL IMUNOLÓGICO DA POPULAÇÃO

Com o objetivo de compreendermos melhor o perfil da resposta imune nos pacientes co-infectados propomos dosar as diferentes citocinas inflamatórias, Th1 e Th2. Como parâmetro de análise comparamos nosso grupo experimental com o grupo de doadores de sangue saudáveis.

Resultados

Ao analisarmos o perfil das citocinas Th1, IL12 e IFN- γ verificamos que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos analisados (co-infectados e doadores saudáveis), para nenhuma das citocinas, IL12 ($p=0,528$) e para IFN- γ ($p=0,081$). No entanto, observamos uma tendência de aumento em ambas no grupo de pacientes co-infectados, como demonstrado na figura 10 (A) e (B).

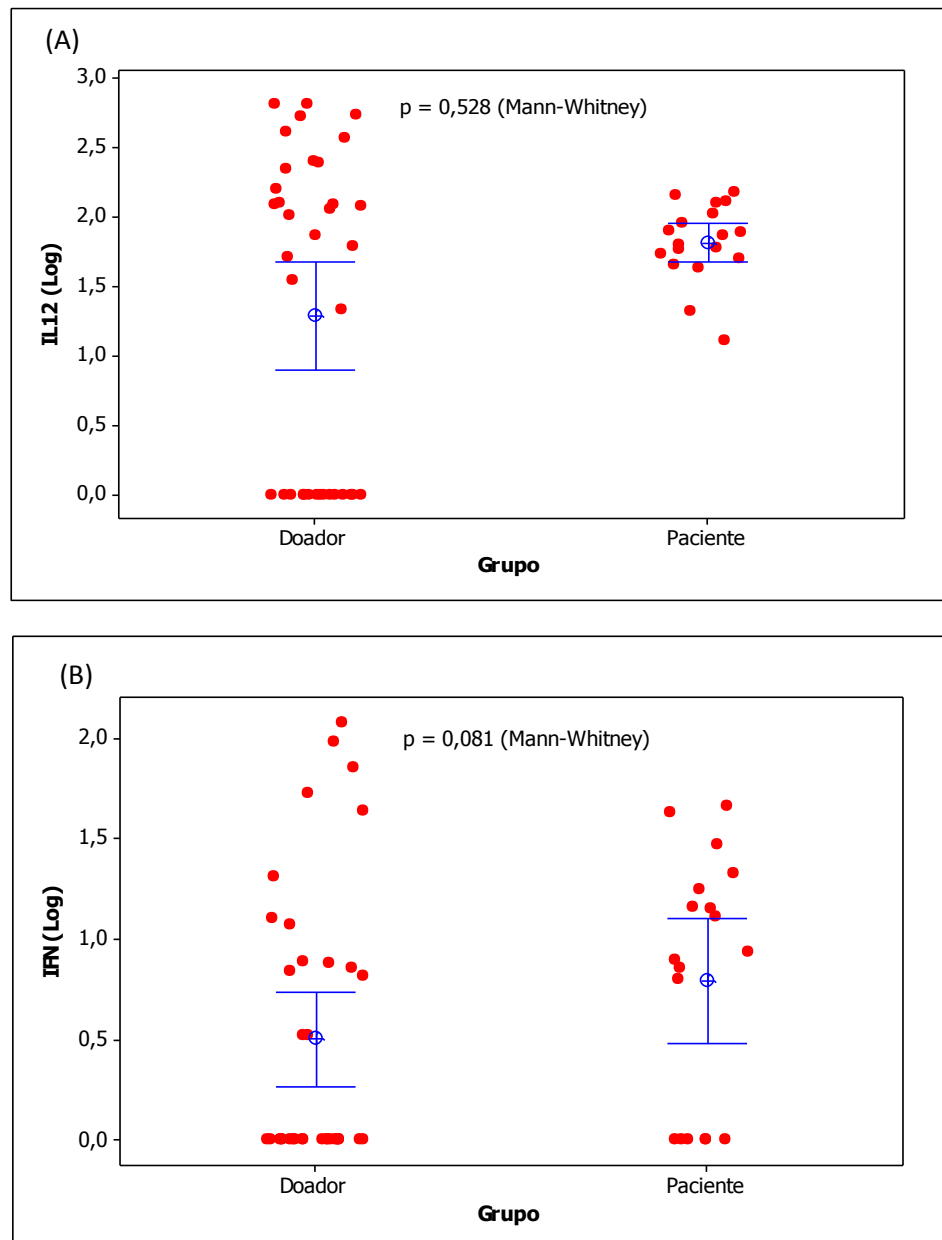


Figura 10: (A) (B) Distribuição segundo o logaritmo das citocinas de resposta Th1 IL12 (A) e IFN- γ (B) em relação a doadores de sangue saudáveis e os pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 ($n=18/70$).

Resultados

Também analisamos o perfil das citocinas inflamatórias IL6 e IL8 do grupo de pacientes co-infectados em relação aos doadores de sangue saudáveis. Os dados demonstraram que a IL6 ($p = <0,001$) apresentou diferença estatisticamente significativa. No entanto a IL8 ($p = 0,174$) não apresentou diferença estatística significativa quando compara ao grupo controle de doadores de sangue saudáveis, como demonstrado na figura 11 (A) e (B).

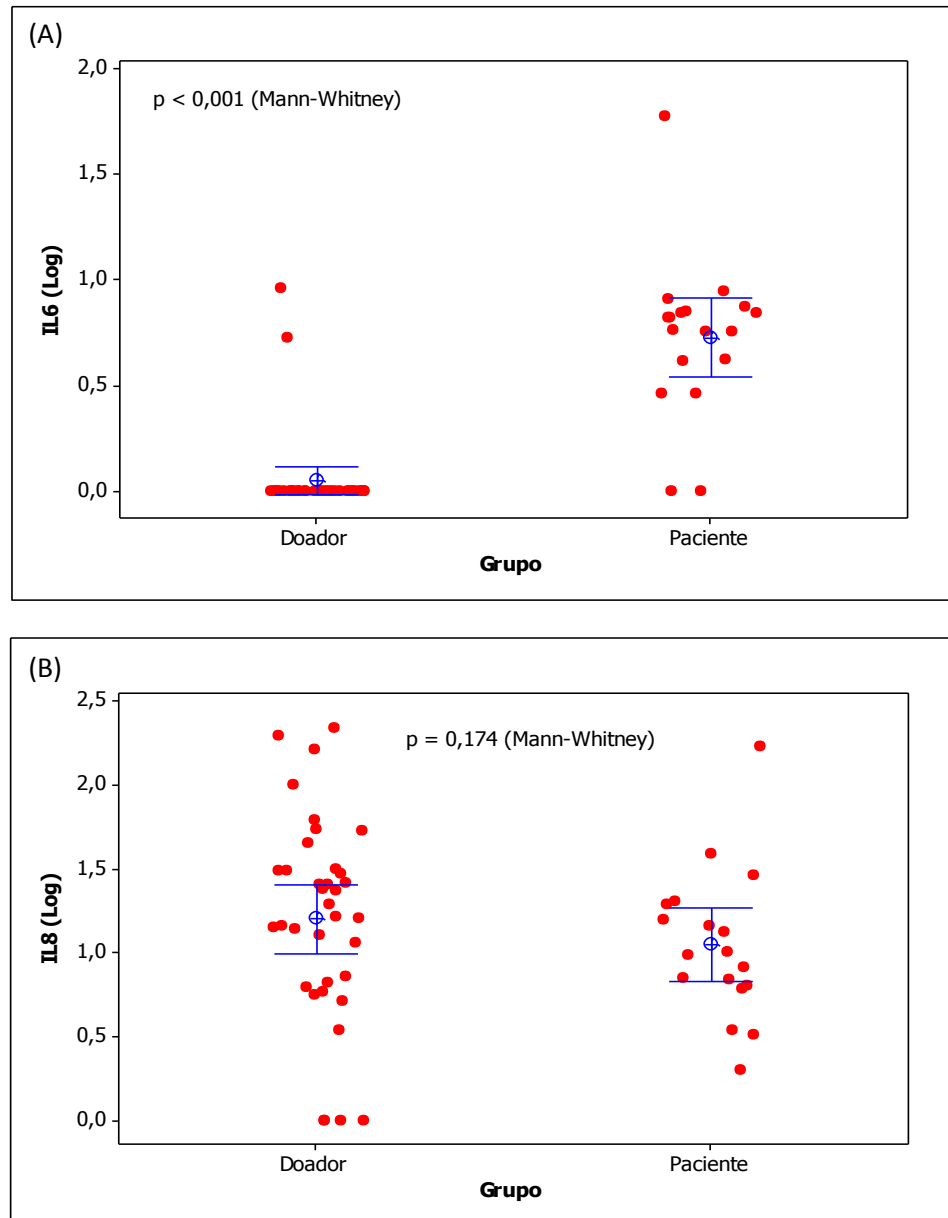


Figura 11: (A) (B) Distribuição segundo o logaritmo das citocinas inflamatórias IL6 (A) e IL8 (B) em relação a doadores de sangue saudáveis e os pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 ($n=18/70$).

Resultados

Com o objetivo de associarmos o perfil imunológico com os genótipos do HCV, analisamos comparativamente cada interleucina com o genótipo 1 e genótipo 3 dos pacientes co-infectados e verificamos que não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das citocinas (Figura 12).

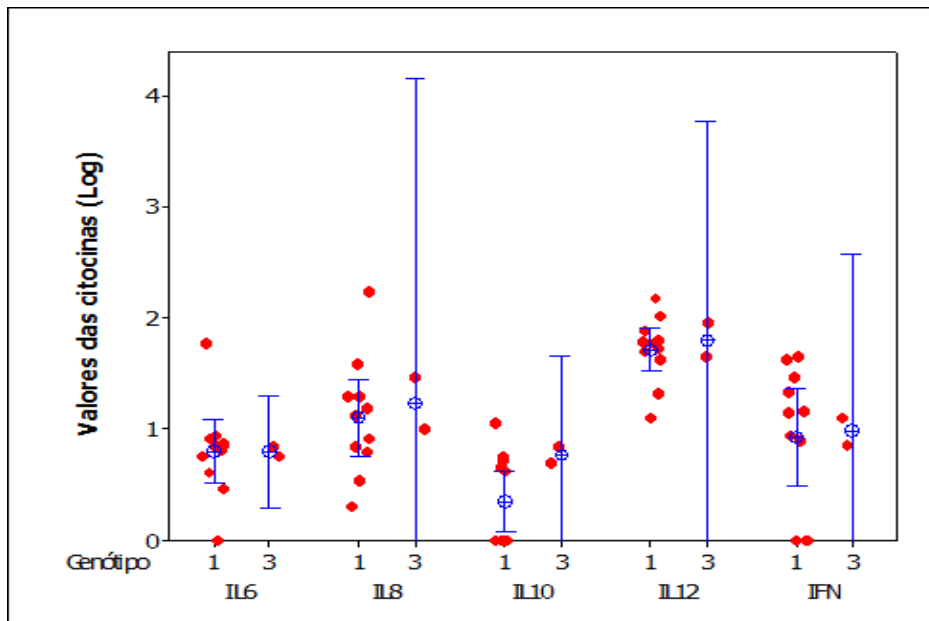


Figura 12: Distribuição segundo os logaritmos das citocinas em relação aos genótipos do HCV dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18/70).

Resultados

Como mostra a figura 13, quando comparamos as interleucinas com os pontos de corte do escore FIB-4, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles, no entanto, houve uma tendência de maior concentração da IL6 em relação ao FIB-4 > 3,25 e maior concentração de IL12 em relação ao FIB-4 < 1,45.

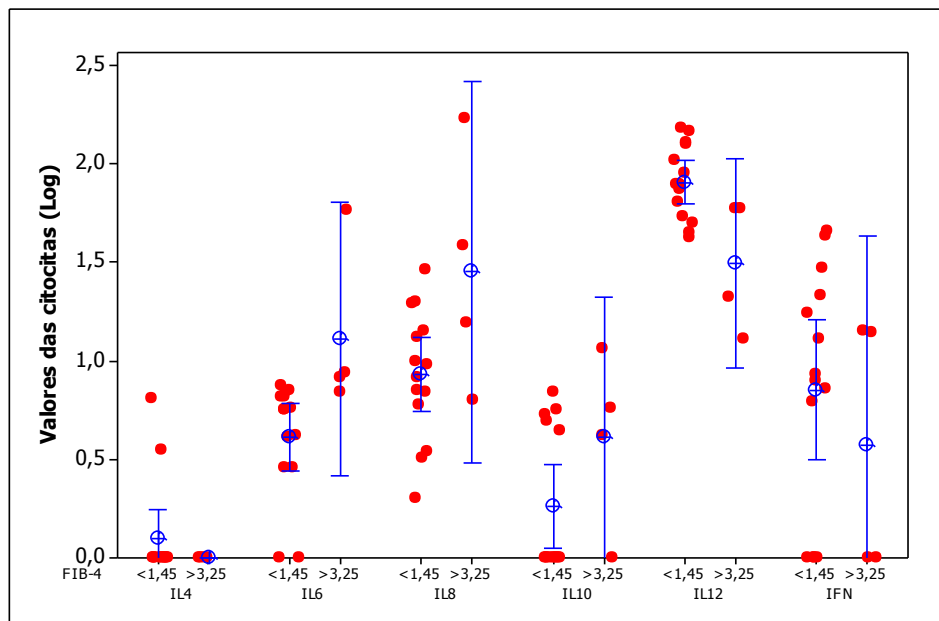


Figura 13: Distribuição segundo o logaritmo das citocinas em relação ao FIB-4 dos pacientes co-infectados HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

Resultados

Ao aplicarmos a correlação de Pearson na análise, o logaritmo das citocinas do grupo de co-infectados em relação à carga viral do HIV e do HCV demonstrou que houve diferença estatística significativa com relação ao logaritmo da IL6 ($p= 0,031$) em relação à carga viral do HCV. No entanto, não houve diferenças estatísticas em relação às outras interleucinas quando comparadas com a carga viral tanto do HIV como do HCV (Tabela 20).

Tabela 20

Análise da correlação segundo o logaritmo das citocinas em relação ao logaritmo da carga viral do HIV e HCV dos pacientes co-infectados por HIV/HCV, atendidos na FMTAM no período de 2000 a 2007 (n=18).

Citocinas (pg/mL)	Carga Viral (Log)			
	HIV		HCV	
	r	p	r	p
IL6	0,30	0,216	-0,60	0,031*
IL8	-0,14	0,579	-0,23	0,452
IL10	0,12	0,647	-0,14	0,657
IL12	-0,45	0,063	0,21	0,484
IFN	0,01	0,966	-0,37	0,217

* Valor de p em negrito itálico indica correlação negativa do logaritmo da IL6 em relação ao logaritmo da carga viral para o HCV.

DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS GERAIS DA POPULAÇÃO

A co-infecção do vírus da hepatite C (HCV) em pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é freqüentemente observada em virtude destes vírus apresentarem similaridade em suas rotas de transmissão. A co-infecção HIV/HCV tornou-se importante problema de saúde pública devido à possibilidade destes vírus agirem sinergicamente, acelerando a progressão da doença hepática relacionada ao HCV. Alguns estudos estimam que a prevalência mundial da co-infecção pode chegar a 90% dependendo da via de transmissão, sendo mais freqüente entre os usuários de drogas injetáveis (ALTER, 2006; MENDES-CORREA et al., 2001).

Nosso estudo mostrou que entre os 2.653 casos de AIDS no Amazonas notificados no SINAM, no período do estudo, 4,4%, estavam co-infectados com o HCV com uma curva de crescimento ascendente de $3,6\% \pm 1,2$ casos por ano de co-infecção. Este aumento possivelmente decorreu da melhora na notificação dos casos de AIDS e investigação do HCV ao longo dos anos e também pelo aumento da sobrevivência destes pacientes com HIV após a introdução do esquema HAART. Esta prevalência do HCV em pacientes infectados pelo HIV é maior que a observada em amostras sorológicas de hemocentros e menor que a encontrada em outras regiões por outros autores, demonstrando que as características epidemiológicas regionais dos fatores de risco são importantes na circulação do HCV entre os infectados pelo HIV.

O Programa Nacional de Controle e Prevenção das Hepatites Virais estima que a prevalência brasileira de co-infecção HIV/VHC varia de 17% a 36% (SBI, 2006). Entretanto Mendes-Corrêa et al. (2001) observa que dependendo da via de transmissão a prevalência da

co-infecção pode variar muito (4% a 90%), sendo os maiores índices encontrados entre usuários de drogas injetáveis.

Monteiro et al. (2004) estudando indivíduos infectados com HIV na cidade de Belém, encontraram uma prevalência de 16% de infecção pelo HCV enquanto Carvalho et al. (2009) em Recife encontraram uma prevalência menor (4,1%), demonstrando que diferenças epidemiológicas regionais possivelmente influenciam a aquisição do HCV nesta população.

Souza et al. (2008) em estudos *pós-mortem* de pacientes com HIV/AIDS na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, encontraram cirrose hepática de natureza não especificada em 2% dos pacientes analisados. Chamot et al. (1990) estudando pacientes co-infectados observou flutuações no *status* sorológico do HCV, com soro-conversão do HCV 2,5 vezes mais freqüente, tornando-se necessária a pesquisa sistemática do HCV- RNA para a confirmação do diagnóstico, porém um resultado negativo não exclui a infecção pelo HCV, devendo esta pesquisa ser repetida quando existirem fortes suspeitas diagnósticas, conforme observado por Lakshmi et al. (2007) e SBI (2008).

6.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA POPULAÇÃO

Nosso estudo revelou um predomínio significativo do gênero masculino (77,9%), conforme observado por Amaral et al. (2007) no Estado do Pará (80,6%), por Carvalho et al. (2009) no estado de Pernambuco (65%) e também por Mendes-Corrêa et al. (2008) no Estado de São Paulo (74,3%).

A média de idade dos pacientes co-infectados no estudo foi 38,5 anos com amplitude variando entre 20 a 67 anos, sendo que 17,1% dos pacientes encontravam-se acima de 50 anos, dados semelhantes foram observados por Pottes et al. (2007) que encontraram 10,8% de casos de HIV em pacientes com mais de 50 anos no Estado de Pernambuco. Nossos dados demonstram aumento da faixa etária quando comparado aos casos no início da epidemia da AIDS.

O crescimento da população idosa no Brasil e no mundo é algo presente nas estatísticas demográficas, neste contexto entre outras doenças emerge a AIDS, cuja tendência sugere que o número de idosos contaminados pelo HIV será ampliado nas próximas décadas (BRASIL, 2008). Além disso, os avanços na terapia da AIDS tornaram possível

reconhecemos um aumento do número de pessoas que contraíram o vírus há mais de 15 anos e que estão envelhecendo com a doença. Permitindo associações mórbidas entre elas e o VHC, que tem os riscos de transmissão aumentados quando o paciente é portador do HIV.

Ao longo do tempo no Brasil houve uma tendência de registro de pacientes com AIDS com maior grau de escolaridade, quando em 1982 a quase totalidade dos casos estavam entre pessoas com nível superior ou segundo grau completo, enquanto que apenas 24% eram analfabetos. A partir de 2000 houve inversão dos valores, sendo que, dos casos com escolaridade informada 74% eram analfabetos ou haviam cursado o primeiro grau (BRITO et al., 2001).

No estudo observamos que 80% dos pacientes selecionados possuem apenas o primeiro grau completo e 4,3% se declararam analfabetos no momento da pesquisa. Estes dados concordam com o trabalho realizado por Silva & Barone (2006) que avaliando os fatores de risco para infecção pelo HIV em pacientes com HCV, encontraram os fatores socioeconômicos como situações determinantes para a aquisição destas doenças.

Foi encontrada neste estudo uma população de pacientes co-infectados com baixa renda, dos quais 50% recebem até um salário mínimo e 20% se encontravam desempregados no momento da pesquisa, demonstrando a mudança no padrão evolutivo da epidemia pelo HIV, quando na década de 80 a maior parte dos casos de AIDS estava entre as pessoas com nível sócio-econômico elevado. O estudo realizado por Fonseca et al. (2003) corrobora com o nosso ao evidenciar a progressiva mudança no gradiente social da epidemia da AIDS, com maior velocidade de disseminação nas populações de menor *status* sócio-econômico.

De acordo com Pottes et al. (2007) o nível educacional da população expressa o acesso à informação, fator fundamental para prevenção e assistência à saúde, os quais estão diretamente ligados à situação socioeconômica da população, onde os melhores indicadores para mensurar o nível socioeconômico associado à saúde são o grau de instrução, a renda e a ocupação. Mesmo a população em todas as camadas sociais, tendo acesso ao tratamento para o HIV, as pessoas de baixo nível sócio-econômico tendem a ter um diagnóstico tardio e conseqüentemente quadro clínico mais grave.

Os pacientes estudados, na sua maioria, eram naturais e procedentes de Manaus. Os dados da Coordenadoria de DST/AIDS do Amazonas confirmam estes achados mostrando que no período estudado 88% dos casos de HIV concentraram-se na capital. No Amazonas a epidemia parece estar concentrada em Manaus, considerada uma cidade-estado, mas

difundindo-se para os municípios do interior, caracterizando-se assim a interiorização da epidemia, já observada nos demais estados brasileiros, onde dos 62 municípios do Amazonas, 44 possuem pelo menos um caso de AIDS notificado (BRASIL, 2008).

6.3 FATORES DE RISCO E EVOLUÇÃO DOS PACIENTES

Atualmente, em quase todas as partes do mundo a principal causa do aumento da infecção pelo HIV é o intercuro heterossexual sem proteção (WHO/UNAIDS, 2007), este dado vem de encontro aos resultados encontrados neste estudo, no qual encontramos 68,6% de co-infecção entre pacientes heterossexuais. O crescimento da co-infecção HIV/HCV entre a população heterossexual provavelmente está relacionada com a prática sexual desprotegida. O contrário tem se observado entre os homens que fazem sexo com homens (HSH), onde houve melhora na prevenção das DSTs e conseqüentemente diminuição dos casos de co-infecção.

Mendes-Correa et al. (2001) estudando fatores de risco em pacientes co-infectados relataram que apenas 8,9% eram homens que fazem sexo com homens (HSH) demonstrando uma maior prevalência entre os heterossexuais, quando comparado com a década de 80, onde o HIV predominava no grupo homossexual. Da mesma forma Amaral et al. (2007) em um estudo no Estado do Pará encontraram 64,5% de pacientes heterossexuais co-infectados, demonstrando o aumento da co-infecção neste grupo de pacientes.

A variabilidade da co-infecção depende dos fatores de risco a que a população se expõe (TOVO et al., 2007). Já é conhecido que o HCV e o HIV têm modalidades de transmissão similares, porém a eficiência da transmissão de cada um dos vírus difere. O presente estudo encontrou como principal fator de risco para a co-infecção a transmissão sexual, caracterizada pela promiscuidade sexual (84,3%) e aquisição de DSTs (47,1%) entre pacientes heterossexuais.

Neste estudo, verificamos que a maioria dos pacientes relatou promiscuidade sexual (84,3%) caracterizada por intercuro sexual com mais de dois parceiros em seis meses, e que 47,1% adquiriram algum tipo de doença sexualmente transmissível (DST). Estes dados estão em consonância com o estudo realizado por Amaral et al. (2007) onde 51,6% dos pacientes co-infectados HIV/HCV apresentaram antecedentes de DST e 58,1% de promiscuidade sexual.

Embora alguns estudos demonstrem que entre os usuários de drogas injetáveis (UDI) a co-infecção possa chegar a 90% dos casos (LARSEN et al., 2008; MONTO et al., 2008; SULKOWSKI, 2008), um recente trabalho realizado por Carvalho et al. (2009) na região Nordeste do Brasil demonstrou uma baixa prevalência de co-infectados entre os UDI, dos quais apenas 8,4% dos pacientes adquiriram o HIV através do uso de drogas injetáveis, concordando com o nosso estudo, no qual não encontramos uma relação positiva entre a co-infecção e o uso de drogas injetáveis, uma vez que apenas 21,4% dos pacientes co-infectados eram UDI. Estes dados diferem das regiões Sudeste e Sul do País que apontam que o uso de drogas injetáveis em co-infectados encontra-se entre 25% e 30% do pacientes.

Tanto os dados encontrados neste estudo, como os relatados na região Nordeste podem sugerir que a via mais freqüente de transmissão da co-infecção não seja a parenteral, através do uso de drogas injetáveis. Um relatório emitido pela ONU apontou o Brasil como o segundo país com maior número de portadores de HIV entre os usuários de drogas na América Latina, além de ser uma das principais rotas de tráfico de cocaína, porém este tipo de droga não é de uso parenteral, representando menor risco de transmissão dos vírus, podendo colaborar para estes achados (BRASIL, 2005).

Muitos estudos têm procurado avaliar o impacto da co-infecção no prognóstico dos doentes com HIV, os quais têm mostrado que os pacientes co-infectados apresentam maior risco de mortalidade, em comparação com os pacientes mono-infectados pelo HIV ou com pessoas apenas infectadas pelo HCV, estes dados concordam com o nosso estudo que encontrou um elevado percentual de óbitos na população estudada (34,3%), os quais na sua maioria ocorreram entre os anos de 2000 e 2003.

Sabe-se que após a introdução da terapia HAART houve importante redução dos óbitos relacionados ao HIV, porém com a maior sobrevivência dos pacientes tornaram-se aparentes as complicações pelo HCV, aumentando a mortalidade em até 50% dos co-infectados, porém há controvérsias na literatura, pois outros estudos ao avaliar o impacto do HCV sobre o HIV, não encontraram nenhuma diferença quanto à sobrevivência entre pacientes co-infectados e mono-infectados pelo HIV. A maioria dos trabalhos sugere que o HCV não afeta diretamente a progressão da doença pelo HIV (BONACINI et al., 2004; MOHSEN et al., 2003; ROCKSTROH et al., 2005; SULKOWSKI et al., 2002).

6.4 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO

Como citado anteriormente, encontramos uma baixa prevalência de co-infecção nos pacientes atendidos na FMTAM quando comparado à outras regiões do país. Esta prevalência refletiu em um número de 70 pacientes no período do estudo, destes apenas 25,7% (n=18) atenderam à solicitação de comparecimento ao ambulatório de hepatites, dos quais procedemos a coleta de material biológico para realização de exames hematológicos, imunológico e de biologia molecular.

Alguns marcadores séricos de fibrose se destacam por apresentar correlação com a histologia hepática e pela facilidade do seu uso clínico, dentre estas podemos citar como ocorre com as enzimas hepáticas AST (aspartato aminotransferase) e a ALT (alanina aminotransferase).

Porém, existem ainda muitas indefinições a respeito dos valores normais absolutos destes marcadores nos pacientes co-infectados, pois flutuações de AST e ALT são comuns neste grupo de pacientes, devido a vários fatores, entre eles está o potencial hepatotóxico das drogas anti-retrovirais e infecções por outros agentes oportunistas. No entanto, o *cut-off* dos diferentes valores e estágios de fibrose e suas sensibilidades e especificidades tem ainda de ser definida nestes pacientes HIV/HCV (PUOTTI et al., 2002).

Neste estudo podemos observar que 66,7% dos pacientes apresentaram ALT alterada e em 33,3% a AST esteve elevada, quando estudos como o de Bortholi (2008) mostrou que enquanto os pacientes mono-infectados pelo HCV apresentam ALT persistentemente normais ao redor de 25%, os pacientes co-infectados atingem um percentual de apenas 7% a 9% de normalidade da ALT.

A relação entre AST/ALT tem sido empregada em vários estudos e tem se mostrado importante na avaliação da esteatohepatite não-alcoólica, a qual é confirmada quando encontra-se resultado desta relação < 1 . Contudo, há controvérsias na literatura a respeito da sua validação e acurácia (IMPERIALE et al., 2000; PARK et al., 2000; SHETH et al. 1998).

Zamin Jr. et al. (2002) realizaram um estudo para avaliar a utilidade da determinação do índice AST/ALT no diagnóstico diferencial da esteatohepatite não-alcoólica (NASH) e da doença hepática alcoólica e concluíram que o mesmo parece ser útil no diagnóstico diferencial das hepatopatias, sendo que valores < 1 sugerem fortemente a hipótese de esteatohepatite não-

alcoólica. A aplicação deste índice nos pacientes do nosso estudo demonstrou que 61% tinham a relação $AST/ALT < 1$, sugerindo a presença da NASH nesta população.

Verificamos neste estudo que concentrações elevadas de ALT foram encontradas em 66,6% dos pacientes estudados e relacionava-se diretamente ao uso da terapia HAART e idade acima de 45 anos. Estudos semelhantes foram realizados por De Ledinghen et al. (2008) que encontrou a idade > 45 anos, índice de massa corporal (IMC) > 25 kg/m², e infecção pelo HIV como fatores independentes associados com fibrose hepática avançada ou cirrose, e concluíram que pacientes co-infectados apresentam níveis maiores de fibrose hepática quando comparados aos pacientes mono-infectados pelo HCV, apesar do benefício imunológico da terapia HAART.

Pohl et al. (2001) estudando pacientes co-infectados verificaram que aumento de AST e ALT tem sido associado com avançada fibrose e em parte relaciona-se com a relativa demora no metabolismo da AST em relação à ALT devido à injúria mitocondrial levando a lesões fibróticas mais intensas.

Outro aspecto a ser considerado na co-infecção HIV/HCV com relação aos exames bioquímicos são as lipoproteínas (colesterol total, HDL e triglicerídeos) e a glicemia sérica, os quais estão envolvidos diretamente na síndrome metabólica e propensão à hipertensão arterial sistêmica encontrada com frequência nestes pacientes. A síndrome metabólica compreende um espectro de alterações que incluem resistência à insulina com ou sem diabetes melito tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, obesidade (especialmente central ou visceral) e dislipidemia (CAVALHEIRA & SAAD, 2006).

De acordo com os dados encontrados neste estudo verificou-se que a maioria dos pacientes avaliados apresentava colesterol total acima do esperado, HDL abaixo dos níveis desejados e tinham elevadas concentrações de triglicerídeos. Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Marks et al. (2005) que avaliando pacientes co-infectados encontraram resultados semelhantes relacionando estes achados com o risco de desenvolvimento de esteatose hepática, enquanto Bedimo et al. (2006) encontraram maiores concentrações séricas de lipoproteínas e glicose entre os co-infectados quando comparados aos mono-infectados com o HCV.

Visnegarwala et al. (2005) verificaram que indivíduos co-infectados têm uma maior prevalência de diabetes e, assim, necessitam ser melhor avaliados antes do início da terapia anti-retroviral, especialmente se o esquema incluir inibidores da protease. De acordo com os

achados deste estudo todos os pacientes entrevistados diziam não ter diabetes no momento da pesquisa, porém ao dosar a glicemia observou-se que 33,3% apresentavam glicose > 110 mg/dL.

Os pacientes com HIV apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de esteatose hepática devido a múltiplos fatores, incluindo a terapia anti-retroviral, obesidade, hiperglicemia, lipodistrofia, e co-infecção com o vírus da hepatite C. Na co-infecção HIV/HCV a prevalência da esteatose hepática varia entre 40-72,1%. Os mecanismos responsáveis por alterações metabólicas associadas aos medicamentos anti-HIV não são totalmente compreendidos (SAITO et al., 2004; VERMA et al., 2008).

De acordo com um estudo brasileiro realizado por Almeida et al. (2009) os autores encontraram uma relação significativa entre a co-infecção, o uso do esquema HAART e efeitos sobre o colesterol total e glicemia.

Os resultados por nós encontrados concordam com o estudo anterior, no qual a esteatose estava presente em 65% dos pacientes avaliados associada à dislipidemia e ao uso do esquema HAART (83,3%) como fatores de risco.

Semelhante também ao estudo realizado por McGovern et al. (2006) que verificaram que 69% dos pacientes co-infectados que apresentavam esteatose hepática, também associava-se ao uso do esquema HAART e ao genótipo 3 do HCV e concluíram que o desenvolvimento de esteatose é multifatorial e pode desempenhar um papel importante na progressão da doença hepática em pacientes co-infectados pelo HIV.

O nosso estudo demonstrou que 66,7% dos pacientes selecionados que utilizavam esquema anti-retroviral apresentavam concentrações de triglicédeos acima do normal e todos estavam no momento da pesquisa em uso de IP (inibidores da protease), em consonância com o estudo realizado por Leitner et al. (2006), que encontraram aumento das concentrações de colesterol total e triglicédeos em todos as classes de anti-retrovirais, porém encontraram maiores aumentos relacionados ao sexo masculino, idades avançadas e uso de inibidores da protease.

De Larrañaga et al. (2006) avaliando a co-infecção HIV/HCV e a utilização do esquema HAART observaram correlação positiva com maiores valores de resistência à insulina, com menor contagem de células T CD4+ e com maior carga viral do HIV-1 em comparação com os pacientes mono-infectados pelo HIV e sugeriram tratar a infecção pelo HCV antes de iniciar o tratamento para o HIV nos pacientes co-infectados.

No presente estudo observamos um percentual elevado de pacientes com síndrome metabólica, provavelmente devido ao fato de que a maioria estava em uso regular do esquema HAART, o qual ao mesmo tempo em que contribui para o surgimento da síndrome metabólica também contribui para uma reconstituição da resposta imunológica.

Apesar da imunidade no paciente portador do HIV ser avaliada primordialmente através da contagem de células T CD4⁺, optamos no estudo por representá-la conjuntamente com os valores médios da carga viral do HIV, já que ambas são intimamente relacionadas e que alterações na carga viral do HIV geralmente implicam alterações na contagem de células CD4⁺. Porém ao analisar nossa casuística verificamos que a população apresentava concentrações médias de T CD4⁺ de 271 cl/mm³ com uma carga viral do HIV não muito elevada, sugerindo que o uso regular dos anti-retrovirais refletiu na contagem das células T CD4⁺, bem como nas concentrações da carga viral. Em relação às células T CD8⁺ observamos concentração média de 794,5 cel/mm³, que expressam a eliminação viral concordando com a literatura em que estas células são fundamentais para a eliminação do vírus e as alterações decorrentes desta reação são um dos fatores responsáveis pela cronicidade da infecção (PAWLOTSKY, 2004; THIMME et al., 2001).

A contagem de células T CD8⁺ é também utilizada na avaliação da infecção pelo HIV, e já foi demonstrado que a resposta celular T CD8⁺ está relacionada com a resposta celular T CD4⁺, no entanto, não constitui um marcador de bom prognóstico. (ALATRAKCHI et al., 2005; HESS et al., 2004)

De acordo com Laurence (1993) na ausência de infecção pelo HIV, normalmente a relação entre a contagem de células CD4⁺/CD8⁺ é ≥ 1 . Essa relação é invertida na presença da infecção pelo HIV mantendo uma relação CD4⁺/CD8⁺ < 1 por toda a evolução da doença, sintomática ou assintomática. Em nosso estudo observamos que a razão entre CD4⁺/CD8⁺ era < 1 apresentando uma proporção de linfócitos T CD8⁺: T CD4⁺ de 3:1 em consonância com a literatura para os co-infectados.

No estudo, a carga viral média do HIV observada nos pacientes foi 16.911 cópias/mL, este controle viral provavelmente está relacionado ao uso regular dos anti-retrovirais, estando em consonância com as concentrações de células T CD4⁺ apresentadas pelos co-infectados.

Bagaglio et al. (2003), observaram que a baixa carga viral do HIV estava associada com a manutenção do “*status*” de não-progressor da doença promovida pelo HIV em pacientes co-infectados com o HCV. O declínio na imunidade celular associado à progressão da infecção pelo HIV pode aumentar a replicação do HCV e, conseqüentemente, a lesão dos

hepatócitos. Estas observações não foram verificadas neste estudo uma vez que a maioria dos pacientes apresentava carga viral do HCV baixa (entre 200.000 e 1000.000) e lesão hepática mínima.

No nosso estudo a correlação da carga viral do HCV e do HIV com as concentrações de ALT não apresentaram significância estatística demonstrando que não houve correlação positiva entre as variáveis, provavelmente devido ao uso dos anti-retrovirais, concordando com o estudo de Pascual-Pareja et al. (2009) que demonstraram que os pacientes que receberam tratamento foram significativamente menos propensos ao dano hepático em relação aos pacientes não tratados o esquema HAART. Sugerindo que a introdução do tratamento precoce do HIV independente dos níveis de CD4⁺ pode ser benéfico para os pacientes co-infectados, reduzindo a replicação viral do HCV e o dano hepático.

Outros estudos também demonstraram que não há correlação tanto da carga viral do HCV como da carga viral do HIV com as concentrações de ALT, pois em relação ao HCV não houve correlação entre carga viral e maior lesão hepática, uma vez que o vírus da hepatite C não é considerado um agente citopático, havendo indícios de que não é a carga viral e sim o sistema imune o responsável por induzir, ou não, a progressão da doença. Da mesma forma quanto ao HIV, os trabalhos mostram a influência de vários fatores sobre a elevação das aminotransferases ficando difícil correlacionar a carga viral isoladamente com a elevação da ALT (FUJIWARA et al., 2004; HELLER & SEEFF, 2005).

Porém outros estudos relatam que a imunossupressão que resulta do HIV parece aumentar a replicação do HCV e que os pacientes co-infectados têm carga viral do HCV mais elevada quando comparada com os pacientes mono-infectados, levando a um maior dano hepático, progressão mais rápida para a cirrose e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, bem como elevado índice de mortalidade (ROE & HALL, 2008).

De acordo com a casuística deste estudo verificou-se que quase a totalidade dos pacientes estudados (88,9%) apresentavam o genótipo 1 do HCV, provavelmente por ser o mais prevalente na Região Norte e apenas dois pacientes apresentaram o genótipo 3, estando de acordo com outros autores que estudando pacientes co-infectados HIV/HCV não encontraram correlação do genótipo com qualquer fator de risco (RAMOS et al., 1998; RUBIO et al., 2001; PIROTH et al., 1999).

Apesar da carga viral e genótipo do HCV não parecer influenciar a história natural da hepatite C crônica, estas características virológicas afetam largamente os resultados

terapêuticos. Indivíduos com baixa carga viral e genótipos 2 ou 3 respondem significativamente melhor ao tratamento do HCV quando comparado aos indivíduos com carga viral alta e genótipo 1 ou 4. Neste contexto o trabalho de Soriano et al. (2008) analisando pacientes co-infectados verificaram que os pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV estavam associados a maiores taxas de carga viral e ao sexo masculino, o que não foi confirmado por este estudo, que apesar de ter predominância do sexo masculino, os pacientes apresentaram carga viral baixa.

Mendes-Correa et al. (2008) estudaram os fatores de transmissão dos vírus em uma série de 100 pacientes co-infectados HIV/HCV e correlacionaram com o genótipo, os quais concluíram que havia associação do genótipo 3 com o uso de drogas injetáveis.

No nosso estudo, dos 18 pacientes co-infectados HIV/HCV encontramos dois pacientes com genótipo 3, dos quais nenhum era usuário de droga injetável, uma vez que a frequência do uso de drogas injetáveis nos pacientes incluídos neste estudo não foi expressiva.

Em um trabalho realizado na Índia, o genótipo 1 foi o mais encontrado. Os autores observaram que o genótipo 1b é transmitido mais frequentemente por transfusão de sangue, enquanto que o genótipo 1a é mais frequentemente relacionado com a promiscuidade sexual, estes dados corroboram com os nossos uma vez que além da grande maioria dos pacientes apresentarem o genótipo 1, possivelmente associado à promiscuidade sexual, já que em nosso estudo não houveram casos de transmissão por transfusão sanguínea (PONAMGI et al. , 2009).

Tovo et al. (2007) descreveram na Região Sul do Brasil, em uma casuística de pacientes co-infectados, o genótipo 1 como o mais prevalente nos pacientes com contagem de células T CD4+ abaixo de 200/mm³ (86,7%), e o genótipo 3 naqueles com mais de 200/mm³ (50,9%). Este estudo corrobora com o nosso uma vez que também foi encontrado o genótipo 1 como o mais prevalente na população de pacientes co-infectados, porém discorda quanto à contagem de células T CD4⁺, que apresentavam números médios acima de 200 cl/mm³ para o genótipo 1, provavelmente devido à recuperação imune após o tratamento com o esquema HAART.

Quanto ao subtipo do HIV, de acordo com os dados encontrados no presente estudo quase a totalidade dos pacientes estudados apresentaram o subtipo B (94,4%) dos quais apenas um paciente apresentou o subtipo F, o que não podemos afastar a possibilidade de tratar-se de uma forma recombinante BF. Os dados da nossa casuística são concordantes com

os demais achados nas diversas regiões do País, como o estudo realizado por Cunha et al. (2007) que na cidade de Manaus, estudando doadores de sangue infectados pelo HIV identificou o subtipo C, o qual ainda não havia sido relatado nesta região, e também identificou os subtipos B e F, bem como a forma recombinante BF. Outro estudo realizado na cidade de Manaus, também encontrou a forma recombinante BF (THONSON et al., 2004).

Estudos mostraram que aproximadamente 14,9% dos isolados do Rio de Janeiro pertenciam ao subtipo F, com formas recombinantes BF. Tanto no Rio de Janeiro como em Belém, no Estado do Pará, o subtipo B foi isolado. Na Argentina, Uruguai e Brasil a CRF12_BF tornou-se prevalente na população heterossexual e verticalmente infectada, sugerindo este meio de transmissão para a forma recombinante BF (REQUEJO, 2006).

Há alguns anos, foi sugerido que os vírus dos subtipos B, C e a forma recombinante CRF01_AE diferiam quanto à transmissibilidade, isto porque, principalmente na Tailândia, o subtipo B está associado a infecções por uso de drogas injetáveis, enquanto que os vírus CRF01_AE são mais frequentemente encontrados nos indivíduos infectados por contato sexual. Nesse sentido, foi inicialmente mostrado que os vírus C e CRF01_AE eram mais eficientes em infectar células de langerhans do que os vírus do subtipo B. Uma vez que estas células são encontradas em grandes quantidades na vagina, no cérvix e na glândula, e estão, via de regra, ausentes no reto. Os autores sugeriram que o tropismo celular observado *in vitro* fosse um indicador da eficiência de transmissão por contato heterossexual (SOTO-RAMIREZ et al., 1996).

Contudo, trabalhos subsequentes não confirmaram estes resultados. Assim, se existem diferenças na transmissibilidade de variantes do HIV-1, estas diferenças não foram ainda bem demonstradas (DITTMAR et al. 1997; KARITA et al., 1997; POPE et al., 1997).

No presente estudo, provavelmente pelo fato da quase totalidade dos pacientes apresentarem o subtipo B não foi possível correlacionar o subtipo com a forma da transmissão da doença, porém vale ressaltar que a transmissão sexual em heterossexuais foi a via de contaminação mais prevalente. E também não pudemos relacionar o subtipo B ao uso de drogas injetáveis, pois apenas 21,4% dos pacientes eram usuários de drogas injetáveis, talvez trabalhos com populações maiores devam ser realizados para melhor avaliar este aspecto.

6.5 ATIVIDADE FUNCIONAL E FIBROSE HEPÁTICA

Embora a biópsia hepática seja ainda o padrão ouro para avaliar a fibrose hepática, tem algumas limitações técnicas e apresenta riscos. Atualmente vários estudos destacam a utilização de métodos laboratoriais para a detecção da atividade inflamatória e fibrótica hepática como uma alternativa mais simples e não invasiva capaz de avaliar e monitorar a dinâmica que envolve a fibrogênese no fígado (KWANG-HYUB & YOON, 2008).

Em nosso estudo ao aplicarmos o marcador não-invasivo da fibrose hepática, FIB-4 observamos que 77,8% dos pacientes co-infectados estavam abaixo do ponto de corte $< 1,45$, que expressa o potencial preditivo negativo de 90% em predizer ausência de fibrose avançada e 22,2% dos pacientes co-infectados apresentavam FIB-4 acima do ponto de corte $> 3,25$ que representa o potencial preditivo positivo de 65% em predizer a existência de fibrose avançada.

Soriano (2006), Loko et al. (2008) e Sterling et al. (2006) estudando a fibrose hepática através do FIB-4 constataram que com a utilização deste método, a biópsia hepática pode ser evitada sem comprometimento do diagnóstico, principalmente em pacientes co-infectados HIV/HCV com fibrose avançada.

Lackner et al. (2005) estudando métodos diagnósticos não-invasivos de avaliação da fibrose hepática em co-infectados, verificaram que o algoritmo APRI foi mais preciso em predizer fibrose hepática que a isolada quantificação plaquetária ou a isolada relação das concentrações de ALT/AST, enquanto o grupo de Lok et al. (2005) adicionaram ao método original APRI, as concentrações de ALT e o RNI (Padrão Internacional de Normalidade de atividade protrombínica), melhorando desta forma a precisão diagnóstica, particularmente em co-infectados portadores de cirrose hepática.

Castaneda-Sceppa et al. (2008) utilizaram o FIB-4 para avaliar fatores preditores de resistência à insulina em co-infectados e observaram que a infecção pelo HCV associada ao uso de anti-retrovirais foram fatores preditivos independentes de resistência à insulina. Em nosso estudo a aplicação do FIB-4 aos pacientes co-infectados, demonstrou fibrose de baixo grau na maioria destes pacientes, assim predizendo resistência insulínica nos pacientes co-infectados em consonância com os estudos realizados pelo grupo de Castaneda-Sceppa.

Outro aspecto que deve ser considerado nos pacientes co-infectados é a gravidade da doença e o prognóstico o que pode ser avaliado através do escore de gravidade de Child-Pugh, utilizando fatores como presença de encefalopatia e ascite, concentrações de albumina,

bilirrubina total e tempo de atividade protrombínica (TAP). No presente estudo ao aplicarmos o escore de Child-Pugh verificamos que 83,3% dos pacientes apresentavam Child A o que significa que a maioria dos pacientes estudados apresentou lesão hepática leve, provavelmente devido ao uso do esquema HAART.

Um recente estudo demonstrou que a pontuação de Child-Pugh B e C estão significativamente associados com cirrose hepática e conseqüente diminuição da sobrevida em pacientes co-infectados, e que a manutenção da supressão viral do HIV através do uso contínuo do esquema HAART está associado com sobrevida prolongada. Os autores verificaram ainda que Child-Pugh B tem associação significativa com o risco em curto prazo da primeira descompensação hepática, e sugerem que pacientes co-infectados HIV/HCV com cirrose compensada e Child-Pugh B devem ser seguidos de perto devido ao risco iminente de descompensação hepática (LÓPEZ-DIÉGUEZ et al, 2008).

Montes et al. (2009) estudando pacientes co-infectados avaliaram os fatores associados com a sobrevida e o tempo para um primeiro episódio de descompensação hepática e se o tratamento para o HCV melhorava o prognóstico dos pacientes com cirrose hepática compensada. Verificaram que o tratamento do HCV não aumentou o tempo para um primeiro episódio de descompensação e observaram que apenas a classificação de Child-pugh B ou C, 81% e 45% respectivamente, e o não uso contínuo da terapia HAART estavam fortemente associados com a primeira descompensação hepática e diminuição da sobrevida. Os autores concluíram que o uso contínuo da terapia HAART e pontuação de Child-pugh foram fatores prognósticos mais importantes que o tratamento da hepatite C para o surgimento do primeiro episódio de descompensação hepática. Estes dados corroboram com o nosso estudo quanto à gravidade da doença hepática, uma vez que houve correlação entre o uso do esquema HAART e Child A na população estudada.

De acordo com os dados encontrados neste estudo verificamos que o exame ultrasonográfico revelou que 61,1% apresentavam fígado normal, 27,8% apresentavam sinais de esteatose hepática e apenas 5,5% (n=1) tinham cirrose ao ultra-som. Sugerindo que o exame de ultra-sonografia (USG) do fígado nestes pacientes complementa os achados clínicos e laboratoriais e também serve para avaliar os sinais de esteatose hepática e patologias associadas tanto à infecção crônica do HCV, bem como alterações hepáticas advindas de complicações do HIV.

Scott et al. (2001) descreveram que as alterações da atenuação do feixe sonoro causadas pela fibrose, hepatomegalia e textura heterogênea, além de micro-nódulos são

observações freqüentes nas hepatopatias crônicas. Estas alterações são dependentes da fase evolutiva da doença fibrogênica. Inicialmente existe apenas hepatomegalia sem alteração da textura do fígado. Numa segunda fase ocorre leve atenuação do feixe sonoro causada pela fibrose, observada na esteatose hepática. Na terceira fase existe um padrão micronodular com nódulos mais ecogênicos e menores que um centímetro. Iniciam-se também nesta fase alterações dos contornos, atrofia do parênquima, hipertrofia do lobo caudado e apagamento das estruturas vasculares. Na última fase, como resultado da fibrose intensa ocorre retração do fígado e a superfície nodular é bem visível, que corresponde à cirrotização.

Matsuoka (2008) realizou um trabalho quanto à contribuição da USG na avaliação das alterações histopatológicas encontradas, com ênfase para a esteatose hepática (EH), afecção bastante freqüente na co-infecção pelo HIV/HCV. Este autor concluiu que a espessura da parede abdominal, dimensões e contornos hepáticos, e a atenuação do feixe sonoro foi o melhor componente ultra-sonográfico para o diagnóstico da esteatose hepática.

De acordo com um estudo realizado em Salvador por Braga et al. (2006) ao correlacionar os achados ultra-sonográficos com o escore de Child-Pugh verificaram que achados ultra-sonográficos de doença hepática crônica foram mais prevalente nos indivíduos com doença avançada (Child B ou C) em pacientes co-infectados. Eles observaram ainda que no grupo de pacientes homossexuais e bissexuais encontraram maior freqüência de achados ultra-sonográficos de doença hepática crônica quando comparada com a população heterossexual.

Em nosso estudo verificamos que 100% dos pacientes que apresentavam ultra-som normal apresentavam Child A, porém também observamos que 57,1% dos pacientes que apresentavam ultra-som alterado tinham Child A, podendo sugerir alterações leves. Os dados chamam a atenção para a correlação positiva entre os achados da ultra-sonografia e o escore de Child-Pugh. Porém quando verificamos as alterações ultra-sonográficas dos pacientes em relação à opção sexual não obtivemos nenhuma correlação.

Quando correlacionamos as alterações ultra-sonográficas com o escore de Child-Pugh e o FIB-4 verificamos que 66,7% dos pacientes apresentavam alteração na ultra-sonografia com FIB-4 < 1,45 e Child A, 50% tinham FIB-4 > 3,25 também com Child A. Estes achados sugerem que a ultra-sonografia foi sensível para detectar tanto fibrose leve como fibrose avançada, porém deve ser sempre usada de forma complementar em conjunto com dados clínicos e laboratoriais.

6.6 PERFIL IMUNOLÓGICO DA POPULAÇÃO

Há indícios crescentes de que a expressão das citocinas está ligada à hepatite C em pacientes mono-infectados. No entanto, devido aos efeitos profundos do vírus HIV em co-infectados pelo HCV este mecanismo ainda não está claro. Portanto, com o objetivo de melhor compreendermos estes mecanismos, avaliamos as concentrações das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IFN- γ nos pacientes co-infectados, incluídos no estudo.

A Infecção pelo HCV pode ser considerada como uma doença oportunista nessa população, uma vez, há a aceleração da sua história natural representado pela elevada carga viral do HCV, fibrose hepática precoce e uma maior ocorrência de esteatose, cirrose e carcinoma hepatocelular, o que conduz a uma maior morbi-mortalidade por doença hepática terminal. Barbosa (2009) realizou um estudo que visava correlacionar as citocinas, TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β , com a carga viral e os achados histopatológicos na biópsia hepática em indivíduos co-infectados. demonstrou que em indivíduos com lesão hepática mais grave, há o predomínio do perfil de citocinas Th2 no sangue periférico, que é caracterizada por concentrações elevadas de IL-4 e da citocina supressora IL-10, enquanto no tecido hepático, este autor observou maior expressão de citocinas Th1, tais como IL-2 e INF- γ . Esse fenômeno é conhecido como "compartimentalização" da resposta e poderia estar relacionado com a pressão imunológica sobre os vírus HIV e HCV, induzindo mutações destes vírus como um mecanismo de escape para evadirem da resposta imune.

No presente estudo avaliamos somente as citocinas do sangue periférico e observamos que não houve diferenças estatísticas significantes relacionados a IL4 e IL10 nos pacientes co-infectados quando comparado com doadores de sangue saudáveis. Entretanto, verificamos uma tendência à diminuição da IL10 no grupo de pacientes co-infectados, sugerindo que a resposta imune nestes pacientes poderia estar relacionada a polarização para o perfil Th1, o que implicaria na diminuição da carga viral e eliminação do vírus, ou ainda progressão lenta da doença do fígado, uma vez que a resposta Th1, com ativação persistente de LTCD8+ poderia aumentar o grau de lesão hepática nestes pacientes dependendo do genótipo do HCV.

Barrett et al. (2008) em um estudo verificaram que a produção de IL-10 foi seletivamente desencadeada por proteínas do HCV, sugerindo que indução seletiva de IL-10 em indivíduos mono-infectados desempenha um papel importante no estabelecimento da

infecção crônica pelo vírus C, e que a atenuação da sua expressão promove um equilíbrio imunológico.

Na hepatite C, os diferentes genótipos podem estar relacionados com melhor ou pior prognóstico da doença nos pacientes mono-infectados, enquanto que o genótipo 1 é mais agressivo e apresenta menor resposta terapêutica, estudos mostram que a soro-conversão espontânea pode ocorrer mais frequentemente com este genótipo em relação aos demais (HARRIS et al., 2007). No entanto, apesar de encontrarmos no presente estudo os genótipos 1 (88,9%) e 3 (11,1%) não observamos correlação estatística entre estes e o perfil de citocinas estudados nos pacientes co-infectados. Porém, devemos levar em consideração que encontramos apenas dois indivíduos com o genótipo 3, não sendo possível estratificar a nossa amostragem. Outros autores relataram que rápida progressão da hepatite C em pacientes co-infectados HIV/HCV pode refletir diferentes respostas às citocinas e ser influenciada pelo genótipo do HCV (Lee et al. (2006).

Diferente do observado em nosso trabalho, Baum et al. (2006) ao realizarem um estudo dosando citocinas em pacientes co-infectados relataram que estes pacientes HIV/HCV apresentaram significativa diminuição das citocinas de resposta Th1 em relação a Th2, e mais sintomas que os mono-infectados pelo HIV. Ainda demonstraram que nestes indivíduos as concentrações de fatores anti-oxidantes como o zinco, estavam diminuídos no plasma e sugeriram que esta diminuição estaria relacionada com a redução da produção de IL-6 por eles observadas nestes pacientes.

Na literatura são poucos os trabalhos que relacionam a carga viral com a secreção das citocinas em pacientes co-infectados. No entanto, vários estudos já demonstraram que a lesão hepática está mais relacionada com a resposta imune do que com a carga viral, uma vez que o HCV parece não ser diretamente citopático. Porém, outros estudos já mostraram que maiores concentrações de carga viral do HCV levam a maior probabilidade de dano hepático nos pacientes co-infectados. Desse modo a diminuição da atividade do sistema imune poderia ser o responsável por ambas as condições, a carga viral elevada e a progressão acelerada da doença (HEELER & SEEFF, 2005).

Em nosso estudo encontramos correlação entre a carga viral e a concentração de IL-6, podendo sugerir que a IL-6 parece ser uma citocina importante no mecanismo imunológico da co-infecção HIV/HCV neste grupo de pacientes estudados, o que poderia estar relacionado com a maior expressão do HCV.

As citocinas, como mediadores de resposta imune, inflamação e fibrose podem fazer diferença nas doenças hepáticas observadas durante a co-infecção pelo HIV/HCV, permitindo a persistência viral, e provavelmente influenciando a eficácia do tratamento. O grupo de Blackard et al. (2005) procuraram determinar os efeitos da infecção viral na concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e TNF- α e a citocina fibrogênica TGF- β a fim de identificar variáveis virológicas associadas à sua expressão. Os autores concluíram que a co-infecção pelo HIV pode ainda contribuir para a fibrose hepática durante a infecção pelo HCV, sustentada por indução da produção de TGF- β . Porém no nosso estudo não dosamos o TGF- β e não observamos diferenças estatísticas significativas em relação a IL8 entre os pacientes co-infectados e os doadores saudáveis, sugerindo que nestes pacientes esta citocina parece não influenciar no desenvolvimento de fibrose no fígado. No entanto, outros estudos de acompanhamento deverão ser feitos, uma vez que as citocinas podem ser secretadas em diferentes fases da infecção. Por problemas técnicos não conseguimos concluir os resultados relacionados a dosagem de TNF- α , o que será fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos na evolução do quadro clínico observado nestes pacientes.

As citocinas Th1 são importantes nas infecções virais, desta forma avaliamos a secreção de IFN- γ e IL12. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos analisados (co-infectados e doadores saudáveis) para estas citocinas. No entanto, observamos uma tendência de aumento do IFN- γ como da IL-12 nos pacientes co-infectados em relação aos doadores de sangue. Estes dados estão de encontro com o aumento da relação de CD8⁺/CD4⁺ observada nestes pacientes, sugerindo que este mecanismo poderia estar levando a diminuição da carga viral ou *clearence* do HCV.

Contrariando nossos dados, alguns autores demonstraram que nos pacientes com imunodeficiência avançada o IFN- γ apresentou-se em concentrações significativamente reduzidas, porém sugeriram que mais estudos precisariam ser realizados para avaliar o comportamento do IFN- γ nestes indivíduos (GONZALEZ et al., 2008).

Apesar de estudos epidemiológicos terem documentado que os pacientes co-infectados pelo vírus da hepatite C e HIV apresentarem a fibrogênese acelerada, especialmente naqueles com contagens de células T CD4⁺ <200 células/mm³, porém os mecanismos patogênicos não são bem compreendidos. Gonzales et al. (2008) investigaram se a imunodeficiência severa observada na co-infecção estava associada com mudanças das citocinas e concluíram que o HIV induz linfopenia hepática e pode resultar em supressão de citocinas em pacientes co-

infectados, principalmente de IL-4, IL-12 e IFN- γ . Principalmente em relação ao IFN- γ verificaram uma maior redução, porém sugerem que mais estudos devam ser realizados para avaliar se a diminuição desta citocina pode contribuir para acelerar a fibrogênese hepática relacionada a menor contagem de células T CD4⁺ e à maior expressão do HCV.

Como citado anteriormente o FIB-4 permite avaliar o grau de fibrose hepática, desta forma no presente estudo relacionamos a concentração de citocinas com a fibrogênese hepática através deste parâmetro. Nossos resultados demonstraram que houve maior concentração da IL6 em relação ao FIB-4 > 3,25 e maior concentração de IL12 em relação ao FIB-4 < 1,45, podendo sugerir que nos pacientes com fibrose hepática avançada a IL-6 apresentou maior expressão e nos com fibrose leve a IL-12 predominou.

O fenômeno de restauração imune que ocorre após a introdução da terapia HAART pode induzir a uma forte resposta imunológica com recuperação das células T CD4⁺, mostrando que o maior benefício da terapia HAART em prevenir mortalidade devido à redução de infecções oportunistas, parece sobrepujar o risco da severa hepatotoxicidade nesses pacientes. Mais estudos são necessários para melhor avaliar este aspecto pois, na maior parte dos trabalhos da literatura, mais de 80% dos pacientes estudados já se encontravam em uso de anti-retrovirais (BLACKARD et al., 2006)

CONCLUSÕES

- 8.1 Este estudo demonstrou uma prevalência de hepatite crônica B AgHBe negativo em pacientes da Amazônia Ocidental Brasileira portadores do AgHBs com *status* sorológico AgHBe negativo/anti-HBe positivo de 63,64%.
- 8.2 A frequência de pacientes portadores inativos do AgHBs após a soroconversão do AgHBe foi 36,36%, observando-se nestes pacientes uma idade média ≤ 40 anos, enquanto nos pacientes com hepatite observou-se uma idade média ≥ 40 anos, revelando que a soroconversão do AgHBe com menos de 40 anos de idade, pode ser considerada um fator preditivo de bom prognóstico em comparação com aqueles que soroconvertem o AgHBe após os 40 anos, que em geral apresentam pior prognóstico.
- 8.3 A análise do tempo de evolução da doença sugere que com o passar do tempo o número de casos de pacientes portadores inativos do AgHBs tende a diminuir, enquanto aumenta o número de casos de pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo, estabilizando-se neste estudo ao longo do período ≥ 5 anos.

- 8.4 Foi possível identificar na Amazônia Ocidental Brasileira os genótipos e subgenótipos mais prevalentes do VHB nos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo, correspondendo ao genótipo A subgenótipo Afro-Asiático (AA) a maior prevalência, 54,54%, ao genótipo D subgenótipo D1, 4,54% e ao genótipo F subgenótipo F2, 4,54%.
- 8.5 O seqüenciamento das regiões *pré-core* e *core promoter* dos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo identificou 31,81% de mutações, com predomínio das mutações *core promoter* A₁₇₆₄ e T₁₇₆₂, com uma proporção de 7:1 em relação as mutações *pré-core* A₁₈₉₆, sendo este predomínio atribuído a elevada prevalência do genótipo A subgenótipo Afro-Asiático (AA) (54,54%).
- 8.6 Neste estudo foi verificada uma significativa associação entre os pacientes com hepatite, com tempo de doença ≥ 5 anos, com o genótipo A (AA) e mutações do VHB.
- 8.7 Nos pacientes com hepatite crônica AgHBe negativo a sensibilidade do exame ultrassonográfico em avaliar a fibrose hepática foi 90,2% (IC 95% 75,9; 96,8) com valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 88,3; 100) e valor preditivo negativo de 77,8% (IC 95% 51,9; 92,6).
- 8.8 Vários autores descrevem o genótipo F como o genótipo mais prevalente na região contrastando com os resultados encontrados neste estudo que demonstrou uma maior prevalência do genótipo A sub-genótipo Afro-asiático. Esta modificação nos índices de prevalência pode estar relacionada como os movimentos migratórios que a região vem sofrendo há várias décadas, o que poderia estar contribuindo para a mudança do perfil genotípico do VHB, necessitando de mais estudos para confirmar estas observações epidemiológicas na Amazônia Ocidental Brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE, I.; CAMPIELLO, G.; ROSATI, S. et al. Intra-hepatic messenger RNA levels for interferons and related genes in hepatic C virus/HIV coinfecting patients. **AIDS**. v. 18, p. 691-92, 2004.

AGUIAR, J. I.; UEHARA, S. N.; ALEXANDRINO, P. O. et al. Avaliação preliminar da associação do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) com as hepatites virais do tipo B e C em dois centros de investigação do Brasil. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 7(2), p. 29-32, 2005.

ALATRAKCHI, N.; GRAHAM, C. S.; HE, Q. et al. CD8 cell responses to hepatitis C virus in the liver of persons with HCV-HIV coinfection versus HCV mono-infection. **J Infect Dis**. v. 191, p. 702-09, 2005.

ALTER, J. M. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. **J Hepatol**. v. 44, p. S6-S9, 2006.

ALMEIDA, S. E. M.; BORGES, M.; FIEGENBAUM, M. et al. Alterações metabólicas associadas à terapia anti-retroviral em pacientes HIV-positivos. **Rev Saúde Pública**. v. 43(2), p. 283-90, 2009.

AMARAL, I. S. A.; ALMEIDA, M. L.; ALVES, F. T. et al. Epidemiologia de pacientes co-infectados HIV/HCV atendidos na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. **Revista do Pará de Medicina**. v. 21 (1), p. 15-20, 2007.

AMOROSO, P.; RAPICETTA, M.; TOSTI, M. E. et al. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. **J Hepatol**. v. 28, p. 936-44, 1998.

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**. v. 346, p. 1221-31, 2002.

ARANGO, H. G. **Bioestatística Teórica e Computacional**. Guanabara Koogan, 2001.

ASTEN, L. V.; PRINS, M. Infection with concurrent multiple hepatic C virus genotype is associated with faster HIV disease progression. **AIDS**. v. 18, p. 2319-24, 2004.

BAGAGLIO, S. et al. Hepatitis C virus infection in HIV-infected long term non progressors. **J Hepatol**. v. 2, p. 125, 2003.

BAILES, E.; GAO, F.; BIBOLLET-RUCHE, F. et al. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. **Science**. v. 300(5626), p. 1713, 2003.

BALASUBRAMANIAN, A.; GANJU, R. K.; GROOPMAN, J. E. Hepatitis C vírus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. **J Biol Chem**. v. 278, p. 755-66, 2003.

BANI-SADR, F.; CARRAT, F.; BEDOSSA, P. et al. Hepatic steatosis in HIV-HCV coinfecting patients: analysis of risk factors. **AIDS**. v. 20(4), p. 525-31, 2006.

BANTEL, H.; LÜGERING, A.; POREMBA, C. H. et al. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**. v. 34, p. 758-67, 2001.

BARBOSA, A. Correlation Between Cytokines and Hepatic Histology in Patients Infected by HIV-1 and the Hepatitis-C Virus. **Clinical Trials**. Brief communication, 2009.

BARRE-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Science**. v. 220, p. 868-70, 1983.

BARRET, L.; GALLANT, M.; HOWLEY, C. et al. Enhanced IL-10 production in response to hepatitis C virus proteins by peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-monoinfected individuals. **BMC Immunol**. v. 9, p. 28, 2008.

BAUM, M. K.; DUAN, R.; XUE, L. et al. Cytokine profiles in HIV/hepatitis C co-infected drug users in Miami. **Int Conf AIDS**. v. 16, p.13-18, 2006.

BEAUGRAND, M. How to assess liver fibrosis and for what purpose? **J Hepatol**. v. 44, p. 444-45, 2006.

BEDIMO, R.; GHURANI, R.; NSUAMI, M. et al. Lipid abnormalities in HIV/hepatitis C virus-coinfecting patients. **HIV Med**. v. 7(8), p. 530-36, 2006.

BEDOSSA, P.; DARGERÉ, D.; PARADIS, V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**. v. 38, p. 1449-57, 2003.

BELLENTANI, S.; POZZATO, G.; SACCOCCIO, G. et al. Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. **Gut**. v. 44(6), p. 874-80, 1999.

BLACKARD, J. T.; KANG, M.; ST CLAIR, J. B. et al. Predictors of inflammatory and fibrogenic cytokine expression during hcv/hiv co-infection. **12^o CROI**. Bostom - Massachusetts abstract no. 912, 2005.

BLACKARD, J. T.; KOMURIAN-PRADEL, F.; PERRET, M. et al. Intrahepatic Cytokine Expression is Downregulated During HCV/HIV Co-Infection. **Journal of Medical Virology**. v. 78, p. 202–07, 2006.

BLACKARD, J. T.; KANG, M.; ST CLAIR, J. B. et al. Viral factors associated with cytokine expression during HCV/HIV co-infection. **J Interferon Cytokine Res**. v. 27(4), p. 263-69, 2007.

BOBKOV, A.; KAZENNOVA, E.; KHANINA, T. et al. An HIV type 1 subtype A strain of low genetic diversity continues to spread among injecting drug users in Russia: study of the new local outbreaks in Moscow and Irkutsk. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 17(3), p. 257-61, 2001.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA AIDS NO AMAZONAS - Governo do Estado do Amazonas. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação Estadual do Programa DST/Aids da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Ano I nº 01. **Brasília, 2007**. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br/>>. Acesso em: 10 abril 2009.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA – BEPA. Características dos usuários e fatores associados à soro-positividade para o HIV em usuários de Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) no Estado de São Paulo, 2000 a 2007. **São Paulo, 2008**; <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>>. Acesso em 14 de janeiro de 2009.

BOLETIM DE ATUALIZAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. **Hepatites virais têm papel de destaque entre agravos de pacientes HIV+**. v. 4, jul/ago/set, 2006.

BONACINI, M.; LOUIE, S.; BZOWEJ, N. et al. Survival in patients with HIV infection and viral hepatitis B or C: a cohort study. **AIDS**. v. 18, p. 2039-45, 2004.

BONGERTZ, V. BOU-HABIB, D. C.; BRIGIDO, L. F. et al. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v. 23(2), p. 184-93, 2001.

BORTHOLI, E. Diretrizes básicas para o tratamento da co-infecção HIV-HCV. **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepatite C**. p. 60-65, 2008.

BRAGA, E. L.; LYRA, A. C.; OLIVEIRA, F. N. et al. Clinical and epidemiological features of patients with chronic hepatitis C co-infected with HIV. **Braz J Infect Dis.** v. 10(1), p. 17-21, 2006.

BRAINARD, D. M.; TAGER, A. M.; MISDRAJI, J. et al. Decreased CXCR3+ CD8 T cells in advanced human immunodeficiency virus infection suggest that a homing defect contributes to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction. **J Virol.** v. 81, p. 8439-50, 2007.

BRASIL. Organização das Nações Unidas. Escritório Contra Drogas e Crimes. Perfil do país. **Brasília, 2005.** < <http://www.unodc.org.br/> >. Acesso em: 15 janeiro de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico. Ano V n^o 01 - **Brasília, 2008.** Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/> >. Acesso em: 10 abril de 2009.

BRÍGIDO, L. S.; RODRIGUES, J. J. S. Vírus da Imunodeficiência Adquirida. In: ROSSETTI, M. L.; DA SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas Diagnóstico Molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BRITO A. M., CASTILHO E. A., SZWARCOWALD C L. Aids e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 2, p. 207-17, 2001.

CALABRESE, F.; PONTISSO, P.; PETTENAZZO, E. et al. Liver Cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. **Hepatology.** v. 31, p. 1153-59, 2000.

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

CANCHIS, P. W.; GONZALEZ, S.; FIEL, I. et al. Intrahepatic CD4+ cell depletion in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr.** v. 37, p. 1125-31, 2004.

CAPA, L.; SORIANO, V.; GARCIA-SAMANIEGO, J. et al. Influence of HCV genotype and coinfection with human immunodeficiency virus on CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to hepatitis C virus. **J Med Virol.** v. 79, p. 503-10, 2007.

CARIDE, E.; BRINDEIRO, R.; HERTOQS, K. et al. Drug-resistance reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**. v. 275(1), p. 107-15, 2000.

CARVALHO, F. H. P.; COELHO, M. R. C.; VILELLA, T. A. S. et al. Co-infecção por HIV/HCV em hospital universitário de Recife, Brasil. **Rev Saúde Pública**. v. 43(1), p. 133-39, 2009.

CASTANEDA-SCEPPA, C.; BERMUDEZ, O. I.; WANKE, C. et al. Predictors of insulin resistance among Hispanic adults infected with or at risk of infection with the human immunodeficiency virus and hepatitis C virus. **J Viral Hepat**. v. 15(12), p. 878-87, 2008.

CASTRO, E.; ECHEVERRIA, G.; DEIBIS, L. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v. 32(3), p. 338-44, 2003.

CAVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças Associadas à Resistência à Insulina/Hiperinsulinemia, Não Incluídas na Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 50(2), p. 360-67, 2006.

CDC. Pneumocystis Pneumonia...Los Angeles. MMWR.1981; v. 30(21), p. 1-3. <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 20 abril de 2007.

CERNY & CHISARI. Pathogenesis of chronic hepatitis C: Immunological features of hepatic injury and viral persistence. **Hepatology**. v. 30, p. 595-601, 1999.

CERRI, D. C.; ROCHA, G. G. Fígado In:_____. **Ultra-sonografia Abdominal**. São Paulo: Sarvier, 1993.

CHAKRABARTI, S.; PANDA, S.; CHATTERJEE, A. et al. HIV-1 subtypes in injecting drug users & their non-injecting wives in Manipur, India. **Indian J Med Res**. v. 111, p. 189-94, 2000.

CHAMOT, E.; HIRSCHL, B.; WINSTSCHE, J. et al. Loss of antibodies against hepatitis C virus in HIV-seropositive intravenous drug users. **AIDS**. v. 4, p. 1275-77, 1990.

CHENG, D. M.; NUNES, D.; LIBMAN, H. et al. Impact of Hepatitis C on HIV Progression in Adults With Alcohol Problems. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 31(5), p. 829-36, 2007.

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

CHOO, Q. L.; PINHO, J. R. R. Virologia molecular. Variabilidade viral. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

CORVINO, S. M.; HENRIQUES, R. M. S.; GROTTTO, R. M. T. et al. Co-infecção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região. **Rev Bras Epidemiol**. v. 10(4), p. 537-43, 2007.

COUTO-FERNANDEZ, J. C.; MORGADO, M. G.; BONGERTZ, V. et al. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with african socio-demographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v. 22(3), p. 288-93, 1999.

CUNHA, L. K. H. **Caracterização dos genótipos do HIV-1 em doadores de sangue soropositivos da Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas**. 2007. 82f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2007.

CURRIE, S. L.; RYAN, J. C.; TRACY, D. et al. A prospective study to examine persistent HCV reinfection in injection drug users who have previously cleared the virus. **Drug Alc Dep**. v. 93, p. 148-54, 2008.

DANTE, M.; SEMMO, N.; FABRIS, P. et al. Impact of HIV on host-virus interactions during early hepatitis C virus infection. **J Infect Dis**. v. 197(11), p. 1558-66, 2008.

DARBY, S. C.; EWART, D. W.; GIANGRANDE, P. L. et al. Mortality from liver cancer and liver disease in haemophilic men and boys in the UK given blood products contaminated with hepatitis C. **Lancet**. v. 350, p. 1425-31, 1997.

DE LARRAÑAGA, G. K.; WINGEIER, S. D.; PUGA, L. M. et al. Relationship between hepatitis C virus (HCV) and insulin resistance, endothelial perturbation, and platelet activation in HIV-HCV-coinfected patients under highly active antiretroviral treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 25(2), p. 98-103, 2006.

DE LEDINGHEN, V.; BARREIRO, P.; FOUCHER, J. et al. Liver fibrosis on account of chronic hepatitis C is more severe in HIV-positive than HIV-negative patients despite antiretroviral therapy. **J Viral Hep**. v. 15(6), p. 427-33, 2008.

DEVICO, A. L.; GALLO, R. C. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. **Nat Rev Microbiol**. v. 2, p. 401-13, 2004.

DING & YIN. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. **J Cell Mol Med.** v. 8(4), p. 445-54, 2004.

DI MARTINO, V.; RUFAT, P.; BOYER, N. et al. The influence of human immunodeficiency virus co-infection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. **Hepatology.** v. 34, p. 1193-99, 2001.

DITTMAR, M. T.; SIMMONS, G.; HIBBITTS, S. et al. Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. **J Virol.** v. 71, p. 8008-13, 1997.

DONG, C.; ALICIA, M. J.; JIAN-HUA, W. et al. Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Immature and Mature Dendritic Cells Reveals Dissociable *cis*- and *trans*-Infection. **J Virol.** v. 81(20), p. 11352–362, 2007.

DORRUCCI, M.; PEZZOTTI, P.; PHILLIPS, A. N. et al. Co-infection of hepatitis C virus with immunodeficiency virus and progression to AIDS. **J Infect Dis.** v. 172, p. 1503-32, 1995.

DUSHEIKO, G.; SCHILOVITZ-WEISS, H.; BROWN, D. et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of typo-specific differences in geographic origin and disease. **Hepatology.** v. 19, p. 13-8, 1994.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. **J Hepatol.** v. 30, p. 956-61, 1999.

EPI-INFO, Versão 3.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, Califórnia, janeiro de 1997.

EYSTER, M. E.; FRIED, M. W.; DI BISCEGLIE, A. M. et al. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus (HIV). **J AIDS.** v. 6, p. 602, 1993.

FARINATI, F.; CARDIN, R.; BORTOLAMI, M. et al. Oxidative damage, pro-inflammatory cytokines, TGF-alpha and c-myc in chronic HCV-related hepatitis and cirrhosis. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 2065-69, 2006.

FOCACCIA, R.; GALANTE, V. C.; OLIVEIRA, U. B. Epidemiologia. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatitis Virais.** 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

FONSECA, M. G.; TRAVASSOS, C.; BASTOS, F. I. et al. Distribuição social da AIDS no Brasil, segundo participação no mercado de trabalho, ocupação e *status* sócio-econômico dos casos de 1987 a 1998. **Cad Saúde Pública**. v. 19(5), p. 1351-63, 2003.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis -- from bench to bedside. **J Hepatol**. v. 38 Suppl 1, p. S38-S53, 2003.

FUJIWARA, K.; TANAKA, Y.; ORITO, E. et al. Lack of Association Between Occult Hepatitis B Virus DNA Viral Load and Aminotransferase Levels in Patients With Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. **J Gastroentero Hepatol**. v. 19(12), p. 1343-47, 2004.

FURASTÉ, P. A. **Normas Técnicas para o Trabalho Científico: Elaboração e Formatação**. 14 ed. Porto Alegre: Gráfica e Editora Brasil, 2006..

GADELHA, S. R.; SHINDO, N.; CRUZ, J. N. M. et al. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 98(4), p. 461-63, 2003.

GALLO, R. C.; SARIN, P. S.; GELMANN, E. P. et al. Isolation of a T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**. v. 220, p. 865-67, 1983.

GARCIA-SAMANIEGO, J. et al. Influence of hepatitis C virus genotypes and HIV infection on histological severity of chronic hepatitis C. The hepatitis/HIV spanish study group. **Am J Gastroenterol**. v. 92, p. 1130-34, 1997.

GARCIA-SAMANIEGO, J.; RODRIGUEZ, M.; BERENQUER, J. et al. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. **Am J Gastroenterol**. v. 96. p. 179-83, 2001.

GASLIGHTWALA, I.; BINI, E. J. Impact of human immunodeficiency virus infection on the prevalence and severity of steatosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatology**. v. 44(6), p. 1026-32, 2006.

GATIGNOL, A.; DUBUISSON, J.; WAINBERG, M. A. et al. New pandemics: HIV and AIDS, HCV and chronic hepatitis, Influenza virus and flu. **Retrovirology**. v. 4, p. 8, 2007.

GIANNINI, E.; RISSO, D.; BOTTA, F. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. **Arch Intern Med**. v. 163, p. 218-24, 2003.

GONZALEZ, S. A.; ZHANG, C.; FIEL, M. I. et al. Hepatic Inflammatory cytokine mRNA expression in hepatitis c virus-human immunodeficiency virus coinfection. **J Viral Hepat.** v. 15, p. 331-38, 2008.

GRAHAM, C. S.; BADEN, L. R.; YU, E. et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. **Clin Infect Dis.** v. 33, p. 562-69, 2001.

GRAHAM, C. S.; HE, Q.; SERMAN, K. E. et al. Comparison of HCV-specific intrahepatic CD4+ T cells in HIV/HCV versus HCV. **Hepatology.** v. 40, p. 125-32, 2004.

GRAKOU, A.; SHOUKRY, N. H.; WOOLLARD, D. J. et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. **Science.** v. 302, p. 659-62, 2003.

GREUB, G.; LEDERGERBER, B.; OPRAVIL, M. et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV cohort study. **Lancet.** v. 356, p. 1800-05, 2000.

HARCOURT, G.; GOMPERS, E.; DONFIELD, S. et al. Profound loss of HCV-specific interferon-gamma secreting CD4+ T cells in HIV/HCV co-infected patients. **Gut.** v. 55(10), p. 1484-87, 2006.

HARRIS, R.; GONIN, R.; ALTER, H. J. et al. The relationship of acute-transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. **Ann Intern Med.** v. 134, p. 120-24, 2001.

HARRIS, H. E.; ELDRIDGE, K. P.; HARBOUR, S. et al. Does the clinical outcome of hepatitis C infection vary with the infecting hepatitis C virus type? **Journal of Viral Hepatitis.** v. 14(3), p. 213-20, 2007.

HELLER, T.; SEEFF, L. B. Viral load as a predictor of progression of chronic hepatitis C? **Hepatology.** v. 42(6), p. 1261-63, 2005.

HERZER, K.; SPRINZL, M. F.; GALLE, P. R. Hepatitis viruses: live and let die. **Liver Int.** v. 27(3), p. 293-301, 2007.

HESS, C.; ALTFELD, M.; THOMAS, S. Y. et al. HIV-1 specific CD8+ T cells with an effector phenotype and control of viral replication. **Lancet.** v. 363, p. 863-66, 2004.

HOLGUIN, A.; ÁLVAREZ, A.; SORIANO, V. HIV-1 subtype J recombinant viruses in Spain. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 18(7), p. 523-29, 2002.

IMPERIALE, T. F.; SAID, A. T.; CUMMINGS, O. W. et al. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. **Am J Gastroenterol**. v. 95(9), p. 2328-32, 2000.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Intern Med**. v. 45(4), p. 183-91, 2006.

KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D. A.; EFRON, B. et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. **PLoS Med**. v. 2, p. 112, 2005.

KARITA, E.; NKENGASONG, J. N.; WILLEMS, B. et al. Macrophage-tropism of HIV-1 isolates of different genetic subtypes. **AIDS**. v.11, p. 1303-04, 1997.

KIM, A. Y.; LAUER, G. M.; OUCHI, K. et al. The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells depend on absolute CD4+ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. **Blood**. 105(3), p. 1170-78, 2005.

KLENERMAN, P.; KIM, A. HCV–HIV Coinfection: Simple Messages from a Complex Disease. **PLoS Med**. v. 4(10), p. 240, 2007.

KOBAYASHI, M.; TANAKA, E.; SODEYAMA, T. et al. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. **Hepatology**. v. 23(4), p. 695-59, 1996.

KOCH, N.; NDIHOKUBWAYO, J.; YAHI, N. et al. Genetic analysis of HIV type 1 strains in Bujumbura (Burundi): predominance of subtype C variant. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 17(3), p. 269-73, 2001.

KOSTRIKIS, L. G.; BAGDADES, E.; CAO, Y. et al. Genetic analyses of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of new subtype designated subtype I. **J Virol**. v. 69(10), p. 6122-30, 1995.

KOZIEL, M.; PETERS, M. Viral hepatitis in HIV infection. **N Engl J Med**. v. 356, p. 1445-54, 2007.

KUERTEN, S.; SCHLINGMANN, T. R.; RAJASALU, T. et al. Lack of Disease Specificity Limits the Usefulness of In Vitro Costimulation in HIV- and HCV-Infected Patients. **Clin Dev Immunol.** v. 1(9), p. 1990-2002, 2008.

KUIKEN, C.; MIZOKAMI, M.; DELEAGE, G. et al. Hepatitis C databases, principles and utility to researchers. **Hepatology.** v. 43(5), p. 1157-65, 2006.

KUO, G.; CHOO, Q. L.; ALTER, H. J. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. **Science.** v. 244, p. 362-64, 1989.

KWANG-HYUB, H.; YOON, K. T. New Diagnostic Method for Liver Fibrosis and Cirrhosis. **Intervirolgy.** v. 51, p. 11-16, 2008.

LACKNER, C.; STRUBER, G.; LIEGL, B. et al. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology.** v. 41, p. 1376-82, 2005.

LAKSHMI, V.; REDDY, A. K.; DAKSHINAMURTY, K. V. Evaluation of commercially available third-generation anti-hepatitis C virus enzyme-linked immunosorbent assay in patients on haemodialysis. **Indian J Med Microbiol.** v. 25, p. 140-42, 2007

LARSEN, C.; PIALOUX, G.; SALMON, D. et al. Prevalence of hepatitis C and hepatitis B infection in the hiv-infected population of France, 2004. **Eurosurveillance.** v. 13(22), p. 109-12, 2008.

LAUKKANEN, T.; CARR, J. K.; JANSSENS, W. et al. Virtually full-length subtype F and F/D recombinant HIV-1 from Africa and South America. **Virology.** v. 269(1), p. 95-104, 2000.

LAURENCE, J. T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD4+ T lymphocytopenia. **Ann Intern Med.** v. 119(1), p. 55-62. 1993.

LEE, S.; WATSOM, M. W.; CLARK, B. et al. Hepatitis C virus genotype and HIV coinfection affect cytokine mRNA levels in unstimulated PBMC but do not shift the T1/T2 balance. **Immunol Cell Biol.** v. 84(4), p. 390-95, 2006.

LEITNER, J. M.; PERNERSTORFER-SCHOEN, H.; WEISS, A. et al. Schindler K, Age and sex modulate metabolic and cardiovascular risk markers of patients after 1 year of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Atherosclerosis.** v. 187(1), p. 177-85, 2006.

Referências bibliográficas

LESENS, O.; DESCHENES, M.; STEBEN, M. et al. Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus positive haemophiles and should be treated as an opportunistic infection. **J Infect Dis.** v. 179, p. 1254-48, 1999.

LÉVY, Y. Cytokine-based modulation of immune function in HIV infection. **Current Opinion in HIV and AIDS.** v. 1, p. 69-73, 2006.

LIMA, L. M. T.; MARTINS, J. R. M.; NADER, H. B. Valor preditivo de marcadores séricos de fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite crônica viral C . **J Bras Patol Med. Lab.** v. 44(3), p. 185-91, 2008.

LINCOLN, D.; PETOUMENOS, K.; DORE, G. J. HIV/HBV and HIV/HCV coinfection, and outcomes following highly active antiretroviral therapy. **HIV Med.** v. 4, p. 241-49, 2003.

LJUNGBERG, K.; HASSAN, M. S.; ISLAM, M. N. et al. Subtypes A, C, G, and recombinant HIV type 1 are circulating in Bangladesh. **AIDS Res Hum Retroviruses.** v. 18(9), p. 667-70, 2002.

LOK, A. S.; GHANY, M. G.; GOODMAN, Z. D. Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. **Hepatology.** v. 42, p. 282-92, 2005.

LOKO, M. A.; CASTERA, L.; DABIS, F. Validation and comparison of simple noninvasive indexes for predicting liver fibrosis in HIV-HCV-coinfected patients: ANRS CO3 Aquitaine cohort. **Am J Gastroenterol.** v. 103, p. 1973-80, 2008.

LOPEZ-DIEGUEZ, M.; MONTES, M.; QUEREDA, C. et al. Factors associated with survival and first hepatic decompensation in a large prospective cohort of hiv-hcv coinfecteds with liver cirrhosis. **141 CROI**, Grupo de Estudio del SIDA, Espanha.2008.

MAIDA, I.; SORIANO, V.; GONZALEZ, G. et al. Liver fibrosis stage in HIV/HCV-coinfected patients with persistently normal transaminases levels. Poster H-1483. **45th ICAAC**, 16-19 December 2005, Washington.

MAJOR, M. E.; FEINSTONE, S. M. Hepatitis C virus. **Hepatology.** v. 25, p. 1527-38, 1997.

MARKS, K. M.; PETROVIK, L. M.; TALAL, A. H. et al. Histological findings and clinical characteristics associated with hepatic steatosis in patients coinfecteds with HIV and hepatitis C virus..**J Infect Dis.** v. 192(11), p. 1943-39, 2005.

Referências bibliográficas

MARTIN, P.; DI BISCEGLIE, A. M.; KASSIANIDES, C. et al. Rapidly progressive non-A non-B hepatitis in patients with human immunodeficiency virus infection. **Gastroenterology**. v. 97, p. 1559-61, 1989.

MARTIN, J. C. LÓPEZ, M.; ARRANZ, R. et al. Impact of hepatitis C in HIV-infected individuals in an urban center in Madrid, Spain. **8th CROI**. Chicago, Feb 2001.

MARTINEZ, V.; TA, T.; MOKHTARI, Z. et al. Hepatic Steatosis in HIV/HCV Co-infected Patients Receiving Antiretrovirals Is Associated with HCV-related Factors but Not ARV Drugs. **16th CROI**. Montreal, Canada. Feb, 2009.

MAST, E. E.; HWANG, L. Y.; SETO, D. S. Y. et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. **J Infect Dis**. v. 192, p. 1880-89, 2005.

MATSUOKA, M. W. **Contribuição da ultra-sonografia para o diagnóstico das alterações histopatológicas presentes na hepatite C crônica, com ênfase na esteatose hepática**. 2008. 92f. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências, São Paulo. 2008.

MATTEI, F.; SCHIAVONI, G.; BELARDELLI, F. et al. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. **J. Immunol**. v.167, p. 1179-87, 2001

MATTHEWS, G. V.; DORE, G. J. HIV and hepatitis C coinfection. **Gastroenterol Hepatol**. v. 23(7), p. 1000-08, 2008.

McCUTHAN, F. E. Global epidemiology of HIV. **J Med Virol**. v.78(1), p. 7-12, 2006.

McGOVERN, B. H.; DITELBERG, J. S.; TAYLOR, L. E. et al. Hepatic steatosis is associated with fibrosis, nucleoside analogue use, and hepatitis C virus genotype 3 infection in HIV-seropositive patients. **C Infect Dis**. v. 43(3), p. 365-72, 2006.

MC OMISH, F.; YAP, P. L.; DOW, B. C. et al. Geographical distribution of hepatitis c virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J Clin Microbiol**. v. 32, p. 884, 1994.

MEIER, U. C.; OWEN, R. E.; TAYLOR, E. et al. Shared Alterations in NK Cell Frequency, Phenotype, and Function in Chronic Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections. **J Virol**. v. 79(19), p. 1365-74, 2005.

Referências bibliográficas

MELVIN, D. C.; LEE, J. K.; BELSEY, E. et al. The impact of co-infection with hepatitis C virus and HIV on the tolerability of antiretroviral therapy. **AIDS**. v. 14(4), p. 463-5, 2000.

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

MENDES-CORRÊA, M. C.; AZZO, W.; BRUSSI, M. L. P. et al. Características clínicas e histológicas de pacientes co-infectados pelo HIV e vírus da hepatite C no Brasil: estudo de uma série de casos. **Rev Inst Med Trop S Paulo**. v. 50 (4), p. 213-17, 2008.

MENU, E.; REYNES, J. M.; MÜLLER-TRUTWIN, M. C. et al. Predominance of CCR5-dependent HIV-1 subtype E isolates in Cambodia. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**. v. 20(5), p. 481-87, 1999.

MILLER, M. F.; HALEY, C.; KOZIEL, M. J. et al. Impact of hepatitis C virus on immune restoration in HIV infected patients who start highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. **C Infect Dis**. v. 41, p. 713-20, 2005.

MOHSEN, A. H. Hepatitis C and HIV-1 Coinfection. **GUT**. v. 51(4), p. 601-08, 2002.

MOHSEN, A. H.; EASTERBROOK, P. J.; TAYLOR, C. et al. Impact of human immunodeficiency virus (HIV) infection on the progression of liver fibrosis in hepatitis C virus infected patients. **GUT**. v. 52, p. 1035-40, 2003.

MONTEIRO, M. C.; NASCIMENTO, M. M. P.; PASSOS, A. D. C. et al. Hepatite C: prevalência e fatores de risco entre portadores do VIH/SIDA em Belém, Pará, na Amazônia brasileira. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 37(2), p. 40-46, 2004.

MONTO, A.; CURRIE, S.; WRIGHT, T. L. Liver disease in injection drug user with hepatitis C, with and without HIV coinfection. **J Addict Dis**. v. 27(2), p. 49-59, 2008.

MONTES, M. L.; PASCUAL, J.; LOPEZ-DIEGUEZ, M. et al. Survival of HIV/HCV-co-infected patients with compensated liver cirrhosis: effect of HCV therapy. **Sixteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal**, abstract 106, 2009.

MORISHIMA, C.; SHUHART, M. C.; YOSHIHARA, C. S. et al. Preservation of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses despite global loss of CD4+ T cells in HCV/HIV coinfection. **J Infect Dis**. v. 196(4), p. 577-86, 2007.

Referências bibliográficas

MOTTA, T. Q. R. Prevalência e fatores de risco para a infecção com o vírus da hepatite C em pacientes infectados com o HIV em Vitória, Espírito Santo. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 37: suppl 1, p. 69, 2004.

MUNSHI, M.; BALASUBRAMANIAN, A.; KOZIEL, M. et al. Hepatitis C and human immunodeficiency virus envelope proteins cooperatively induce hepatocytic apoptosis via an innocent bystander mechanism. **J Infect Dis.** v. 188, p. 1192-204, 2003.

MYERS, R. P.; BENHAMOU, Y.; IMBERT-BISMUT, F. Serum biochemical markers accurately predict liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus co-infected patients. **AIDS.** v. 17, p. 721-25, 2003.

NEAU, D.; JOUVENCEL, C.; LEGRAND, E. et al. Hepatitis C Virus Genetic Variability in 52 Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients. **J M Virol.** v. 71, p. 41-48, 2003.

NUNES, D.; FLEMING, C.; OFFNER, G. HIV Infection Does Not Affect the Performance of Noninvasive Markers of Fibrosis for the Diagnosis of Hepatitis C Virus-Related Liver Disease. **J AIDS.** v. 40(5), p. 538-44, 2005.

OKAMOTO, H.; OKADA, S.; SUGIYAMA, Y. et al. The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. **Jap J Exp Med.** v. 60, p. 167-77, 1990.

OMLAND, L. H.; JEPSEN, P.; SKNHØJ, P. et al. The impact of HIV-1 co-infection on long-term mortality in patients with hepatitis C: a population-based cohort study. **HIV Med.** v.10(2), p. 65-71, 2009.

OP DE COUL, E.; VAN DER BURG, R.; ASJO, B. et al. Genetic evidence of multiple transmission of HIV type 1 subtype F within Romania from adult blood donors to children. **AIDS Res Hum Retroviruses.** v. 16(4), p. 327-36, 2000.

OSWALD-RICHTER, K.; GRILL, M. S.; LEELAWONG, M. et al. Identification of a CCR5-Expressing T Cell Subset That Is Resistant to R5-Tropic HIV Infection. Identification of a CCR5-Expressing T Cell Subset That Is Resistant to R5-Tropic HIV Infection. **PLoS Pathog.** v. 3(4), p. 58, 2007.

PAL, S.; SCHNAPP, L. M. HIV-infected lymphocytes regulate fibronectin synthesis by TGFb1 secretion. **J Immunol.** v. 172, p. 3189-95, 2004.

PAPA, A.; ADWAN, G.; KOUIDOU, S. et al. The subtypes of HIV type 1 in Greece. **AIDS Res Hum Retroviruses.** v. 14(14), p. 1297-98, 1998.

PARK, G. J.; LIN, B. P.; NGU, M. C. et al. Aspartate aminotransferase: alanine aminotransferase ratio in chronic hepatitis C infection: is it a useful predictor of cirrhosis? **J Gastroenterol Hepatol.** v.15(4), p. 386-90, 2000.

PASCUAL-PAREJA J. F.; CAMINO A., A.; LARRAURI, J. et al. HAART is associated with lower hepatic necroinflammatory activity in HIV-hepatitis C virus-coinfected patients with CD4 cell count of more than 350 cells/mm³ at the time of liver biopsy. **AIDS.** v. 23, p. 971-75, 2009.

PAWLOTSKY, J. M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol.** v.12(2), p. 96-102, 2004.

PIROTH, L. DUONG, M.; QUANTIN, C. et al. Does hepatitis C virus co-infection accelerate clinical and immunological evolution of HIV-infected patients? **AIDS.** v. 12, p. 381-88, 1998.

PIROTH, L.; BOURGEOIS, C.; DANTIN, S. et al. Hepatitis C virus (HCV) genotype does not appear to be a significant prognostic factor in HIV-HCV-coinfected patients. **Lippincott W&W Inc.** v. 13(4), p. 523, 1999.

POHL, A.; BEHLING, C.; OLIVER, D. et al. Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Am J Gastroenterol.** v. 96, p. 3142-46, 2001.

POL, S.; SORIANO, V. Management of chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. **Clin Infect Dis.** v. 47(1), p. 94-101, 2008.

PONAMGI, S. P. D.; RAHAMATHULLA, S.; KUMAR, Y. N. et al. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) coinfection in HIV infected individuals in south India and characterization of HCV genotypes. **Official Publication of Indian Association of Medical Microbiologists .** v. 7(1), p. 12-16, 2009.

POPE, M.; HO, D. D.; MOORE, J. P. et al. Different subtypes of HIV-1 and cutaneous dendritic cells. **Science.** v. 278, p. 786-88, 1997.

POTTES, F. A.; BRITO, A. M.; GOUVEIA, G. C. et al. Aids e envelhecimento: característica dos casos com idade igual ou maior que 50 anos em Pernambuco, de 1990 a 2000. **Rev Bras Epidemiol.** v. 10(3), p. 338-51, 2007.

POZZATO, G.; MORETTI, M.; FRANZIN, F. et al. Severity of liver disease with different hepatitis C clones. **Lancet.** v. 338, p. 509, 1991.

POZZATO, G.; KANEKO, S.; MORETTI, M. et al. Different genotypes of HCV are associated with different severity of chronic liver disease. **J med Virol.** v. 43, p. 291-96, 2005.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. et al. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. **Lancet.** v. 349, p. 825-32, 1997.

POYNARD, T.; YUEN, M.; RAYZIN, V. et al. Viral hepatitis C. **Lancet.** v. 362, p. 2095-100, 2003.

PUOTI, M.; BONACINI, M.; SPINETTI, A. et al. Liver fibrosis progression is related to CD4 cell depletion in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. **J Infect Dis.** v. 183, p. 134-37, 2001.

PUOTI, C.; CASTELLACCI, R.; MONTAGNESE, F. et al. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: The Italian Prospective Study of the Asymptomatic C Carriers (ISACC). **J Hepatol.** v. 37, p. 117-23, 2002.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. **Trends Immunol.** v. 24, p. 456-64, 2003.

RAMALHO, F.; ADÍLIA, C.; RAIMUNDO, M. et al. Genótipos do vírus da hepatite C. Sua importância na forma de transmissão e na gravidade da doença hepática. **J Port gastroenterol.** v. 4, p. 70-76, 1997.

RAMOS, P. C.; PASCUAL, C. A.; ARAZO, G. P. et al. Clinical implications of hepatitis C virus genotype in human immunodeficiency virus infected patients with chronic liver disease. **Rev Clin Esp.** v. 198(4), p. 212-16, 1998.

RAMOS, A.; TANURI, A.; SCHECHTER, M. et al. Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 5(1), p. 65-71, 1999.

RAUCH, A.; GAUDIERI, S.; EIVISON, J. et al. Low current and nadir CD4+ T-cell counts are associated with higher hepatitis C virus RNA levels in the Swiss HIV cohort study. **Antivir Ther.** v. 13(3), p. 455-60, 2008.

REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Rev Saúde Pública.** v. 40(2), p. 331-45, 2006.

RINALDO, C. R. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. **J Intern Med.** v. 265(1), p. 138-58, 2009.

RIOS, M.; VILLANUEVA, C.; RAMIREZ, E. Identification of B and F human immunodeficiency virus subtypes in Chilean patients. **Rev Med Chil.** v. 131(7), p. 711-18, 2003.

ROCKSTROH, J. K.; MOCROFT, A.; SORIANO, V. et al. Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. **J Infect Dis.** v. 192, p. 992-1002, 2005.

ROCKSTROH, J.; PETERS, L.; SORIANO, V. et al. High HCV is associated with an increased risk for mortality in HIV/HCV-co-infected individuals. **16th CROI.** Montreal, feb 2009.

RODRIGUEZ-TORRES, M.; GOVINDARAJAN, S.; SOLÁ, R. et al. Hepatic steatosis in HIV/HCV co-infected patients: correlates, efficacy and outcomes of anti-HCV therapy: a paired liver biopsy study. **J Hepatol.** v. 48(5), p. 756-64, 2008.

ROE, B.; HALL, W. W. Cellular and molecular interactions in coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. **Expert Reviews in Molecular medicine.** v. 10, p. 1-19, 2008.

ROSENTHAL, E.; PIALOUX, G.; BERNARD, N. et al. Liver-related mortality in human-immunodeficiency-virus-infected patients between 1995 and 2003 in the French GERMIVIC Joint Study Group Network (MORTAVIC 2003 Study). **J Virol Hepatol.** v. 14(3), p. 183-88, 2007.

RUBIO, M.; RUBIO, C.; NOGUÉS A. et al. Genotipos del virus de la hepatitis C. Estudio de 302 pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. **Med Clin.** v. 116, p. 650-51, 2001.

RYAN, P.; BERENQUER, J.; MICHELAUD, D. et al. Insulin resistance is associated with advanced liver fibrosis and high body mass index in HIV/HCV-coinfected patients. **J Acquir Immune Defic Syndr.** v. 50(1), p. 109-10, 2009.

SABIN, C. A.; TELFER, P.; PHILLIPS, A. M. et al. The association between hepatitis C virus genotype and human immunodeficiency virus disease progression in a cohort of hemophilic men. **J Infect Dis.** v.175(10), p. 164-68, 1997.

SABINO, E.; SHPAER, E.; MORGADO, M. et al. Identification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Genes Recombinant between Subtypes B and F in Two Epidemiologically Linked Individuals from Brazil. **Journal of Virology**. v. 68, p. 6340-46, 1994.

SAITO, T.; MISAWA, K.; KAWATA, S. Fatty Liver and Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Int Med**. v. 126, p. 460-68, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 74, p. 5463-67, 1977.

SARMENTO, J.; VASQUES, T.; CARNEIRO, F. et al. Relação entre os genótipos do vírus da hepatite C (VHC) e as características clínicas e epidemiológicas de um grupo de doentes do noroeste de Portugal. Hepatite C. **Permanayer Portugal**. p. 7-21, 2001.

SASS, D. A.; CHANG, P.; CHOPRA, K. B. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. **Dig Dis Sci** 2005. v. 50, p. 171-80, 2005.

SCOTT, W. W.; DONOVEN, P. J.; SANDERS, R. C. The sonography of diffuse liver disease. **Semin Ultras**. v. 2, p. 219, 2001.

SEBASTIANI, G.; ALBERTI, A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. **World J Gastroenterol**. v.12, p. 3682-94, 2006.

SEBASTIANI G.; VARIO A.; GUIDO, M. Performance of noninvasive markers for liver fibrosis is reduced in chronic hepatitis C with normal transaminases. **J Viral Hepat**. v.15, p. 212-18, 2008.

SEBASTIANI, G. Non-invasive assessment of liver fibrosis in chronic liver diseases: Implementation in clinical practice and decisional algorithms. **World J Gastroenterol**. v. 15(18), p. 2190-203, 2009.

SEREJO, F.; MARINHO, F.; VELOSA, J. et al. Elastografia hepática transitória, um método não invasivo para avaliação da fibrose em doentes com hepatite c crônica. **GE - J Port Gastreenterol**. v. 14, p. 8-14, 2007.

SHETH, S. G.; FLAMM, S. L.; GORDON, F. D. et al. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am. J. Gastroenterol**. v. 93(1), p. 44-48, 1998.

SHOUKRY, N. H.; GRAKOU, A.; HOUGHTON, M. et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. **J Exp Med.** v. 197, p. 1645-55, 2003.

SICILIANO, R. F.; BARONE, R. F. S. Terapia antifibrótica na hepatite C crônica. **I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da Hepatite C.** p. 32-34, 2008.

SILINI, E. M.; BONO, F.; CIVIDINI, A. et al. Molecular epidemiology of hepatitis C vírus infection among intravenous drug users. **J Hepatol.** v. 22, p. 691-95, 1995.

SILVA, A. C. M.; BARONE A. A. Fatores de risco para infecção pelo HIV em pacientes com o vírus da hepatite C. **Revista de Saúde Pública.** v. 40 (3), p. 482-88, 2006.

SILVA & NIEL. Hepatite C. In: ROSSETTI, M. L.; DA SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infecciosas Diagnóstico Molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SIMMONDS, P.; ZHANG, L. Q.; WATSON, H. G. et al. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products haemophiliacs and drugs users. **Lancet.** v. 336, p. 1462-72, 1990.

SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; CRAXI, A. et al. Epidemiological, clinical and therapeutic association of hepatitis C types in Western europeans patients. **J Hepatol.** v. 24, p. 517-24, 1996.

SIMMONDS, P.; BUCH, J.; COMBET, C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C vírus genotypes. **Hepatology.** v. 42(4), p. 963-73, 2005.

SITIA, G.; DE BONA, A.; BAGAGLIO, S. et al. Naive HIV/HCV-coinfected patients have higher intrahepatic pro-inflammatory cytokines than coinfecting patients treated with antiretroviral therapy. **Antivir Ther.** v. 11, p. 385-89, 2006.

SLAMA, L.; LE CAMUS, C.; SERFATY, L. et al. Metabolic disorders and chronic viral disease: the case of HIV and HCV. **Diabetes Metab.** v. 35(1), p. 1-11, 2009.

SMITH, D. B.; MELLOR, J.; JARVIS, L. M. et al. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. **J General Virol.** v.76, p. 1749-61, 1995.

SORIANO, V.; MARTIN, J. C.; GONZÁLEZ-LAHOZ. HIV-1 progression in hepatitis C-infected drug users. **Lancet.** v. 357(9265), p. 1361-62, 2001.

SORIANO, V.; SULKOWSKI, M.; BERGIN, C. et al. Care of patients with chronic hepatitis C and HIV co-infection: recommendations from the HIV-HCV International Panel. **AIDS**. v. 16(6), p. 813-28, 2002.

SORIANO, V.; MARTIN-CARBONERO, L.; GARCIA-SAMANIEGO, J. Treatment of chronic hepatitis C virus infection: we must target the virus or liver fibrosis? **AIDS**. v. 17(5), p. 751-53, 2003.

SORIANO, V.; GARCÍA-SAMANIEGO, J.; PUOTI, M. Co-infecção HIV/HCV. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**. Ed. Atheneu: São Paulo, 2003.

SORIANO, V.; PUOTI, M.; SULKOWSKI, M. et al. Care of patients with hepatitis C and HIV co-infection. **AIDS**. v. 18, p. 1-12, 2004.

SORIANO, V. Liver Disease in HIV Patients Without Viral Hepatitis Coinfection. **4TH International HIV and Hepatitis Co-infection Workshop**, 2006.

SORIANO, V.; MOCROFT, A.; ROCKSTROH, J. et al. Spontaneous viral clearance, viral load, and genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in HIV-infected patients with anti-HCV antibodies in Europe. **Journal of Infectious Diseases**. v. 198, p. 1337-44, 2008.

SOTO-RAMIREZ, L. E.; RENJIFO, B.; MCLANE, M. F. et al. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. **Science**. v. 271, p. 1291-93, 1996.

SOTO, B.; SANCHÉZ-QUIJANO, A.; RODRIGO, L. et al. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. **J Hepatol**. v. 26, p. 1-5, 1997.

SOUZA, S. L. S.; FEITOZA, P. V. S.; ARAÚJO, J. R. et al. Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 41(3), p. 247-51, 2008.

STANDISH, R. A.; CHOLONGITAS, E.; DHILLON, A. et al. An appraisal of the pathological assessment of liver fibrosis. **Gut**. v. 55, p. 569-78, 2006.

STAPLES, C.T.; RIMLAND, D.; DUDAS, D. Hepatitis C in the HIV (Human Immunodeficiency Virus) Atlanta V.A. (Veterans Affairs Medical Center) Cohort Study (HAVACS): the effect of coinfection on survival. **Clin Infect Dis**. v. 29, p. 150-54, 1999.

Referências bibliográficas

STERLING, R. K.; LISSEN, E.; CLUMECK, N. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**. v. 43, p. 1317–25, 2006.

SULKOWSKI, M. S.; MAST, E. E.; SEEFT, L. B. et al. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clin Infect Dis**. v. 30, p. 77-84, 2000.

SULKOWSKI, M. S. Hepatitis C virus infection in HIV infected patients. **Curr Infect Dis**. v. 3(5), p. 469-76, 2001.

SULKOWSKI, M. S.; THOMAS, D. L.; MEHTA, S. H. et al. Hepatotoxicity associated with nevirapine or efavirens containing antiretroviral therapy: role of hepatitis C and B infections. **Hepatology**. v. 35, p. 182-89, 2002.

SULKOWSKI, M. S. Viral hepatitis and HIV coinfection. **J Hepatol**. v. 48(2), p. 353-67, 2008.

SZWARCWALD, C. L.; BASTOS, F. I.; ESTEVES, M. A. P. et al. A disseminação da epidemia da AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: Uma análise espacial. **Cad Saúde Pública**. v. 16(1), p. S07-19, 2000.

TAYLOR, B. S.; SOBIESZCZYK, M. E.; MCCUTCHAN, F. E. et al. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. **N Engl J Med**. v. 358, p. 1590-602, 2008.

TELLINGHUISSEN, T. L.; MATTHEW, J. E.; THOMAS, V. H. et al. Studing hepatitis C vírus: making the Best of a bad vírus. **Journal of Virology**. v. 81(17), p. 853-67, 2007.

THEIN, H. H.; YI, O.; KRAHN, M. D. Natural history of hepatitis C virus infection in HIV-infected individuals and the impact of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. **AIDS**. v. 22(15), p. 1979-91., 2008.

THIMME, R.; OLDACH, D.; CHANG, K. et al. Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection . **JEM**. v. 194, p. 1395-1406, 2001.

THOMSON, M. M.; SIERRA, A.; TANURI, A. et al. Analysis of Near Full-Length Genome Sequences of HIV Type 1 BF Intersubtype Recombinant Viruses from Brazil Reveals Their Independent Origins and Their Lack of Relationship to CRF12_BF. **AIDS Research and Human Retroviruses**. v. 20(10), p.1126-33, 2004.

Referências bibliográficas

TILG, H.; DIEHL, A. M. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. **NEJM**. v. 343(20), p. 1467- 76, 2000.

TILG, H.; MOSCHEN, A.; KASER, A. Mode of function of biological anti-TNF agents in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Expert opinion on biological therapy**. v. 7(7), p. 1051-59, 2007.

TORRIANI, F. J.; RODRIGUEZ-TORRES, M.; ROCKSTROH, J. K. et al. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. **NEJM**. v. 351(5), p. 438-50, 2004.

TOVO, C. V.; SANTOS, D. E.; MATTOS, A. Z. et al. Avaliação da imunidade celular nos pacientes Co-Infetados pelo vírus da hepatite C e vírus da imunodeficiência humana. **Arq Gastroenterol**. v. 44(2), p. 113-17, 2007.

TRIPATHY, S. P.; SULKARNI, S. S.; JADHAV, S. D. et al. Subtype B and C HIV type 1 recombinants in the northeastern state of Manipur, India. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 21(2), p. 152-57, 2005.

URBANUS, A. T.; VAN DE LAAR, T. J. W.; SCHINKEL, J. et al. HCV is emerging as an STI among HIV-infected MSM: a threat to the MSM community? **XVII International AIDS Conference**. México City. August, 2008.

VALI, B.; YUE, F. Y.; JONES, R. B. et al. HIV-Specific T-Cells Accumulate in the Liver in HCV/HIV Co-Infection. **PLoS ONE**. v. 3(10), p. 34-54., 2008.

VAN DE LAAR, T. J. W.; VAN DER BIJ, A. C.; PRINS, M. et al. Increase in HCV incidence among men Who have sex with men in Amsterdam most likely caused by sexual transmission. **J Infect Dis**. v. 196, p. 230-38, 2007.

VAUGHAN, H. E.; CANE, P.; TEDDER, R. S. Characterization of HIV-1 clades in the Caribbean using pol gene sequences. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 19(10), p. 929-32, 2003.

VÉRAS, N. M. C.; VÉRAS, V. S.; RAMALHO, E. D. et al. HIV type1 genetic variability in Central Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 23, p. 1481-89, 2007

VERMA, S.; GOLDIN, R. D.; MAIN, J. Hepatic steatosis in patients with HIV-Hepatitis C Virus coinfection: is it associated with antiretroviral therapy and more advanced hepatic fibrosis? **BMC Res Notes**. v. 1, p. 46, 2008.

VIEIRA, S. **Bioestatística, Tópicos Avançados** . 2.ed. Elsevier: Rio de Janeiro RJ. 2004.

VISNEGARWALA, F. CHEN, L.; RAGHAVAN, S. et al. Prevalence of diabetes mellitus and dyslipidemia among antiretroviral naive patients co-infected with hepatitis C virus (HCV) and HIV-1 compared to patients without co-infection. **J Infect.** v. 50(4), p. 331-37, 2005.

WANG, X. P.; GOODWIN, L.; KAHN, P. et al. Influence of Increased CD4 Cell Counts on the Genetic Variability of Hepatitis C Virus in Patients Co-infected with Human Immunodeficiency Virus I. **J Biomol Tech.** v. 17(3), p. 228-39, 2006.

WENDEL, S.; LEVI, J. E.; TAKAOKA, D. T. et al. Primary screening of blood donors by nat testing for HCV-RNA: development of an "in-house" method and results. **Rev Inst Med Trop S Paulo.** v. 49(30), p. 177-85, 2007.

WHO/UNAIDS. AIDS Epidemic Update: December 2007. Disponível em: <<http://www.unaids.org/epi/2007/>>. Acesso em: 19 fevereiro de 2009.

WHO. Hepatitis C, global prevalence. December 2007. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre.org>>. Acesso em 20 fevereiro de 2009.

ZAMIN JR, I.; MATTOS, A. A.; PERIN, C. et al. A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não-alcoólica. **Arq gastroenterol.** v. 39(1), p. 22-26, 2002.

ZEKRI, A. R.; ASHOUR, M. S.; HASSAN, A. et al. Cytokine profile in Egyptian hepatitis C virus genotype-4 in relation to liver disease progression. **World J Gastroenterol.** v. 11, p. 6624-30, 2005.

ZEREMSKI, M.; TALAL, A H. Dideoxynucleoside analogues should be used cautiously in patients with hepatic steatosis [Editorial]. **Clinical Infectious Diseases.** v. 43(3), p. 373-76, 2006.

YAMADA, M.; KAKUMU, S.; YOSHIOKA, K. et al. Hepatitis c vírus genotypes are not responsible for the development of serious liver diseases. **Dig Dis Csi.** v. 39, p. 234-39, 1994.

YERLY, S.; JOST, S.; MONNAT, M. et al. HIV-1 co/super-infection in intravenous drug users. **AIDS.** v. 18(10), p. 1413-21, 2004.

YONKERS, N. L.; RODRIGUEZ, B.; POST, A. B. et al. HIV coinfection impairs CD28-mediated costimulation of hepatitis C virus-specific CD8 cells. **The Journal of Infectious Diseases.** v. 194(3), p. 391-400, 2006.

ANEXO A – QUESTIONÁRIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

I. Dados de identificação do paciente e características demográficas

Dados pessoais	
Nome	Data da consulta
Idade	Endereço
Sexo	telefone
Naturalidade	Tempo de diagnóstico de HIV
Procedência	Tempo de diagnóstico de HCV

II. Características sócio-econômica e cultural

Fatores de risco	Opção sexual	Perfil econômico e cultural
Hemotransusão	Heterossexual	Ocupação
Comunicante de HIV	Homossexual	Escolaridade
Comunicante de HCV	Bissexual	Renda mensal
Usuário de drogas injetáveis		
Múltiplos parceiros sexuais		
Presença de DSTs		

III. Status clínico no momento da consulta

Sinais e sintomas	HAART/ Anti-virais
<ol style="list-style-type: none"> 1. Fadiga/astenia 2. Anorexia 3. Dor abdominal 4. Icterícia 5. Edema de membros inferiores 6. Ascite 7. Aranhas vasculares 8. Eritema palmar 9. Ginecomastia 10. Encefalopatia 11. Veias abdominais visíveis 	

ANEXO B – EXAMES COMPLEMENTARES**I. Exames hematológicos****Exames**

- Leucócitos
- Hematócrito
- Hemoglobina
- TAP
- Plaquetas

II. Exames bioquímicos**Exames**

- ALT
- AST
- Albumina
- Bilirrubina total
- Creatinina
- Fosfatase alcalina
- Gama GT
- Glicose
- Colesterol total
- HDL
- Triglicerídeos

III. Exames de imunologia celular**Exames**

- Contagem de células CD4⁺
- Contagem de células CD8⁺

ANEXO B – EXAMES COMPLEMENTARES

IV. Exames de imunologia

Exames

- Dosagem de IL- 4
- Dosagem de IL- 6
- Dosagem de IL-8
- Dosagem de IL- 10
- Dosagem de IL- 12
- Dosagem de IFN- γ

V. Exames biomoleculares

Exames

- PCR quantitativo do HIV
- Sub-tipagem do HIV
- PCR qualitativo do HCV
- PCR quantitativo do HCV
- Genotipagem do HCV

VI. Exame ultra-sonográfico

Alterações ultra-sonográficas

- Fígado normal
- Atenuação do feixe sonoro
- Fígado heterogêneo
- Fígado contraído

VII. Classificação de Child-Pugh

Classificação de Child-Pugh¹

Encefalopatia hepática	ausente	1-2	3-4
Ascite	ausente	leve	moderada/severa
Albumina	> 3,5	2,8-3,5	< 2,8
Bilirrubina total	< 2,0	2,0-3,0	> 3,0
Tempo de protrombina	1-4	4-6	> 6
Pontos:	1	2	3

A: 5-6 pontos B: 7-9 pontos C: 10-15 pontos

Notas: ¹soma-se os pontos para cada um dos cinco itens;

**GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS
GERÊNCIA DE VIROLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome _____
 Registro: _____ Sexo _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____
 Telefone: _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS E IMUNOBIOLOGICAS DA CO-INFECÇÃO HIV E VÍRUS DA HEPATITE C EM UMA POPULAÇÃO ATENDIDA NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS

Pesquisador responsável: Marilú Barbieri Victoria

Gerência de Virologia/Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e Fundação HEMOAM

Aprovação do estudo pela Comissão de Ética em Pesquisa da FMT-AM em 15/08/2006

III – EXPLICAÇÃO AO PACIENTE:

A Gerência de Virologia da FMTAM, em conjunto com o HEMOAM, estão desenvolvendo um projeto de pesquisa em pessoas infectadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) co-infectados com o vírus da hepatite C (VHC), cujos objetivos principais são:

1. GERAL:

Descrever as características clínicas e imunobiológicas da co-infecção HIV/HCV em uma população de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

2. ESPECÍFICOS:

Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes co-infectados relacionando-os com o perfil imunológico.

Determinar os genótipos do vírus C e sub-tipos do HIV, bem como a carga viral de ambos os vírus na população de pacientes co-infectados, através de técnicas de biologia molecular.

Estudar o perfil da resposta imune celular e de citocinas dos pacientes co-infectados HIV/HCV.

O conhecimento destes dados, além de fornecer informações importantes para as ações de controle da epidemia de HIV/AIDS, bem como da hepatite C, permitirá também orientar o tratamento oferecido.

Este projeto será conduzido sob a responsabilidade da médica **MARILÚ BARBIERI VICTORIA**.

IV – PARTICIPAÇÃO DO ESTUDO:

Sua participação neste projeto implica em ser submetido a uma entrevista, coleta de sangue para exames e o tratamento da sua patologia de acordo com a sua situação clínica.

ENTREVISTA: Tem por finalidade levantar dados sócio-demográficos (local de moradia, escolaridade, cidade onde mora ou morou), dados sobre suas práticas sexuais e risco de infecção pelo HIV e hepatite C, sobre sua atual situação de saúde, medicamentos anti-retrovirais e anti-virais em uso (nome, dose, se toma regularmente, quanto tempo) e sobre doenças que você já teve (alguns dados serão coletados do seu prontuário), exames realizados e outras doenças adquiridas.

COLETA DE SANGUE: Serão coletados 30 mL de sangue (o equivalente a três colheres de sobremesa). Neste material serão realizados exames laboratoriais como: hemograma, exames de função do fígado, exames imunológicos e exames biomoleculares do HIV e vírus da hepatite C.

A coleta será feita em agulhas descartáveis e por profissional capacitado, de modo a diminuir os riscos que possam ocorrer neste procedimento, tais como: dor no local, hematomas e inflamação. Esta coleta será feita uma vez na Fundação HEMOAM e outra vez na FMT-AM.

O paciente foi claramente informado pelo meu médico assistente *abaixo identificado e firmado*, sobre a realização dos procedimentos acima. O *paciente declara* estar ciente que pode suspender estes procedimentos a qualquer

Anexos

momento, sem que este ato implique em qualquer forma de constrangimento entre ele e seu médico, o qual se dispõe a continuar a orientá-lo e tratá-lo em quaisquer circunstâncias.

TRATAMENTO: Você irá receber tratamento com medicações para o vírus da hepatite C que já são usadas e já estão liberadas e determinadas pelo Ministério da Saúde do Brasil. Também, de acordo com o seu quadro clínico e laboratorial quanto ao HIV usará juntamente o tratamento com drogas anti-retrovirais para AIDS, caso seja necessário, que serão prescritos pelo seu médico que acompanha a sua doença.

O *paciente declara* estar ciente que pode suspender o tratamento a qualquer momento, sem que este ato implique em qualquer forma de constrangimento entre ele e seu médico, o qual se dispõe a continuar a orientá-lo e tratá-lo em quaisquer circunstâncias.

O *paciente declara*, ainda, que tomou conhecimento dos seguintes efeitos adversos das medicações, e que diante de qualquer dos sintomas abaixo deverá comunicar seu médico imediatamente:

- Vômitos e dor no estômago
- Falha na resposta da doença
- Hepatite pelo medicamento
- Tonturas
- Febre
- Dores no corpo e nas juntas
- Dor de cabeça
- Turvação na visão

No caso de complicações com a medicação a mesma deverá ser imediatamente suspensa e/ou substituída por outra.

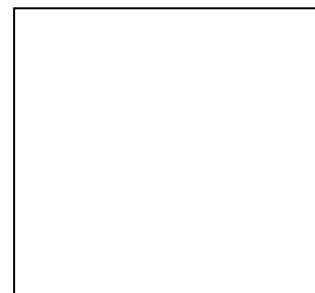
O *paciente declara*, ainda, Eu li este formulário de consentimento. Tive a oportunidade de fazer todas as perguntas referentes a todos os procedimentos e tratamentos e *firmo abaixo* que todas as minhas dúvidas foram respondidas. Os riscos e benefícios destes procedimentos e tratamento foram explicados a mim. Concordo livremente em me submeter a tais procedimentos como: retirada de sangue e tratamento do HIV e Hepatite C.

Finalmente assim o paciente faz sua adesão ao estudo permitindo a coleta de sangue e em tomar as medicações para o HIV e/ou Hepatite C, quando lhes forem prescritas.

Paciente: _____
 Responsável legal (quando for o caso): _____
 Sexo: _____ Idade: _____
 RG do paciente ou responsável legal: _____
 CPF do paciente ou representante legal: _____
 Endereço: _____
 Data: ____/____/____

 Assinatura do paciente

 Assinatura do representante legal



Marca datiloscópica

Médico responsável: MARILU BARBIERI VICTORIA
 CRM: 3019 CPF: 52105965200
 Endereço do Serviço: Av. Pedro Teixeira, 25
 Manaus – AM CEP: 69040-00
 Telefone: (92) 99820967

 Assinatura e carimbo do médico

____/____/____

