



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

JOSANE REGINA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE G (GBV-C) NA
RESPOSTA IMUNE FRENTE À INFECÇÃO POR *Leishmania*
*chagasi***

**Natal-RN
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**INFLUÊNCIA DO VÍRUS DA HEPATITE G (GBV-C) NA
RESPOSTA IMUNE FRENTE À INFECÇÃO POR *Leishmania
chagasi***

Josane Regina de Lima

Dissertação de Mestrado apresentado ao Departamento de Bioquímica Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Bioquímica. Orientador: Professora Selma Maria Bezerra Jerônimo

**Natal-RN
2007**

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Lima, Josane Regina de.

Influência do vírus da hepatite G (GBV-C) na resposta imune frente à infecção por *Leishmania chagasi* / Josane Regina de Lima. – Natal, RN, 2007.

74 f.

Orientadora: Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Hepatite – Dissertação. 2. GBV-C – Dissertação. 3. *Leishmania Chagasi* – Dissertação. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 613.36-002(043.3)

AGRADECIMENTOS

Aos professores: *Edda e Maurício pelas dicas e pela paciência. Muito obrigada!*

A Jack Stapleton: *Pelo kit de detecção de anticorpo antiglicoproteína - E2. Muito obrigada!*

À Professora Selma: *Pela oportunidade e pelos esclarecimentos. Muito obrigada!*

A Wilton: *Por estar sempre disposto a ajudar. Muito obrigada!*

À Dra. Aparecida do Hemovida: *Pela autorização para pesquisar no Hemovida e pelos dados referentes aos doadores. Muito obrigada!*

À doutora: *Por tudo, com certeza sem “a senhora” eu estaria muito mais tumultuada. Muito obrigada!*

À Glória e Olívia: *Minhas irmãs de Lab, esses anos de lab teriam sido muito menos divertidos sem vocês. Muito obrigada!*

À Dani: *My new best friend pelas árvores filogenéticas e pela apresentação. Muito obrigada!*

À Núbia: *Por ter ido coletar, de livre e espontânea vontade, os soros no Hemovida. Muito obrigada!*

A todos os meus amigos do LAB: *Léo, Sérgio, Bruna, Eliene, Michelli, Carlinhos, Ângela e James por sempre me ajudarem, cada um do seu jeito; pelos momentos de amizade que tive ao lado de todos vocês e por me agüentarem por tanto tempo. Muito obrigada!*

À minha mãe e meu pai: *Por sempre me apoiar em tudo. Muito obrigada!*

A Deus: *muito obrigada!*

Resumo

GBV-C é um vírus membro da família dos Flavivirus, que tem um aparente papel indutor da resposta Th1 e está associado ao prolongamento da sobrevivência, em pessoas infectadas com HIV. *L. chagasi* é responsável por um amplo espectro que varia da forma assintomática, com resolução espontânea da infecção e, consecutivamente, desenvolvimento de resposta positiva para o DTH; a forma severa da leishmaniose visceral (LV), que na maioria dos casos pode ser fatal se não tratada. Para determinar se o GBV-C pode influenciar na resolução da infecção por Leishmania, nós pesquisamos a prevalência de GBV-C em uma população residente em área endêmica para *L. chagasi* no Brasil. Foi observado que a viremia de GBV-C foi maior em indivíduos residentes na região urbana, que nos residentes em região periurbana de Natal, Brasil (16% e 7,5%, respectivamente). Evidência de prévia infecção de GBV-C (anticorpo anti-E2) foi detectada em 24% e 12% nesses grupos respectivamente, aumentando com a idade ($p= 0.0121$). Não foi encontrada diferença da viremia de GBV-C entre os grupos DTH+ e LV ($p= 0.269$); Contudo, o grupo dos indivíduos LV teve mais casos de anti-E2 ($p= 0,0012$), e a endurecimento do DTH foi menor em indivíduos com anti-E2 comparado aos sem anti-E2 (4.5 mm x 7.12 mm, respectivamente; $p= 0,002$). O inverso foi observado para os indivíduos positivos para RNA de GBV-C (6.8 mm) comparados aos sem (3.3 mm; $p= 0.0054$). Esses achados sugerem que o GBV-C pode promover o tipo 1 de resposta imune e pode com isso influenciar na resolução da infecção por Leishmania.

Abstract

GB virus type C (GBV-C) appears to promote a Th1 response and is associated with prolonged survival in HIV-infected people. *L. chagasi* causes a spectrum of illness that varies from severe visceral leishmaniasis, a disease that in the majority of cases is fatal if not treated, to self resolution of infection and development of positive DTH response that is protective against symptomatic disease. To determine if GBV-C viremia might influence the outcome of *Leishmania* infection, we characterized GBV-C status in a cohort of subjects residing in a *L. chagasi* endemic area in Brazil. GBV-C viremia was more prevalent in blood donors from urban than in periurban regions of Natal, Brazil (16% and 7.5% respectively). Evidence of prior GBV-C (anti-E2 antibodies) was detected in 24% and 12% of these groups respectively. Anti-E2 increased with age ($p= 0.0121$). No difference in GBV-C viremia was found in the DTH+ and VL groups ($p= 0.269$); however, subjects with visceral leishmaniasis were more likely to have anti-E2 than DTH+ subjects ($p=0.0012$), and DTH induration was smaller in subjects with E2 antibodies (4.5 mm) compared those without (7.12 mm) ($p= 0.002$). Furthermore, the size of the *Leishmania* DTH response was greater in GBV-C viremic subjects (6.8 mm) compared to non-viremic subjects (3.3 mm; $p= 0.0054$). These findings suggest that GBV-C virus may promote a type 1 immune response that could influence the outcome of *Leishmania* infection.

LISTA FIGURAS

Figura 1. Modelo do vírus da hepatite G (GBV-C).....	12
Figura 2. Estrutura genômica do Vírus da Hepatite G	13
Figura 3. Árvore filogenética da família dos flavivírus.....	14
Figura 4. Estrutura genômica do HCV	15
Figura 5. Quantificação de anticorpo anti-glicoproteína E2 na população de doadores, por faixa etária.	38
Figura 6. Quantificação de anticorpo anti-glicoproteína E2 na população exposta a <i>L. chagasi</i> , por faixa etária.....	41
Figura 7. Avaliação de resposta imune celular na população exposta à <i>L. chagasi</i> , pela presença de viremia ($p= 0,269$).....	44
Figura 8. Avaliação da resposta imune celular na população exposta à <i>L. chagasi</i> , pela presença de anti-E2 ($p= 0,0023$).....	45
Figura 9. Avaliação da resposta imune celular na população residente em Parnamirim, pela presença da viremia ($p= 0,0053$).....	46
Figura 10. Análise filogenética das amostras do RN com as seqüências completas de GBV-C.....	49

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Aspectos etiológicos, epidemiológicos e clínicos das hepatites A, B, C, D, E e G.....	11
Tabela 2. Leishmaníose do mundo e seus agentes etiológicos.	20
Tabela 3. Triagem sorológica para doação de sangue.....	36
Tabela 4. Freqüência de GBV-C na população de doadores. Os valores representam o número determinado de indivíduos positivos e negativos para GBV-C e para anticorpo anti-E2.....	37
Tabela 5. Doadores de Sangue: freqüência de infecção GBV-C e anticorpos E2 pelo sexo.....	39
Tabela 6. Percentual de GBV-C nos municípios de Parnamirim e Serra Negra / Caicó.....	39
Tabela 7. População exposta a Leishmania chagasi: freqüência de GBV-C e anti-E2 por idade.	40
Tabela 8. População exposta a Leishmania chagasi: freqüência da infecção GBV-C pelo sexo.....	42
Tabela 9. Infecção de GBV-C (para todas as idades) em população exposta a Leishmania chagasi, considerando a resposta à infecção por Leishmania chagasi.....	43
Tabela 10. Infecção por GBV-C em população exposta a Leishmania chagasi, considerando a resposta à infecção por Leishmania chagasi.....	43
Tabela 11. Carga viral de GBV-V.	47
Tabela 12. Amostras amplificadas para determinar o genótipo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
BSA	Albumina Bovina
BS	Banco de Sangue
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSTs	Doenças sexualmente transmitidas
DEPC	Dietil Pirocarbonato
dNTP	Desoxinucleosídeos trifosfatos
DTH	Teste de hipersensibilidade tardia
EDTA	Ácido Etilenodiamina Tetracético
GBV-C	Vírus da Hepatite G
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana adquirida
IL	Interleucina
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
UTR	Região Não Traduzida
pb	Pares de base
PHA	Fito-hemaglutinina
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAsin	Inibidor de ribonuclease
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa
TBE	Tampão de corrida TRIS-BORATO-EDTA
TAE	Tampão de corrida TRIS-ACETATO- EDTA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Vírus Hepatite G	11
1.2. Leishmania sp.	19
2. OBJETIVO	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Sujeitos da pesquisa	27
3.1.1. Doadores de sangue	27
3.1.2. Amostra populacional do Rio Grande do Norte.....	27
3.1.3. População exposta à <i>Leishmania chagasi</i>	27
3.2. Considerações Éticas	28
3.3. Detecção da infecção por <i>L. Chagasi</i>	28
3.3.1. Teste de Montenegro (DTH – Teste cutâneo de Hipersensibilidade tardia)..	28
3.3.2. Detecção de amastigota de <i>L. chagasi</i> na medula óssea.	29
3.3.3. Detecção de anticorpo para <i>L. chagasi</i> utilizando antígenos nativos solúveis (extrato bruto) e recombinante (rK39).	29
3.4. Detecção da viremia de GBV-C	30
3.4.1. Extração de RNA	30
3.4.2. Transcrição Reversa.....	31
3.4.3. Amplificação do cDNA por PCR.....	32
3.4.3. Amplificação por PCR interna (Nested)	32
3.5. Detecção de anticorpo anti- glicoproteína E2	33
3.6. PCR em tempo real	34
3.7. Determinação do genótipo	34
3.8. Cálculo amostral	35
3.8.1. Área endêmica para <i>L. chagasi</i>	35
3.8.2. Amostra populacional do Rio Grande do Norte.....	35
3.9. Análise Estatística	35

4. RESULTADOS	36
4.1. População de doadores de sangue	36
4.1.1. Estudos sorológicos da triagem padrão dos doadores de sangue.....	36
4.2. Frequência de GBV-C entre os doadores	36
4.2.1. Distribuição da infecção por GBV-C por faixa etária	36
4.2.2. Distribuição da infecção por GBV-C com relação ao sexo.....	38
4.3. Frequência da infecção por gbv-c entre as diferentes áreas do RN	39
4.4. População exposta a <i>Leishmania chagasi</i>	40
4.4.1. Distribuição da infecção por GBV-C por faixa etária.....	40
4.4.2. Distribuição da infecção por GBV-C com relação ao sexo.....	41
4.5. Infecção por GBV-C em População exposta à <i>Leishmania chagasi</i>, considerando os diferentes fenótipos	42
4.5.1. Análise quantitativa de Montenegro	43
4.5.1.1. Montenegro x RNA de GBV-C.....	43
4.5.1.2. Montenegro x anticorpo anti- glicoproteína E2.....	44
4.6. Análise quantitativa de Montenegro x RNA de GBV-C em população selecionada aleatoriamente	45
4.7. Carga viral	46
4.8. Análise do genótipo	47
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICES	69
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus Hepatite G

As hepatites infecciosas podem ser causadas por vírus denominados A, B, C, D e E (**Tabela 1**). Apesar de existirem testes diagnósticos sensíveis e específicos para esses vírus, permanece ainda desconhecida a etiologia de 10 a 20% das hepatites. Isso sugere a implicação de outros vírus, ainda não identificados, na etiologia das hepatites, sendo essas, então, classificadas como hepatites não A-E (Alter, 1996).

Tabela 1. Aspectos etiológicos, epidemiológicos e clínicos das hepatites A, B, C, D, E e G.

Hepatites	A	B	C	D	E	G
Vírus	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV	GBV-C/HGV
Fonte de infecção	Fezes	Sangue e outros fluidos corporais	Sangue e outros fluidos corporais	Sangue e outros fluidos corporais	fezes	Sangue e outros fluidos corporais
Transmissão	fecal-oral	Percutânea e per mucosa	Percutânea e per mucosa	Percutânea e per mucosa	fecal-oral	Percutânea e per mucosa
Período de incubação	15 a 50 dias	45 a 160 dias	15 a 150 dias	15 a 150 dias	15 a 60 dias	desconhecido
Risco de infecção crônica	Não cronifica	Adulto - 5 a 10% Criança-25a50% Infantis-90%	Alta, mais de 85%	Co-infecção com HBV baixa: 5 % Com super-infecção (HBV): 70 a 90%	Não cronifica	Não relatada até o momento
Manifestações clínicas	Forma aguda benigna e Forma aguda prolongada	Aguda: benigna ou hepatite fulminante Crônica: Cirrose e câncer do fígado	Crônica: Cirrose e câncer do fígado	Na presença do vírus da hepatite B: esteatose micro vesicular e necrose granulomatosa eosinofílica ou hepatite fulminante	Forma aguda: benigna Evolução grave em gestantes	Nenhuma relatada
Tratamento	Não se aplica	IFN- α e/ou lamivudina	IFN- α e ribavirina	IFN- α	Não se aplica	Não existe

Fonte: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>, modificado

Nesta última década, dois novos vírus relacionados às hepatites infecciosas foram isolados de pacientes com hepatite não A-E, sendo denominados GB vírus C (Simons et al., 1995) e HGV ou vírus da hepatite G (Linnen et al., 1996).

Estudos com GB vírus C e HGV demonstraram que ambos pertenciam à família Flaviviridae e seus genomas constituídos de uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, produtora de uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. Além disso, estudos de comparação de seqüências demonstraram que o GB vírus C e o HGV apresentam 86% de homologia na seqüência nucleotídica e 95% de homologia na seqüência aminoacídica, indicando, assim, que se tratava de isolados diferentes do mesmo vírus. Esse vírus foi, então, denominado de vírus da hepatite G ou GBV-C (Zuckerman, 1996). O modelo da estrutura do GBV-C está demonstrado na **Figura 1**.

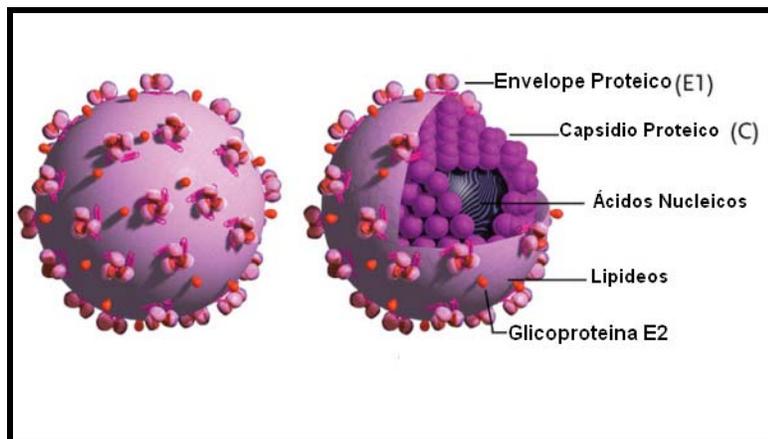


Figura 1. Modelo do vírus da hepatite G (GBV-C), Fonte: www.prn.org

O RNA do GBV-C apresenta polaridade positiva e possui mais de 9000 nucleotídeos (~9,4 Kb), contendo uma região de leitura aberta (ORF) e um sítio de entrada ribossomal (IRES) na região 5'-UTR (região não transcrita). O RNA genômico viral, após o processo de perda do capsídeo, funciona como um RNA mensageiro codificando uma poli-proteína. Essa poli-proteína contém duas proteínas do invólucro viral (E1 e E2), uma RNA helicase (NS3), uma enzima serina

protease do tipo tripsina (NS3), e uma RNA polimerase dependente de RNA (NS5B) (Figura 2) (Alter et al., 1997; Stapleton, 2003).

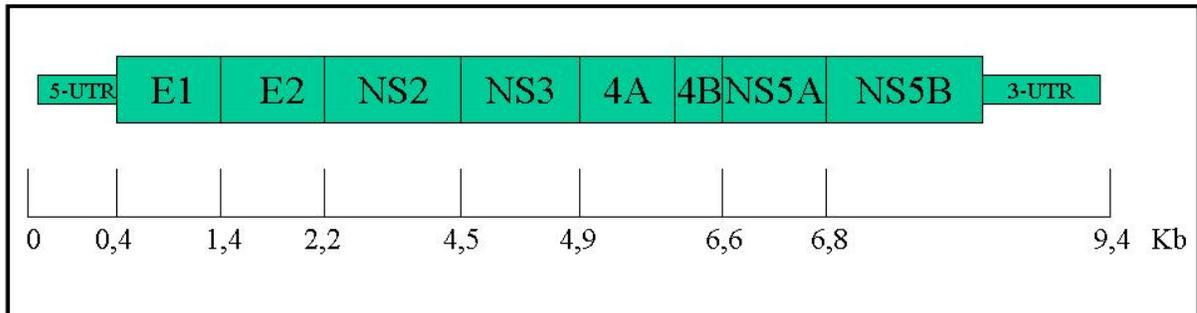


Figura 2. Estrutura genômica do Vírus da Hepatite G. **Fonte:** (Stapleton; Williams ; Xiang, 2004), modificado

O vírus GBV-C é polimórfico, com cinco genótipos identificados no mundo, distribuídos em áreas geográficas específicas. Os genótipos 1 e 5 são encontrados na África; o genótipo 2, na Europa, América do Norte e América do Sul; o genótipo 3, no norte da Ásia e na América do Sul; e o genótipo 4, no sul da Ásia (Stapleton, 2003). No Brasil, são encontrados o genótipo 1, 2 e 3, sendo o genótipo 2 o mais prevalente. Oliveira e colaboradores, 2002, avaliando a região 5'-UTR do GBV-C, em amostras de indivíduos de Goiânia, Goiás, observaram uma distribuição genotípica de 2b (58.9%), 2a (23.5%) e 1 (17.6%),

A família dos flavivírus (Figura 3) compreende vírus que infectam humanos como os vírus da febre amarela (YFV), dengue (DEN), encefalite transmitida por pulgas (TBEV), encefalite provocada pelo vírus do Nilo ocidental (WNV), hepatite C (HCV) e hepatite G (GBV-C); e vírus que infectam animais como os vírus da febre suína clássica (CSFV), vírus da diarreia bovina (BVDV), GBV-A e GBV-B que infectam primatas. Estudos comparativos entre as seqüências amino-

acídica dos agentes virais dessa família mostraram que, o HCV é o vírus mais filogeneticamente relacionado com GBV-C (Leary et al., 1996; Reed; Rice, 2000).

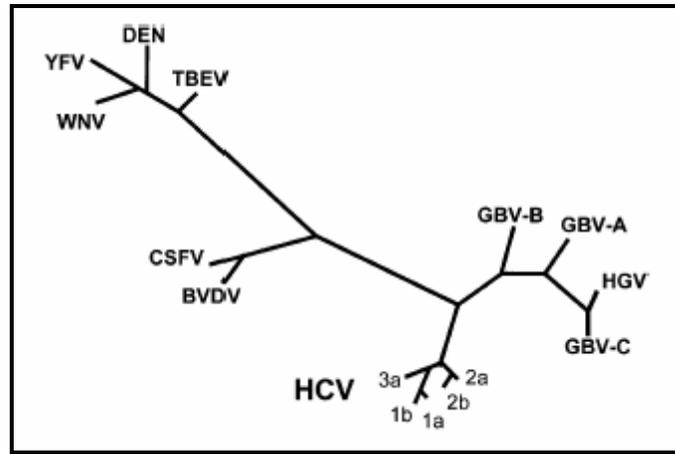


Figura 3. Árvore filogenética da família flavivirus, Fonte: (Polgreen; Xiang; Chang ; Stapleton, 2003)

Os vírus HCV (**Figura 4**) e GBV-C possuem 29% de homologia na seqüência aminoacídica da poliproteína, e apresentam regiões genômicas conservadas. Por exemplo, a região NS3 codifica em ambos os vírus a RNA helicase e uma serina protease do tipo tripsina. É conhecido também que a região da NS5B que codifica a RNA polimerase dependente de RNA e as regiões E1, NS4 e NS5A do GBV-C compartilham homologia com as regiões do HCV, sugerindo estrutura protéica e função similares entre as proteínas (Leary et al., 1996; Reed et al., 2000).

Ao contrário do HCV, que pode causar hepatite crônica, cirrose e câncer de fígado (Saito et al., 1990), o impacto da infecção pelo GBV-C e o seu papel nas hepatites ou em outras doenças ainda permanece desconhecido, não tendo sido relatado até o momento doenças relacionadas ao GBV-C (Oshita et al., 1998). Esses dois vírus diferem principalmente na alta taxa de glicosilação das proteínas E1 e E2 do envelope glicoprotéico e no alto grau de variabilidade da região E2 no

HCV (Leary et al., 1996; Reed et al., 2000). Em contraste, no GBV-C, há redução da glicosilação das proteínas E1 e E2 e perda da hipervariabilidade da região E2, em relação ao HCV. O envelope glicoprotéico, provavelmente, está envolvido na aderência e na fagocitose do vírus à célula, podendo as diferenças observadas na proteína E2 entre o HCV e o GBV-C, em parte, explicar a variação da patogenicidade entre os vírus e o aparente baixo tropismo do GBV-C pelo tecido hepático.

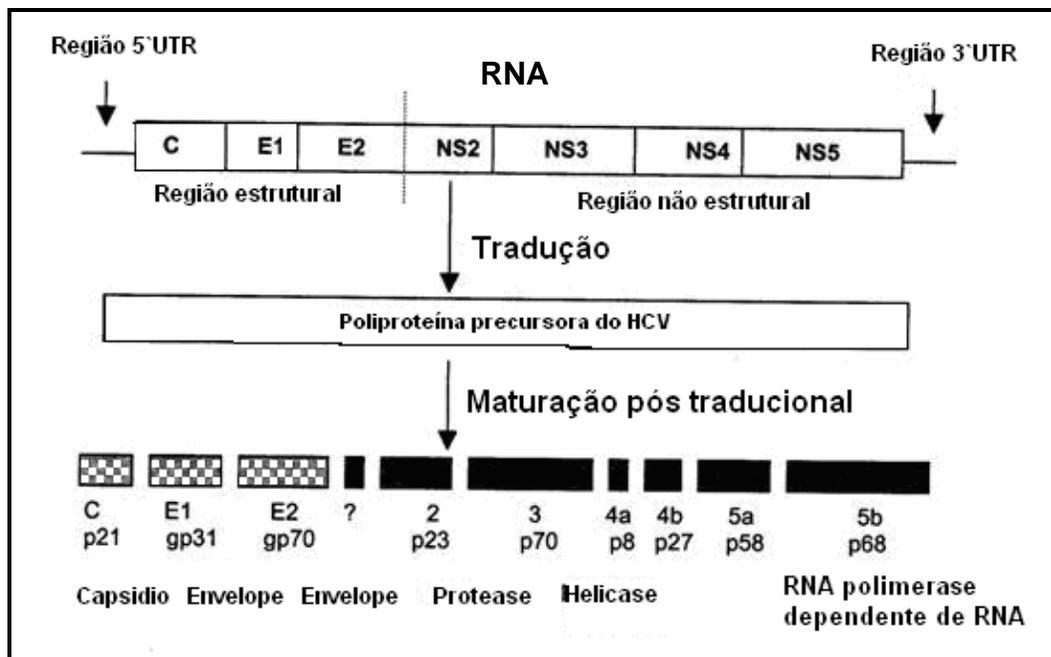


Figura 4. Estrutura genômica do HCV. Fonte: Molecular virology, University of Heidelberg.

A replicação do GBV-C em células do fígado foi, inicialmente, estudada devido a sua alta incidência em indivíduos com hepatite crônica, infectados pelo vírus do tipo C. A replicação do GBV-C, *in vitro*, foi demonstrada em células hepáticas (Seipp et al., 1999), em células de linhagem T CD4 primárias (Xiang et al., 2001), células de linhagem B e em células mononucleares de sangue periférico ativadas com PHA e IL-2 (Fogeda et al., 1999; Xiang et al., 2000). Porém, foi

observado que a maioria dos indivíduos infectados pelo vírus da hepatite G e não co-infectados por outro tipo de vírus hepatotrópico, não apresentavam injúria hepática, fortalecendo, dessa forma, a hipótese de que o vírus GBV-C não induz lesão hepática. Estudo para determinar os sítios de replicação do GBV-C, utilizando células mononucleares, demonstrou que o GBV-C replica-se em células mononucleares do sangue periférico, numa taxa maior do que em células hepáticas (Laskus et al., 1998).

A via de transmissão do vírus GBV-C é desconhecida, mas evidências na literatura, apontam à transmissão parenteral, sexual e vertical em humanos. Estudo prospectivo de incidência do GBV-C em poli-transfundidos demonstrou que em 40 pacientes submetidos à circulação extracorpórea 9% foram infectados pelo GBV-C (Wang et al., 1996). A prevalência entre os usuários de drogas intravenosas foi 17,8% enquanto que entre a população de doadores de sangue foi 0,89% (Li et al., 2002), fortalecendo a hipótese da transmissão parenteral. A transmissão sexual foi demonstrada, com uma maior prevalência de GBV-C em indivíduos tratados para doenças sexualmente transmitidas (DSTs) em relação aos que nunca foram tratados, independente se a população era heterossexual ou homossexual (Frey et al., 2002). A idade é um fator que, também, suporta a idéia da transmissão sexual, visto que a taxa de prevalência é baixa entre as crianças e aumenta durante a adolescência. A transmissão vertical vem sendo demonstrada, com uma taxa de 50% de transmissão de mãe para filho (Dal et al., 2004).

Na ausência de um teste sorológico eficiente para diagnosticar a infecção por GBV-C, a reação em cadeia da polimerase (PCR) continua sendo a forma mais

eficaz de detectar a presença do vírus. A prevalência virêmica de GBV-C, encontrada em doadores de sangue ao redor do mundo é de 1,2% na Alemanha, 1,3% no Japão, 4% na França, 1,8% nos Estados Unidos, 11% na África do Sul e 14,6% na Bolívia (Simons et al., 1995; Stapleton, 2003).

A depuração do GBV-C é evidenciada pela produção de anticorpos anti-glicoproteína E2 (Tacke et al., 1997), o qual é detectado por ensaio imunoenzimático (ELISA). A permanência do anticorpo na circulação parece ser longa tendo sido relatada por até 14 anos (Tacke et al., 1997) e sua produção vem sendo relacionada, porém não completamente, à proteção contra re-infecção por GBV-C (Thomas et al., 1998). A soroprevalência do anticorpo E2 ao redor do mundo é variável entre 2,7% (Filipinas), 3,9% (Butão) e 6,3% (Malásia) em países asiáticos a 10,9% (Alemanha) e 15,3% (Áustria) em países europeus (Ross et al., 1998).

Estudo prospectivo com pacientes multi-transfundidos, demonstrou que a viremia de GBV-C pode persistir por anos (Lefrere et al., 1997), porém 50 a 85% das pessoas imuno-competentes infectadas são capazes de depurar o vírus e produzir anticorpo anti-glicoproteína E2 (Thomas et al., 1998). Não foi descrito até o momento o tempo em que os indivíduos permanecem produzindo anticorpo anti-glicoproteína E2.

Dentre vários estudos sobre a prevalência do GBV-C no Brasil, estudos em doadores de sangue revelaram uma viremia entre 9,7% em São Paulo (Levi et al., 2003), 10% no Rio de Janeiro (Lampe et al., 1998) e 7,1% em Goiânia (Oliveira

et al., 2002) e a soroprevalência de anti-E2 de 19,5% no Rio de Janeiro (Ross et al., 1998).

O papel do GBV-C em co-infecção com outros vírus e helmintos vem sendo estudado. No trabalho de Gallian e colaboradores (Gallian et al., 1998), em uma área rural do estado da Bahia que apresenta alta taxa de infecção por esquistossomose, a prevalência de GBV-C foi de 16,4%, maior do que aquela observada para áreas urbanas de São Paulo e Goiânia. Gallian e colaboradores sugeriram que a infecção por helmintos pode influenciar a resposta imune, levando uma maior expressão de citocinas do tipo Th2, tendo por resultado uma infecção mais prolongada do vírus GBV-C.

Estudos realizados em indivíduos HIV-1 positivo co-infectados por GBV-C mostraram uma proteção na progressão da AIDS e consecutivamente aumento da sobrevivência desses indivíduos (Stapleton et al., 2004). A sobrevida é mais consistentemente demonstrada quando a infecção por GBV-C precede a do HIV (Xiang et al., 2001) e quando há persistência virêmica de GBV-C (Williams et al., 2004). A infecção dos linfócitos T por GBV-C em pessoas HIV positivas parece, *in vitro*, aumentar os níveis das quimiocinas RANTES, MIP1- α , MIP1- β e SDF-1, que competem com o HIV pelos co-receptores, diminuir a expressão do co-receptores para HIV (CCR5) e regular as citocinas Th1 (Xiang et al., 2004). Os indivíduos co-infectados HIV/GBV-C mantêm os níveis de citocinas Th1, apresentam maior contagem de células CD4, além de apresentarem uma diminuição da carga viral de HIV (Nunnari et al., 2003; Williams et al., 2004), enquanto que em pessoas HIV

positivas sem GBV-C há uma diminuição na contagem de células CD4, diminuição de citocinas Th1 e aumento das células Th2 no sangue periférico.

Esse efeito indutor potencial de resposta Th1, observado em pessoas com co-infecção GBV-C/ HIV, não está claro em relação a doenças auto-imunes. Doenças infecciosas cuja resolução está na dependência de uma resposta Th1 seria um excelente modelo para se avaliar como a infecção pelo vírus GBV-C poderia modular a resposta imunológica.

1.2. Leishmania sp.

O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários, da família Trypanosomatidae, que causam um grupo de doenças denominadas leishmanioses, apresentadas clinicamente sob as formas cutânea, cutânea - mucosa e visceral (Pearson; Sousa, 1996). Devido ao grande número, as espécies de leishmania foram classificadas em complexos, de acordo com os quadros clínicos que produzem, de modo que os Complexos mexicana e braziliensis estão envolvidos nas manifestações cutâneas e cutâneo-mucosas e o Complexo donovani na leishmaniose visceral (Lainson et al., 1987; Desjeux, 1996) (**Tabela 2**). Contudo, já foram relatadas espécies distintas produzindo diferentes manifestações clínicas, como por exemplo, casos de leishmaniose cutânea causada por *L. donovoni* (Mebrahtu et al., 1993) e *L. chagasi* (Ponce et al., 1991) e casos de leishmaniose visceral causada por *L. amazonensis* (Aleixo et al., 2006; Barral et al., 1991).

Tabela 2. Leishmaniose do mundo e seus agentes etiológicos.

Leishmaniose Tegumentar			Leishmaniose Visceral
Cutânea	Cutâneo-mucosa	Cutâneo-difusa	
Complexo braziliensis	Complexo braziliensis	Complexo mexicana	Complexo donovani
<i>L. (V.) braziliensis*</i>	<i>L. (V.) braziliensis*</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (L.) chagasi*</i>
<i>L. (V.) peruviana</i>		<i>L. (L.) pifanoi</i>	<i>L. (L.) donovani</i>
<i>L. (V.) guyanensis*</i>		<i>L. (L.) amazonensis*</i>	<i>L. (L.) infantum</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>		<i>L.(L.) aethiopica**</i>	<i>L.(L.) archibaldi **</i>
Complexo Mexicana			<i>L.(L.) tropica **</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>			
<i>L. (L.) pifanoi</i>			
<i>L. (L.) amazonensis*</i>			
<i>L. (L.) venezuelensis</i>			
<i>L.(L.) garnhami**</i>			
<i>L.(L.) major**</i>			
<i>L.(L.) tropica**</i>			

Fonte: Lainson; Shaw, 1987; Mazorchi, 1989 e Desjeux P, 1996.

*ocorrência no Brasil, ** ocorrência no velho mundo.

A leishmaniose visceral (LV) se concentra em países pobres, e a maioria dos casos no mundo tem registro em Índia, Sudão, Nepal, Bangladesh e Brasil. A LV encontra-se em franca expansão no Brasil, com centena de novos casos por ano, ocorrendo de forma endêmica no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Ministério da Saúde/2006).

O agente etiológico responsável pela leishmaniose visceral, no Brasil e em toda a América Latina, é o protozoário da espécie *Leishmania chagasi* (Lainson et al., 1987). A transmissão ocorre quando o vetor infetado pica o hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo e inoculam formas promastigotas de leishmania. A adesão das promastigotas ao macrófago são dependentes da

interação de moléculas de superfície do parasita, gp63 e LPG. Após opsonização do promastigota, por fração do complemento, ocorre interação com receptores do complemento (CR1 e CR3), presentes na superfície do macrófago, com internalização das mesmas e subsequente diferenciação em formas amastigotas (Brittingham et al., 1995; Brittingham ; Mosser, 1996).

A LV é uma protozoose sistêmica que, no Brasil, aparece mais freqüentemente em crianças. A LV afeta igualmente os sexos masculino e feminino em faixas etárias acima de 10 anos. No entanto, na faixa abaixo de 10 anos o sexo masculino é mais susceptível que o feminino. A ação patogênica do parasito está relacionada com a destruição de células do sistema fagocitário mononuclear, provocada pela reprodução das formas amastigotas, promovendo uma disfunção imunológica específica. O grau de infecção e o tipo de resposta imune podem determinar um amplo aspecto clínico caracterizado pelas formas clínicas assintomática, subclínica e clássica (Badaro et al., 1986). Na infecção assintomática os indivíduos podem apresentar reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania e/ou apresentar positividade ao teste sorológico que detecta anticorpo anti-leishmania, sem apresentar qualquer evidência de doença. Nas formas sintomáticas, a doença varia desde um quadro subclínico até a forma clássica, caracterizada por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, perda de peso, anemia, hiperglobulinemia e leucopenia (Pearson et al., 1996). A forma sub-clínica pode ter resolução espontânea ou progressão para doença avançada.

O diagnóstico da LV é tradicionalmente confirmado através de aspirado de medula óssea, punção esplênica e isolado de leishmania, em meio de cultura, a

partir de biópsia tecidual e sangue periférico. Contudo, esses métodos possuem desvantagens, a punção medular é um método invasivo e pode ser doloroso, além de exigir profissional especializado e apresentar uma positividade de 85% (Reed, 1996). A punção esplênica oferece um elevado risco de hemorragia (Chulay; Bryceson, 1983) .

O teste de hipersensibilidade cutânea tardia aos antígenos de leishmania, teste de Montenegro, é um ótimo marcador de resolução de infecção, mas não indicativo de doença, devido à supressão da imunidade celular na fase aguda da doença. Esse teste é negativo durante a fase sintomática (de Andrade; Teixeira; de Andrade; Pereira ; de Carvalho Filho, 1982). Os métodos sorológicos mais usados para detecção de infecção são imunofluorescência indireta (IFA) e Ensaio imunoenzimático (ELISA), contudo esses exames utilizam, como fonte de antígeno, o parasita inteiro ou extrato do parasita, o que limita a especificidade dos testes. Recentemente, têm sido utilizados antígenos recombinantes com capacidade de discriminar aqueles indivíduos com doença (Braz et al, 2002). No entanto, ainda não está disponível para uso em larga escala.

O curso da infecção por espécies de leishmania visceralizantes, em humano e em modelos murinos, é influenciado pela carga e espécie (virulência) do parasita, além da susceptibilidade genética do hospedeiro. Do ponto de vista evolutivo, essa interação, quando em equilíbrio, não causa prejuízo para ambas as espécies, tanto o hospedeiro não apresentará a sintomatologia da doença como o parasita não será eliminado completamente do hospedeiro. A resposta imune expressa, nesse caso, é predominantemente do tipo CD4 Th1, a qual leva à

produção de IFN- γ e TNF- α , permitindo o controle da infecção (Carvalho et al., 1992). Essas citocinas ativam mecanismos leishmanicidas de macrófagos, tais como a indução de moléculas efetoras de NO (óxido nítrico) gerados a partir da degradação do aminoácido L- arginina (Green et al., 2001; Liew et al., 1990).

O direcionamento das células CD4 T é crucial para o desenvolvimento de resposta celular protetora contra leishmania. Estudo com modelo murino, resistente e susceptível, documentou subgrupos distintos de células CD4 T, células Th1, que expressam citocinas IL2, TNF- α e INF- γ , capazes de estimular a proliferação celular, ativar macrófagos e induzir células B a secretarem subtipos de imunoglobulinas (IgG2a), capazes de fixar complemento. Em contraste, células Th2 expressam citocinas IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13 que inibem o desenvolvimento de resposta Th1 e ajudam na produção de anticorpos IgG1, IgE e IgA, pouco fixadores de complemento. Já algumas citocinas (TGF- β e IL10) são produzidas pelos dois subgrupos de células (Mosmann ; Coffman, 1989).

O modelo murino de leishmaniose cutânea causada por *L. major* tem servido como modelo da doença, com linhagem geneticamente resistente, C57BL/6, e susceptível BALB/c à leishmania. Estudos demonstraram que células TCD4 “naive” de camundongos susceptíveis sofrem diferenciação para células Th2, por intermédio de citocinas. Há inibição de síntese de INF- γ , tendo como resultado a ineficiência dos macrófagos controlarem o crescimento da leishmania, e progressão da infecção, com eventual morte do camundongo. Em contraste, camundongos resistentes infectados por *L. major* produzem IL-12, TNF- α e IFN- γ , que ativam

macrófagos e promovem a cura das lesões (Heinzel; Sadick; Mutha ; Locksley, 1991).

A diferença no perfil de resposta imune também é observada com as espécies visceralizantes de leishmania. Camundongos resistentes C57BL/6 infectados por *L. donovani* e *L. chagasi* desenvolvem resposta celular Th1 com produção de TNF- α e IFN- γ , resultando na resolução da infecção (Melby et al., 2001). Contudo, camundongos BALB/c infectados por espécies visceralizantes de leishmania, apresentam um retardamento da ação da IL12, observada 4 semanas após a infecção, sendo então produzido IFN- γ levando a formação de granulomas no fígado, células CD4 e CD8 específicas para o parasita são presentes, resultando, na resolução tardia da infecção (Wilson et al., 1998).

A evolução da infecção por *L. chagasi* em humanos, semelhante ao modelo murino, depende do padrão de resposta imune. Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com forma assintomática respondem ao antígeno de leishmania com produção de IL-2, IFN- γ e IL-12, característicos de resposta Th1. Em contraste, os indivíduos com leishmaniose visceral aguda apresentam expressão de IL-10 e não são capazes de produzir IFN- γ (Carvalho et al., 1992). A produção de citocinas IL-10, IL4 e IL13 por células TH2 funciona como fatores imunossupressores de citocinas Th1 (Carvalho; Bacellar; Barral; Badaro ; Johnson, Jr., 1989), favorecendo a progressão da doença.

Tendo como base o potencial do GBV-C de induzir resposta Th1 e o conhecimento de que indivíduos infectados por *Leishmania chagasi* sintomáticos apresentam uma resposta do tipo Th2, propomos avaliar se a co-infecção pelo vírus

GBV-C influencia a evolução frente à infecção por *L. chagasi*. O objetivo foi investigar se há diferenças na prevalência de infecção por GBV-C entre os indivíduos infectados por *L. chagasi* que evoluíram distintamente, para doença (LV) ou para auto-resolução (DTH+).

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência do vírus GBV-C frente à infecção por *Leishmania chagasi*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a prevalência de GBV-C em doadores de sangue de Natal, RN.

2. Determinar a prevalência da infecção por GBV-C nos Municípios de Parnamirim, Serra Negra e Caicó.

3. Determinar a prevalência do GBV-C em indivíduos casos de LV, familiares e contactantes.

4. Determinar a carga viral do GBV-C em um subgrupo de indivíduos infectados por GBV-C.

5. Determinar os genótipos do vírus em indivíduos residentes no RN.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos da pesquisa

3.1.1. Doadores de sangue

Cento e oito indivíduos submetidos à triagem para doação de sangue no Hemovida (Natal, RN) foram arrolados. Esses indivíduos aceitaram participar da pesquisa. O consentimento expresso pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Todos responderam a um questionário sobre dados de identificação pessoal (Apêndice B). Foram coletados 10 ml de sangue periférico de cada participante. O sangue foi processado e testado para presença de RNA do GBV-C, anticorpo anti-glicoproteína E2 e anticorpo anti-*L.chagasi*. Além da triagem sorológica, de rotina, para HTLV, doença de Chagas, HIV, HCV, HBV, HBSag e VDRL. Esses exames foram realizados no Hemovida.

3.1.2. Amostra populacional do Rio Grande do Norte

Para estimar o índice de infecção por GBV-C na população do Rio Grande do Norte, foram arrolados, randomicamente, indivíduos residentes em Serra Negra (n = 18), Caicó (n = 42) e Parnamirim (n = 80). Para todos foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), aplicado o questionário (Apêndice B) e entregue um folheto informativo (Apêndice D), além de coletados 10 ml de sangue periférico. Todas as amostras foram testadas para presença de RNA do GBV-C. Os indivíduos de Parnamirim foram submetidos ao teste de Montenegro e suas amostras testada para presença de anticorpo anti-*L.chagasi*.

3.1.3. População exposta à *Leishmania chagasi*

Foi denominada população exposta a *L. chagasi* os casos de calazar, familiares e contactantes, residentes em área endêmica para *L. chagasi*. As amostras de soro foram obtidas entre indivíduos, DTH+, DTH - e pacientes que desenvolveram leishmaniose visceral (LV), classificados em estudos prévios (Braz et al., 2002; Jeronimo et al., 2004), somando um total de 501 indivíduos. Pacientes com HIV co-infectados foram excluídos da pesquisa. Os familiares e contactantes foram submetidos ao teste de Montenegro (item 4.4.1). Pacientes com LV foram arrolados no curso da infecção, confirmado por aspirado de medula óssea (4.4.2) e teste sorológico (4.4.3), ou após tratamento. Para todos foi aplicado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e suas amostras foram testadas para presença de RNA do GBV-C, anticorpo anti-glicoproteína E2 no soro.

3.2. Considerações Éticas

O protocolo de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e no Conselho Nacional de Ética e Pesquisa (CEP-UFRN Número 86-04, CONEP: 10875) (Anexo A).

3.3. Detecção da infecção por *L. chagasi*

3.3.1. Teste de Montenegro (DTH – Teste cutâneo de Hipersensibilidade tardia)

O teste de Montenegro foi realizado para avaliar a resposta imune celular frente a antígenos de *Leishmania chagasi*. Foram inoculados 0,1 ml de antígeno de leishmania (BIOMANGUINHOS) na derme do antebraço. A leitura da reação é feita 48-72 horas após a inoculação, medindo-se a área de endureção. O teste é

considerado positivo (DTH+) quando a endureção é maior ou igual a 5 mm (Reed et al., 1986).

3.3.2. Detecção de amastigota de *L. chagasi* na medula óssea.

Amastigotas de *L. chagasi* foram identificadas através da coloração pelo GIEMSA em aspirados de medula óssea realizados por hematologistas. Esse procedimento foi realizado apenas em pacientes suspeitos de leishmaniose visceral.

3.3.3. Detecção de anticorpo para *L. chagasi* utilizando antígenos nativos solúveis (extrato bruto) e antígeno recombinante (rK39).

A detecção de anticorpo anti-leishmania no soro de pacientes com suspeita de LV e nas amostras de doadores foi realizada por ELISA, utilizando extrato bruto da cepa brasileira de *L. chagasi* (MHOM/BR/00/1669), conforme descrito previamente por Evans (Evans et al., 1989) , e proteína recombinante rK39 (Braz et al., 2002; Burns, Jr. et al., 1993).

Os antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 30,8 mM e Timerosal 0,01% (Sigma, St Louis, MO, EUA)) pH 9,6, aplicados em placa para ELISA 96 poços de baixa afinidade (Linbro[®]/Titertek[®] ICN[®] BIOMEDICAL INS., CA, EUA) e incubado por 18 horas, a 4°C. Após a incubação, o excesso de antígeno foi removido e o tampão de bloqueio (PBS pH 7,4/Tween20 (AMRESCO Inc., Ohio, EUA) a 1%) adicionado à placa, sendo mantido por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada 4 vezes com PBS pH 7,4/Tween 20 a 1%, os soros dos pacientes e dos controles negativos e positivos, diluídos, em PBS/Tween20 0,1%, foi aplicado em concentração de 1:100 para rK39 (Infectious Diseases Research Institute, Seattle,WA) e 1:500 para extrato bruto de

L.chagasi, sendo incubados por 1 hora, a temperatura ambiente. Subseqüentemente, procedeu-se à remoção do soro e à lavagem dos poços, conforme descrito anteriormente. Após essa etapa, o anticorpo secundário (conjugado anti-IgG-peroxidase (Promega, WI, EUA) , diluído de 1:400, para o extrato bruto) e a proteína-A (Boehringer Mannheim, Indianapolis,IN) (marcada com peroxidase, diluída 1:10000, para o antígeno rK39) foi adicionada e incubado por 1 hora. O excesso do material foi, então, desprezado e a placa foi novamente lavada nas mesmas condições anteriores para aplicação do substrato (peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma, St Louis, MO, EUA), na presença do cromógeno ABTS (2,2'azino-di-acido sulfônico 3- etilbenzotiazolino) (Sigma chemical Co. ,MI, EUA), (0,001 mM) diluído em tampão citrato fosfato (29,29 mM de ácido cítrico) (41,12 mM de fosfato de sódio dibásico) pH 4,2; o qual permaneceu por 1 hora, a temperatura ambiente, quando a reação foi interrompida pela adição de SDS 5 % (C₁₂H₂₅NaO₄S- Sulfato dodecil de sódio) (BDH Laboratory supplies Broom Rd Poole England). A densidade óptica foi lida a 405 nm (MULTISKAN[®] MCC/340[®] Titertek Instruments, Inc., Huntsville, AL, EUA), com posterior estabelecimento de um ponto de corte (0,117 para o extrato bruto e 0,093 para o rK39), que corresponde à média das absorbâncias dos soros controles negativos na diluição 1:500 e 1:100 mais três desvios padrões para o extrato bruto e proteína rK39, respectivamente.

3.4. Detecção da viremia de GBV-C

3.4.1. Extração de RNA

Todas as amostras de soro foram submetidas à extração de RNA, transcrição reversa e Reação em cadeia da polimerase (PCR) nested, utilizando

oligonucleotídeos complementares para a região 5'-UTR do vírus, de aproximadamente ~200 pb , para determinar a presença do vírus.

O RNA total foi extraído de 50 µl de soro, utilizando-se de uma solução contendo tiocianato de guanidina (Research Products International Corp.,IL,EUA) a 74% (peso/volume), 0,78% de sarcosil (Molecular Biology Certified™, CA, EUA), 40mM de citrato de sódio (pH 7,0) e 100 µL de 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, PA, EUA) em água tratada com Dietil Pirocarbonato 0,1% (DEPC) (Sigma, St Louis, MO, EUA). Além da solução, foram adicionados 30 µl de acetato de sódio (1M), 200 µl de fenol 100% (Sigma, St Louis, MO, EUA) e 30 µl de clorofórmio 100% (Merck & Co., Inc., NJ, EUA). Após incubação no gelo por 45 minutos, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5417R Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburgo, Alemanha) a 135000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante incolor foi coletado e congelado a – 80°C com isopropanol 100% (Merck & Co., Inc., NJ, EUA) por 1 hora e então centrifugado a 135000 rpm, por 15 minutos à 4°C. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado (RNA) foi lavado com 1ml de etanol 75% (Merck & Co., Inc., NJ, EUA) e ressuspenso em 20 µL de água tratada com DEPC 0,1%, posteriormente, o RNA foi desnaturado a 95 °C por 5 minutos.

3.4.2. Transcrição Reversa

As condições essenciais de amplificação da região 5'-UTR do genoma do vírus GBV-C foram aquelas já previamente descritas, conforme Xiang et al, 2001.

A partir de 5 µl da solução de RNA ressuspenso foi sintetizado DNA complementar (cDNA), utilizando 0,2 µl da enzima transcriptase reversa (Molony

Murine Leukaemia Virus Reversa Transcriptase (M-MLV-RT) (Promega, madison WI U.S.A) e 2 µl de oligonucleotídeo anti-sense (10mM) (invitrogen, CA, EUA) específica para a região 5'-UTR (oligonucleotídeo anti-sense 5'TGA AGG GCG ACG TGG ACC GT 3') por amostra.

As condições para transcrição reversa consistem de 2 passos em que o primeiro é 1 ciclo de 42°C por 75 minutos e o segundo 1 ciclo de 5 minutos a 95 °C no termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, BIO-RAD Laboratories, CA, USA).

3.4.3. Amplificação da região 5'-UTR

O cDNA foi amplificado utilizando oligonucleotídeo anti-sense (passo anterior) e 2 µl de sense (10mM) (oligonucleotídeo sense 5'AAG CCC CAG AAA CCG ACG CC 3') (invitrogen, CA, EUA) 10µl de água tratada com DEPC, 2,5 µl de 10X PCR Buffer II (Roche Appleid biosystems, Suécia), 2 µl de MgCl₂ (Roche Appleid biosystems, Suécia) (25 mM), 0,7µl dNTP (BIOLINE, London, UK) (10µmol), 0,2 µl BSA (10mg/ml) (BIOLABS), 0,2µl rRNAsin (Promega, madison, WI, U.S.A) (40 U/ µl), 0,3 µl TAq polimerase (invitrogen, CA, EUA) (5u/µl), por amostra.

Os passos de amplificação da região 5'-UTR do cDNA ocorrem imediatamente após a transcrição reversa e consistem de 35 ciclos composto cada pelas seguintes variações de temperatura: 94°C por 50 segundos, 55°C por 1 minuto e 10 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.

3.4.4. Amplificação por PCR interna (Nested)

Foi utilizado 3 µL do produto da amplificado anterior (cDNA) como molde para PCR adicionando 22 µL do mix de PCR, contendo: 13µl DEPC, 2,5 µl de 10X

PCR Buffer II (Roche biosystems, Suécia), 2 µl de MgCl₂ Solution (Roche Biosystems, Suécia) (25 mM), 0,7µl dNTP (BIOLABS) (10µmol), 0,2 µl BSA (10mg/ml) (BIOLABS), 0,3 µl TAq polimerase (Invitrogen, CA, EUA) (5u/µl) e 2 µl de oligonucleotídeos (10mM) (invitrogen, CA, EUA) (oligonucleotídeo sense 5´CGG CCA AAA GGT GGT GGA TG 3´e oligonucleotídeo 2 µl (10mM) (invitrogen, CA, EUA) anti sense 5´GTA ACG GGC TCG GTT TAA CG 3´). O protocolo da amplificação interna (Nested PCR) consiste dos seguintes passos: primeiro 1 ciclo com 95°C por 5 minutos, segundo 35 ciclos com cada ciclo composto de: 94°C por 50 segundos, 55°C por 1 minuto e 10 segundos e 72°C por 1 minutos 30 segundos e 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.

O produto da PCR foi submetido a eletroforese em agarose 2,0%, juntamente com marcador de DNA 100 pb (10 mM) (Hyperladder IV, BIOLINE), 100 mV durante 1 hora. O produto é corado com brometo de etídio (AMRESCO Inc., Ohio, EUA) e visualizado através da absorção de luz ultravioleta.

3.5. Detecção de anticorpo anti- glicoproteína E2

Anticorpo anti – glicoproteína E2 foi determinado pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit µPlate anti-HGenv (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, Ind.).

As amostras de soro foram diluídas em 200µl de tampão de amostras (kit), 20µl de cada diluição foi aplicada à placa de ELISA de 96 poços sensibilizada com estreptavidina (kit). A placa com as amostras e controles foi incubada por 120 minutos a 37 °C com 80µl da solução de incubação (antígeno de anti-glicoproteína E2 do envelope do vírus GBV-C e anti- GBV-C –E2 ligado à biotina) (kit), por poço.

A placa foi lavada 5 vezes com 200µl de solução de lavagem (kit) e incubada por 60 minutos a 37° C com 100µl solução de tampão (conjugado e anti-h-Fcy-antibody ligad a POD) (kit). Foi efetuada a segunda lavagem, nos mesmos moldes da primeira e a placa foi incubada com 100µl de solução contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (kit) e cromógeno (ABTS[®]) (kit), por 60 minutos em local protegido contra luz. A absorbância foi então mensurada no leitor de absorbância (MULTISKAN[®] MCC/340[®] (Titerteck Instruments, Inc., Huntsville, AL, EUA)), em filtro de 405 nm.

3.6. PCR em tempo real

A carga viral do GBV-C foi determinada em indivíduos infectados. As regiões 5'UTR, E2, NS3 e NS5A do genoma do vírus foi amplificada, por PCR em tempo real. Utilizando oligonucleotídios específicos para as 4 regiões do genoma e Platinum[®] Quantitative RT-PCR Thermo Script[™] (Invitrogen, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante, as regiões foram reversamente transcritas e a fluorescência medida por Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System TaqMan PCR detection (Applied Biosystems, CA, USA). Para a região 5'-UTR os primer usados foram sense (5'-GGCGACCGGCCAAAA-3') anti-sense (5'-CTTAAGACCCACCTATAGTGGCTACC-3') e sonda TaqMan (5'(FAM)-TGACCGGGATTACGACCTACCAACCCT -(TAMRA) 3').

3.7. Determinação do genótipo

A partir do RNA isolado dos 19 indivíduos infectados, os fragmentos das regiões 5'UTR, E2, NS3 e NS5A do genoma do vírus foram amplificados por RT-PCR e nested (conforme os itens 3.5.2 e 3.5.3.), purificado e seqüenciado com Big

Dye usando Dye Terminator Z V.3.1. A leitura das bases terminais foi realizada no seqüenciador de DNA automático ABI PRISM 3100-Avant Applied Biosystems Automated Sequencer. Os dados obtidos foram alinhados com seqüências obtidas no BLAST dos 5 genótipos do GBV-C utilizando o programa Vector NTI Advance sequence analysis (Invitrogen, Bethesda, MD) para construção de árvores filogenéticas.

3.8. Cálculo Amostral

3.8.1. Área endêmica para *L. chagasi*

Baseado em estudo prévio, realizado em áreas no Nordeste do Brasil, que indicou prevalência de 20% entre os doadores, na significância estatística de probabilidade 0,05, na discrepância de 0,1, e com o poder de 0,90, foi calculada uma amostragem de 400 indivíduos, para detectar a prevalência de GBV-C entre indivíduos expostos a *L. chagasi*.

3.8.2. Amostra populacional do Rio Grande do Norte

Com base no Censo Demográfico e em um intervalo de confiança de 95% a amostragem necessária para estimar a freqüência de GBV-C nos municípios de Parnamirim, Serra Negra e Caicó, foi de 100 indivíduos para Parnamirim e 60 para Serra Negra e Caicó.

3.9. Análise Estatística

A prevalência e o intervalo de confiança de 95% foram calculados para todo o grupo examinado. Os testes de Qui-quadrado e ANOVA foram realizados para avaliar as diferenças entre os grupos.

4. RESULTADOS

4.1. POPULAÇÃO DE DOADORES DE SANGUE

4.1.1. Estudos sorológicos da triagem padrão dos doadores de sangue

Foram arrolados 108 voluntarios, dos quais 7 foram reativos para algum marcador sorológico de infecção que os excluíram de serem doadores. Três foram reativos para HCV e 4 reativos para HBC, sendo destes, 1 reativo também para HBSag e 1 reativo para VDRL. Nenhum dos candidatos foi positivo para HIV e HTLV. O ensaio imuno enzimático para detecção de antígenos de *L.chagasi* revelou 5 reativos. (**Tabela 3**)

Tabela 3. Triagem sorológica para doação de sangue.

Marcadores	Reativo
Chagas*	0
HCV*	3
HTLV*	0
HBC*	2
HBC e HBSag*	1
HBSag*	0
VDRL*	0
HBC e VDRL*	1
Leishmania(EB)**	5

* Teste realizado no Hemovida

**Teste realizado no laboratório de imuno-genética do departamento de Bioquímica da UFRN

4.2. FREQUÊNCIA DE GBV-C ENTRE OS DOADORES

4.2.1. Distribuição da infecção por GBV-C por faixa etária

A PCR para detecção do GBV-C foi realizada em 106 indivíduos do total de 108 arrolados. O percentual de positividade foi de 16 %, estando a maioria dos indivíduos na faixa etária de 25 a 40 anos. Essa diferença foi significativa entre as diferentes faixas etárias ($p=0,029$) (**Tabela 4**).

A detecção de anticorpo anti-glicoproteína E2 foi realizada por ELISA, em 108 indivíduos (101 doadores e 7 excluídos por diferentes razões) com positividade em 26 indivíduos (24%). A maioria dos indivíduos positivos para o anticorpo anti-E2 estão na faixa acima de 40 anos, sendo, essa diferença significativa entre as diferentes faixas etárias, ($p=0,012$) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Frequência de GBV-C na população de doadores. Os valores representam o número determinado de indivíduos positivos e negativos para GBV-C e para anticorpo anti-E2.

	Idade*			Total**
	18-24	25-40	>40	
GBV-C RNA ^a				
Negativo	32 (35,9)	38 (42,7)	19 (21,3)	89 (83,9)
Positivo	3 (17,6)	13 (76,4)	1 (5,8)	17 (16,0)
Total	35	51	20	106
Ac E2 ^b				
Negativo	31 (37,8)	41 (50)	10 (12,2)	81 (75,9)
Positivo	5 (19,2)	11 (42,3)	10 (38,4)	26 (24,0)
Total	36	52	20	108

* Números de indivíduos (% de indivíduos Negativo ou Positivo)

** Número (% da população total)

^a Pearson Qui-quadrado $p=0,0361$; M-L Qui-quadrado $p=0,0298$

^b Pearson Qui-quadrado $p=0,0080$; M-L Qui-quadrado $p=0,0121$

A mediana da densidade óptica (DO) do anticorpo anti-glicoproteína E2 nas diferentes faixas etárias, mostrou níveis superiores na faixa etária acima de 40 anos, sendo confirmado pelo teste ANOVA (**Figura 5**) ($p=0,0012$).

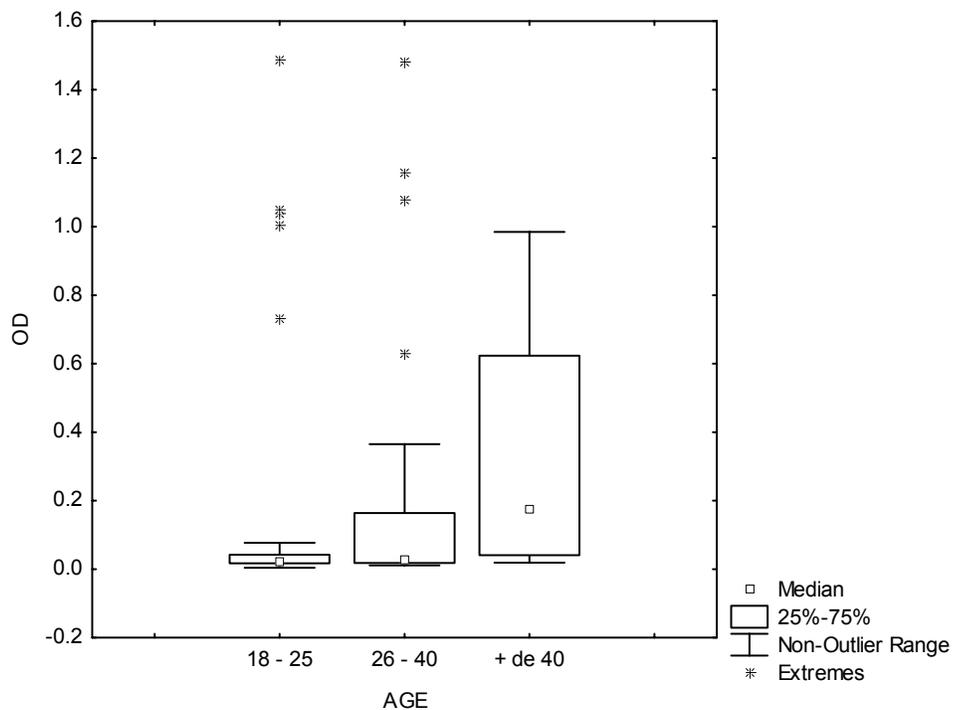


Figura 5. Quantificação de anticorpo anti-glicoproteína E2 na população de doadores, por faixa etária.

4.2.2. Distribuição da infecção por GBV-C com relação ao sexo

A maior porcentagem de casos positivos se encontra no sexo masculino, tanto para o teste de amplificação do vírus (PCR) como para o ensaio imunoenzimático para o anticorpo E2. Contudo, não foi encontrada diferença com relação ao sexo para a viremia ($p=0,134$) ou para o anti-E2 ($p=0,604$) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Frequência de infecção GBV-C e anticorpos E2 pelo sexo entre os doadores.

	Masculino*	Feminino*	Total**
GBV-C RNA ^a			
Negativo	63 (70,8)	26 (29,2)	89 (84)
Positivo	15 (88,2)	2 (11,8)	17 (16)
Total	78	28	106
Ac E2 ^b			
Negativo	61 (74,4)	21 (25,6)	82 (75,9)
Positivo	18 (69,2)	8 (30,8)	26 (24,1)
Total	79	29	108

* Números de indivíduos (% de indivíduos Negativo ou Positivo)

** Número (% da população total)

^a Pearson Qui-quadrado p=0,1348; M-L Qui-quadrado p=0,1094

^b Pearson Qui-quadrado p=0,604; M-L Qui-quadrado p=0,6084

4.3. FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO DE GBV-C ENTRE DIFERENTES ÁREAS DO RN

A viremia determinada por PCR foi realizada em 80 indivíduos do município de Parnamirim e em 60 indivíduos da região do Seridó, sendo 17 de Serra Negra e 43 de Caicó. O percentual de positividade encontrado foi de 7,5 % para a primeira região e de 1,7% para a segunda. (**Tabela 6**).

Tabela 6. Percentual de GBV-C nos municípios de Parnamirim e Serra Negra/Caicó.
GBV-C RNA

	Parnamirim	Serra Negra / Caicó
Negativo	74(92,5)	59(98,3)
Positivo	6 (7,5)	1 (1,7)
Total	80	60

4.4. INFECÇÃO POR GBV-C EM POPULAÇÃO EXPOSTA A *Leishmania chagasi*

4.4.1. Distribuição da infecção por GBV-C por faixa etária

A prevalência de GBV-C encontrada nessa população foi de 6,2%. A faixa de 11 - 17 e 18-40 anos são as que apresentam maior número de casos positivos (n=10, cada). Contudo, a análise estatística, através do teste de qui-quadrado, demonstrou não haver diferença significativa quanto ao percentual de positividade do RNA do GBV-C, entre as faixas etárias (p=0,255) (**Tabela 7**).

Das 501 amostras arroladas, 438 foram testadas para anticorpo E2. Verificou-se uma prevalência de 12,10% (53 de 438) e a maioria dos casos positivos encontrava-se na faixa etária de 18 a 40. O teste de qui-quadrado, associando os casos positivos com as faixas etárias, indicou existir associação significativa entre a idade e anticorpo E2 (p <0,0001) (**Tabela 7**).

Tabela 7. População exposta a *Leishmania chagasi*: freqüência de GBV-C e anti-E2 por idade.

	Idade*				Total**
GBV-C RNA ^a	<10	11-17	18-40	>40	
Negativo	166 (35,3)	87 (18,5)	164 (34,9)	53 (11,3)	470(93,8)
Positivo	7 (22,6)	10 (32,3)	10 (32,2)	4 (12,9)	31 (6,2)
Total	173	97	173	57	501
Ac E2 ^b					
Negativo	151 (39,2)	81 (21,1)	117 (30,4)	36 (9,3)	385 (87,9)
Positivo	3 (5,7)	7 (13,2)	32 (60,4)	11 (20,7)	53 (12,1)
Total	154	88	149	47	438

* Números de indivíduos (% de indivíduos Negativo ou Positivo) ** Número (% da população total)

^a Pearson Qui-quadrado p=0,2294; M-L Qui-quadrado p=0,2557 ^b Pearson Qui-quadrado p<0,0001; M-L Qui-quadrado p<0,0001

Ao mesmo tempo, aplicando-se o teste de ANOVA aos resultados do ELISA para anticorpo E2, observou-se que a mediana de DO aumenta com a idade (p < 0.0001) (**Figura 6**).

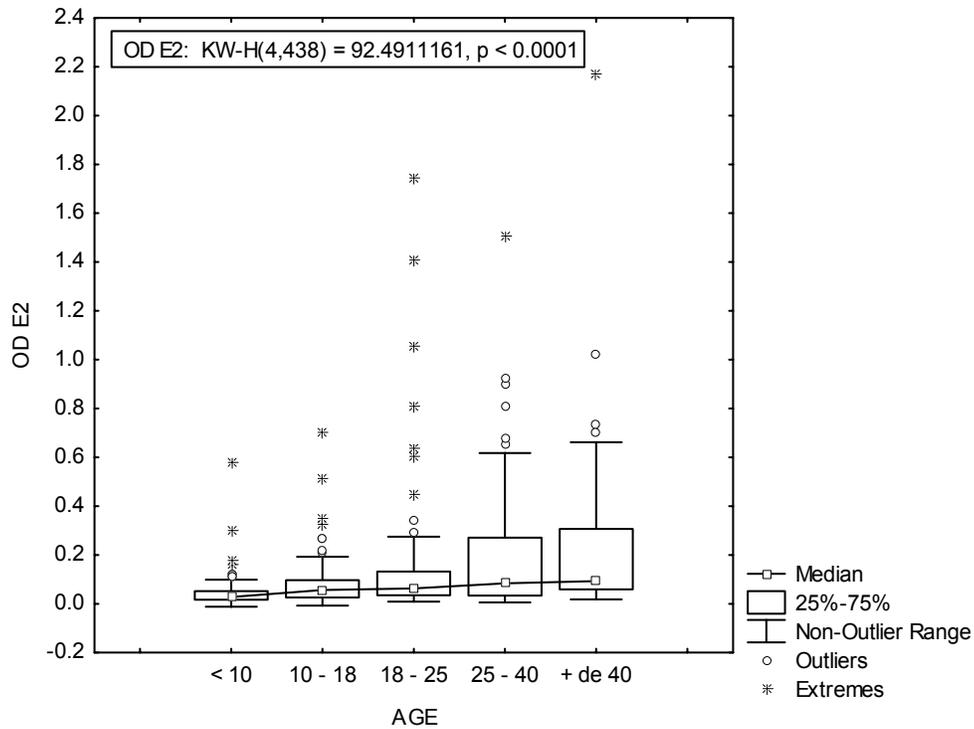


Figura 6. Quantificação de anticorpo anti-glicoproteína E2 na população exposta a *L. chagasi*, por faixa etária.

4.4.2. Distribuição da infecção por GBV-C com relação ao sexo

A maioria dos casos positivos encontra-se no sexo masculino, tanto para o teste de amplificação do vírus (PCR), como para o ensaio imunoenzimático para anti E2. Contudo não foi demonstrada associação significativa do sexo com a viremia ($p=0,6693$), nem com o anti-E2 ($p=0,5765$) (**Tabela 8**).

Tabela 8. População exposta à *Leishmania chagasi*: frequência da infecção GBV-C pelo sexo.

	Masculino*	Feminino*	Total**
GBV-C RNA ^a			
Negativo	291 (61,9)	179 (38,1)	470 (93,8)
Positivo	18 (58,1)	13 (41,9)	31 (6,2)
Total	309	192	501
Ac E2 ^b			
Negativo	239 (62,1)	146 (37,9)	385 (87,9)
Positivo	35 (66)	18 (34)	53 (12,1)
Total	274	164	438

* Números de indivíduos (% de indivíduos Negativo ou Positivo) ** Número (% da população total) ^a Pearson Qui-quadrado p=0,6693; M-L Qui-quadrado p=0,6708; ^b Pearson Qui-quadrado p=0,5765; M-L Qui-quadrado p=0,5743

4.5. INFECÇÃO POR GBV-C EM POPULAÇÃO EXPOSTA A *Leishmania chagasi*, CONSIDERANDO OS DIFERENTES FENÓTIPOS.

Para os indivíduos residentes em área endêmica, não houve associação dos fenótipos (LV, DTH+, DTH-) com a viremia (p= 0,916), nem com o anti-E2 (p= 0,094). (**Tabela 9**).

Tabela 9. Infecção de GBV-C em população exposta à *Leishmania chagasi*, considerando a resposta à infecção por *Leishmania chagasi*.

	Fenótipo*			Total**
GBV-C RNA ^a	LV	DTH+	DTH-	
Negativo	210 (44,7)	230 (48,9)	30 (6,4)	470(93,81)
Positivo	15 (48,4)	14 (45,2)	2 (6,4)	31 (6,19)
Total	225	244	32	501
Ac E2 ^b				
Negativo	172 (44,7)	188 (48,8)	25 (6,5)	385 (87,90)
Positivo	32 (60,4)	19 (35,8)	2 (3,8)	53 (12,10)
Total	204	207	27	438

* Números de indivíduos (% de indivíduos Negativo ou Positivo)

** Número (% da população total)

^a Pearson Qui-quadrado p=0,916; M-L Qui-quadrado p=0,916

^b Pearson Qui-quadrado p=0,096; M-L Qui-quadrado p=0,094

Com o objetivo de avaliar a co-infecção GBV-C/leishmania, pacientes com fenótipo LV foram subdivididos de acordo com a data de coleta, em relação ao tempo que adoeceram, em LV-agudo (n = 383) (coleta até 1 mês após a fase aguda da doença), sendo excluídos da análise os indivíduos coletados após 1 mês da doença (denominado, LV- remoto) e os indivíduos DTH-.

A avaliação do RNA do GBV-C não demonstrou associação significativa entre os casos positivos e os fenótipos (p= 0,994) (**Tabela 10**). Entretanto, a análise do ELISA para anti-E2 mostrou associação significativa com o subfenótipo LV-agudo, indicando que os indivíduos anti - E2 positivo teriam maior risco de desenvolver LV (**Tabela 10**) (p=0,0014).

Tabela 10. Infecção por GBV-C em população exposta a *Leishmania chagasi*, considerando a resposta à infecção por *Leishmania chagasi*. Os indivíduos DTH- e LV-remoto não foram incluídos nesta análise.

GBV-C RNA ^a	Fenótipo*		Total**
	LV-Agudo ⁺	DTH+	
Negativo	131 (36,29)	230 (63,71)	361 (94,26)
Positivo	8 (36,36)	14 (63,64)	22 (5,74)
Total	139	244	383
Ac E2 ^b			
Negativo	105 (35,84)	188 (64,16)	293 (85,92)
Positivo	29 (60,42)	19 (39,58)	48 (14,08)
Total	134	207	341

* Números de indivíduos (% de indivíduos Negativo ou Positivo)

** Número (% da população total)

+LV- agudo sangue coletado até 1 mês após a infecção por LV

^a Pearson Qui-quadrado p=0.9942; M-L Qui-quadrado p=0.9942

^b Pearson Qui-quadrado p=0.0012; M-L Qui-quadrado p=0.0014

4.5.1. Análise quantitativa de Montenegro

4.5.1.1. Resposta imune celular em relação à viremia de GBV-C

Comparando quantitativamente a mediana de endureção do teste de Montenegro entre os casos positivos e negativos para RNA de GBV-C observou-se

uma diferença. No grupo RNA positivo, a enduração foi 8,46 mm, já a do grupo negativo, de foi 6,92 mm (**Figura 7**). Contudo essa diferença não foi significativa ($p=0,269$). Do total de 500 indivíduos arrolados, 40 foram excluídos por falta do dado do teste de Montenegro.

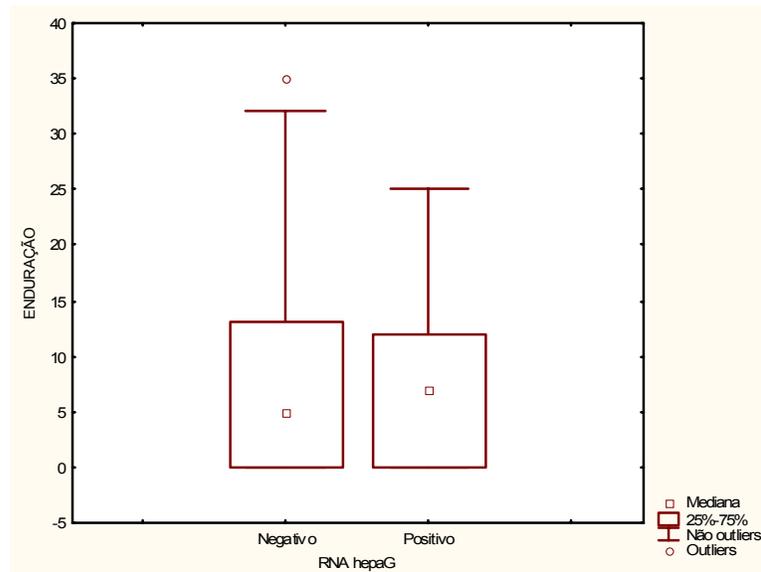


Figura 7. Avaliação de resposta imune celular na população exposta à *L. chagasi*, pela presença de viremia ($p= 0,269$).

4.5.1.2. Resposta DTH em relação anticorpo anti-glicoproteína E2

A análise quantitativa do teste de Montenegro foi realizada entre os grupos anticorpo anti-glicoproteína E2 positivos e negativos. Observou-se que a enduração é maior no grupo anti E2 negativo 7,12 mm que no grupo anti E2 positivo 4,55 mm (**Figura 8**). A análise estatística pelo teste de ANOVA demonstrou que a média do grupo negativo é significativamente superior ao do grupo positivo ($p=0,0023$).

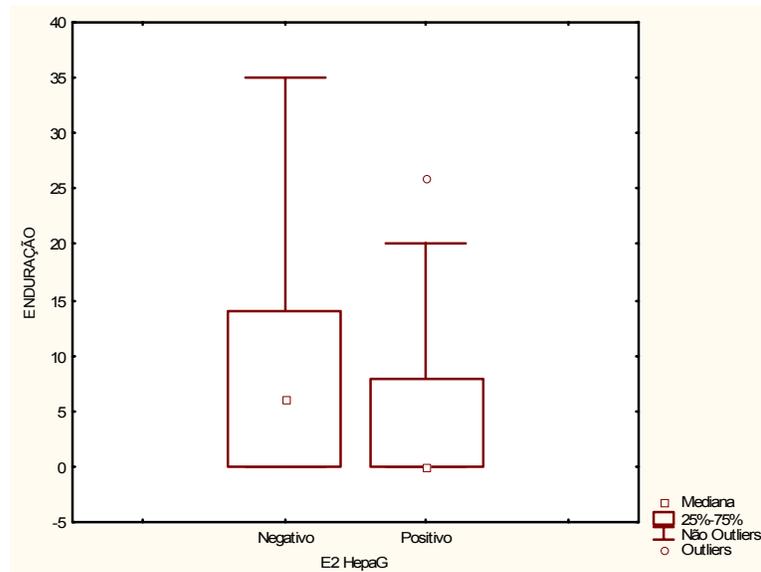


Figura 8. Avaliação da resposta imune celular na população exposta à *L. chagasi*, pela presença de anti-E2 ($p= 0,0023$)

4.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DE MONTENEGRO X RNA DE GBV-C EM POPULAÇÃO SELECIONADA ALEATORIAMENTE

A análise quantitativa do teste de Montenegro foi realizada entre os grupos positivos e negativos para RNA de GBV-C, na população de Parnamirim, selecionada aleatoriamente. Comparando-se os valores da enduração com a presença ou não do RNA de GBV-C, observou-se que a enduração é maior no grupo RNA positivo (6,83 mm) que no negativo (3,36 mm). A análise estatística pelo teste ANOVA demonstrou que essa diferença foi significativa ($p=0,0054$). (**Figura 9**)

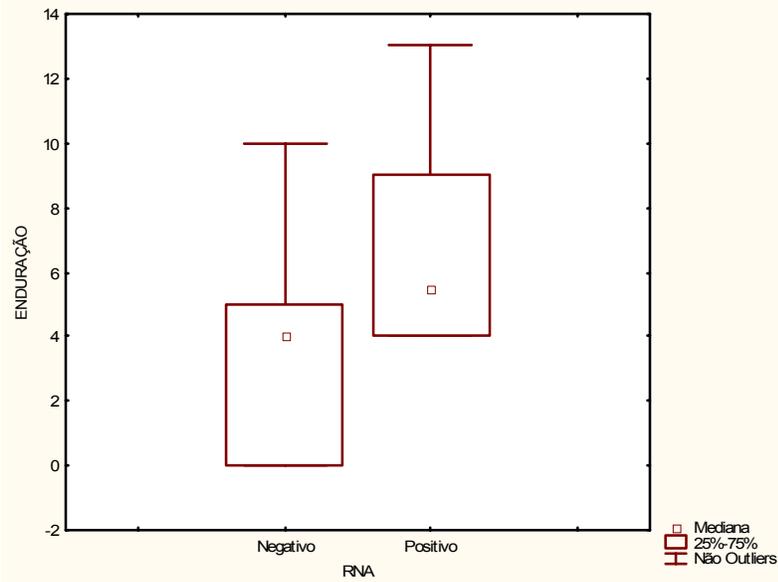


Figura 9. Avaliação da resposta imune celular na população residente em Parnamirim, pela presença da viremia ($p= 0,0053$).

4.7. CARGA VIRAL

A avaliação da carga viral, determinada por PCR em tempo real, foi realizada em 19 dos indivíduos infectados, utilizando oligonucleotídeos para 4 regiões diferentes do vírus (5'UTR, E2, NS3 e NS5A). Observou-se que a maior carga viral ($7,66E+07$) e o menor valor de Ct (22,94) foram oriundos da amostra PAR4; e o menor número de cópias do vírus ($5,33E+03$), e o maior valor de Ct (36,5) foi da amostra AE_RN7 (**Tabela 11**) e sete amostras não tiveram sucesso na amplificação. Os valores padrões de Ct foram: 17,91; 20,94; 24,11; 27,71; 29,3 e 35,01.

Tabela 11. Carga viral de GBV-V. Os valores representam o número de cópias por ml do vírus dos 19 indivíduos infectados.

	Amostras	PCR em tempo real	No. de copias /ml
		Ct	
1	NL_D1	27,95	2,23E+06
2	NL_D2	23,9	3,87E+07
3	NL_D3	indeterminado	indeterminado
4	NL_D4	indeterminado	indeterminado
5	NL_D5	indeterminado	indeterminado
6	PAR1	26,49	6,27E+06
7	PAR2	25,04	1,74E+07
8	PAR3	25,08	1,69E+07
9	PAR4	22,94	7,66E+07
10	PAR5	23,88	3,94E+07
11	CAI1	24,29	2,96E+07
12	AE_RN1	24,67	2,26E+07
13	AE_RN2	34,05	3,01E+04
14	AE_RN3	indeterminado	indeterminado
15	AE_RN4	32,47	9,19E+04
16	AE_RN5	indeterminado	indeterminado
17	AE_RN6	indeterminado	indeterminado
18	AE_RN7	36,5	5,33E+03
19	AE_RN8	indeterminado	indeterminado

Ct = número de ciclos necessário para detectar a reação de amplificação. **NL_D**: Amostras de doadores residentes em Natal/RN, **PAR**: Indivíduos residentes em Parnamirim/RN, **CAI**: Indivíduos residentes em Caicó/RN e **AE_RN**: Área endêmica no RN.

4.8. ANÁLISE DO GENÓTIPO

O RNA viral isolado de 19 indivíduos infectados (Tabela 12) foram testados para amplificação de 4 regiões do genoma do GBV-C. Porém, cinco não amplificaram para nenhuma das regiões (3, 4, 5, 14 e 17), e outros cinco (13, 15, 16, 18 e 19) não amplificaram apenas a região E2.

Tabela 12. Amostras amplificadas para determinar o genótipo. O sinal de (+) indica que a região do vírus foi amplificada, o sinal de (-) que não foi possível amplificar a região.

Amostras		Regiões do genoma do GBV-C			
		5'nt	E2	NS3	NS5A
1	NL_D1	+	+	+	+
2	NL_D2	+	+	+	+
3	NL_D3	-	-	-	-
4	NL_D4	-	-	-	-
5	NL_D5	-	-	-	-
6	PAR1	+	+	+	+
7	PAR2	+	+	+	+
8	PAR3	+	+	+	+
9	PAR4	+	+	+	+
10	PAR5	+	+	+	+
11	CAI1	+	+	+	+
12	AE_RN1	+	+	+	+
13	AE_RN2	+	-	+	+
14	AE_RN3	-	-	-	-
15	AE_RN4	+	-	+	+
16	AE_RN5	+	-	+	+
17	AE_RN6	-	-	-	-
18	AE_RN7	+	-	+	+
19	AE_RN8	+	-	+	+

NL_D: Amostras de doadores residentes em Natal/RN, **PAR:** Indivíduos residentes em Parnamirim/RN, **CAI:** Indivíduos residentes em Caicó/RN e **AE_RN:** Área endêmica no RN.

O alinhamento das 14 amostras amplificadas, com seqüências completas dos 5 genótipos do GBV-C, no Vector NTI Advance sequence analysis (Invitrogen, Bethesda, MD), revelou que, para as 4 regiões analisadas, todas as amostras pertenciam ao genótipo 2 (**Figura 10**).

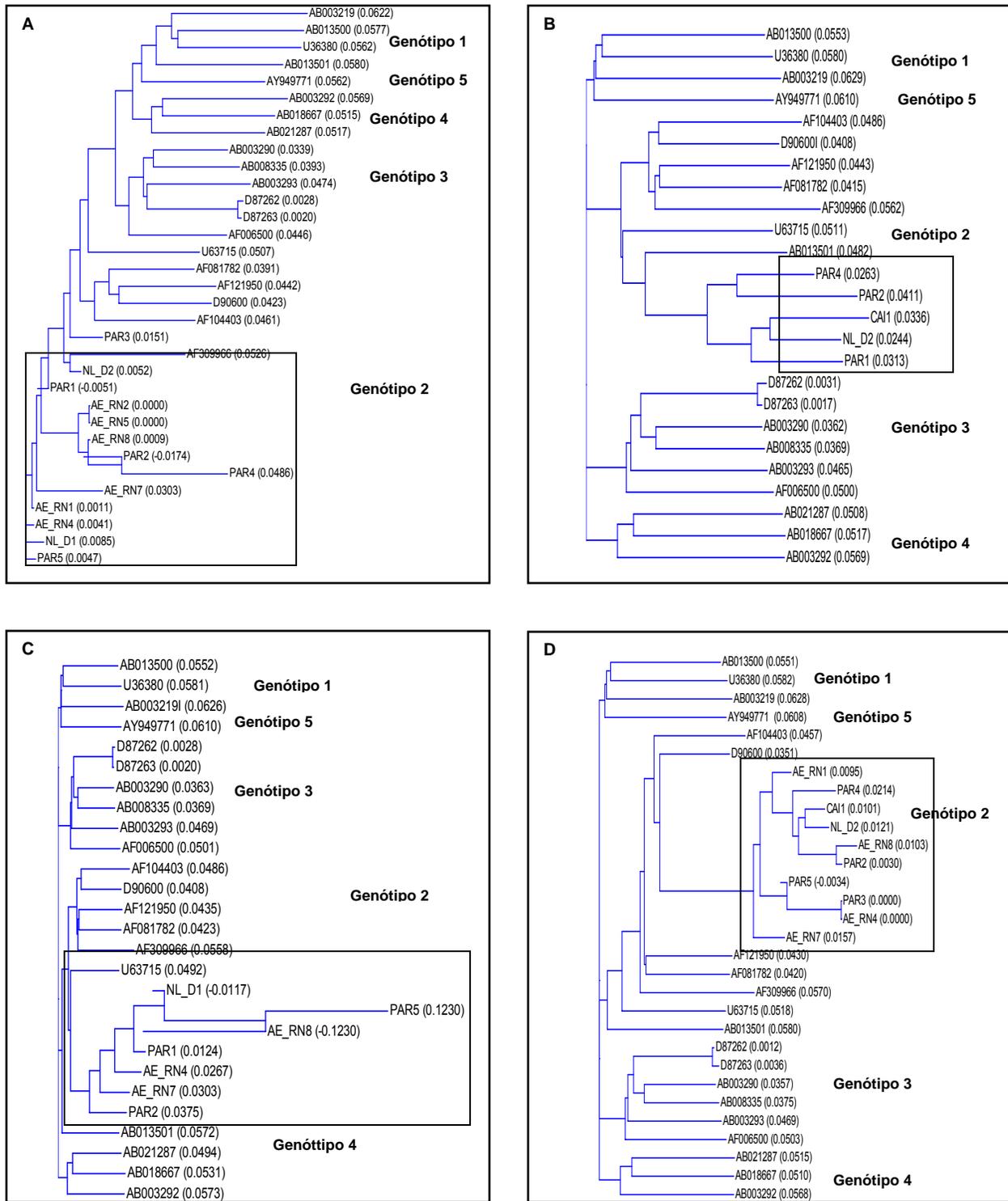


Figura 10. Análise filogenética das amostras do RN com as seqüências completas de GBV-C. A) Região 5' –UTR; B) Região E2; C) Região NS3; D) Região NS5A. **NL_D:** Amostras de doadores residentes em Natal/RN, **PAR:** Indivíduos residentes em Parnamirim/RN, **CAI:** Indivíduos residentes em Caicó/RN e **AE_RN:** Área endêmica no RN. O valor entre parênteses representa o grau de divergência entre as amostras. As amostras estão indicadas com um quadrado. A relação das seqüências do genoma completo está no apêndice C.

5. DISCUSSÃO

O GBV-C é um flavivírus que, inicialmente, foi relacionado com hepatite crônica, contudo estudos posteriores demonstraram não haver relação com doença, e que seu tropismo parece ser maior por linfócitos do que por células hepáticas (Laskus et al., 1998). Estudos em indivíduos co-infectados com GBV-C e HIV mostraram associação do GBV-C com um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2. Esses indivíduos mantiveram uma resposta imune com produção de citocinas IL-2 e IL-12 e o número de células T CD4, resultando no aumento da sobrevida (Nunnari et al., 2003). Esse efeito indutor de resposta Th1, porém, parece ocorrer com a manutenção da viremia do GBV-C (Williams et al., 2004), que após sua depuração, o indivíduo infectado produz anticorpo anti-glicoproteína E2 do vírus (Tacke et al., 1997).

A leishmaniose visceral é uma doença crônica grave e potencialmente fatal quando não se institui o tratamento adequado. Inúmeros trabalhos assinalam que citocinas ativadoras e produzidas por células Th1 (IL-12 e INF- γ), são responsáveis pela resistência e cura à infecção por leishmania (Carvalho et al., 1992). Por outro lado, citocinas do perfil TH2 estão relacionadas à susceptibilidade, à infecção e evolução para doença (Reed, 1996).

A resposta do hospedeiro a patógenos é variável com a carga parasitária e a genética do hospedeiro, bem como com possíveis co-infecções. Estudos de co-infecção do GBV-C com HIV demonstraram provável efeito indutor de resposta TH1 pelo GBV-C. Conhecendo que a resolução da infecção por leishmania é

dependente dessa resposta, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o papel do GBV-C, como indutor de resposta Th1, em indivíduos vivendo em área endêmica para leishmaniose no RN.

Para determinar a prevalência de infecção por GBV-C no Estado, foram coletadas amostras de doadores de sangue em Natal; de indivíduos residentes em área endêmica para *L. chagasi* no RN; e de indivíduos residentes nos municípios de Parnamirim, Serra Negra e Caicó. O percentual de viremia de GBV-C em doadores de sangue foi superior àquele observado em outras áreas urbanas do Brasil (Levi et al., 2003), porém semelhante aos resultados encontrados em outros países subdesenvolvidos como Bolívia, por exemplo (Konomi et al., 1999).

Avaliando-se por idade, observa-se que a faixa etária entre 25 a 40 anos parece ser mais susceptível à infecção pelo GBV-C, provavelmente, devido ao aumento de exposição ao vírus por contato sexual. Os dados de Lampe e colaboradores, 1998, demonstraram correlação da prevalência do GBV-C com a idade dos indivíduos, sendo a prevalência menor na infância e aumentando na fase adulta (Lampe et al., 1998).

Para o anticorpo anti-glicoproteína E2 (anti-E2), a prevalência foi de 24% com aumento significativo de casos anti-E2 positivo na faixa acima de 40 anos, mostrando a contínua exposição viral e o efeito cumulativo da infecção. Resultado semelhante foi observado para HCV no estudo de Takarashi, 1996 no qual o percentual de anticorpo anti-HCV foi maior acima dos 40 anos (Ishibashi et al., 1996). Adicionalmente, constatamos que a média de DO para o anti-E2 foi significativamente maior nos indivíduos acima de 40 anos, indicando um possível

efeito cumulativo com a idade. Esse efeito poderia ser explicado pelos prováveis múltiplos contatos da população com o vírus ao longo dos anos.

Ainda na população de doadores, não houve diferença significativa entre os sexos, tanto no que se refere à presença do vírus como ao anticorpo anti-E2. Essa relação, também, não foi encontrada em estudo de prevalência do GBV-C, em doadores de sangue na cidade de São Paulo (Levi et al., 2003; Ribeiro-dos-Santos et al., 2002), indicando que o gênero pode não ser um fator determinante para infecção por GBV-C.

Nos municípios estudados, a prevalência de GBV-C foi menor em Serra Negra - Caicó (1,6%) e Parnamirim (7,5%) do que nos doadores residentes em Natal (16%), sugerindo relação da prevalência de GBV-C com o desenvolvimento urbano. Ratificando com o estudo realizado por Roth e colaboradores (Roth et al., 1997), na Alemanha, no qual a prevalência de GBV-C em doadores de área urbana (2,18%) foi significativamente maior que em doadores de área rural (0,79%). No entanto, para determinar essa relação, nos municípios estudados, seria necessário estudo populacional mais específico.

Na população exposta a *L.chagasi* a prevalência de GBV-C, de 6,2%, foi inferior à encontrada na população de doadores. Essa diminuição poderia ser explicada pela expressão de resposta Th1 nesses indivíduos, resultando em uma depuração mais rápida do vírus. Em contraste, alta prevalência de GBV-C foi observada em área endêmica para esquistossomose, possivelmente devido ao desenvolvimento da resposta Th2, protetora contra essa parasitose, promovendo um retardo na depuração do GBV-C (Gallian et al., 1998) .

O estudo de anti E2 na população exposta à *L. chagasi* demonstrou uma relação do desse com a idade, na faixa etária 18-40 anos encontra-se a maior proporção anti-E2. O teste de ANOVA aplicado às medianas de DO para anti- E2, segregadas por faixas etárias, revelou que a média de anti-E2 aumentava com a idade. Efeito semelhante ao encontrado nos doadores.

Nessa mesma população, não foi observada relação entre as freqüências de RNA do GBV-C e de anticorpo anti- E2 com os fenótipos (LV e DTH+). Isso poderia dever-se ao fato de que a maioria dos casos de LV se encontra abaixo de 10 anos e a freqüência de infecção por GBV-C, como foi visto na população de doadores, aumenta na fase adulta (25-40 anos). Outra possibilidade é que a infecção por GBV-C teria ocorrido posterior à infecção por *L. chagasi*, não tendo assim papel no desenvolvimento da infecção. Na co-infecção GBV-C/HIV, a sobrevida é mais consistentemente demonstrada quando a infecção por GBV-C precede a do HIV (Xiang et al., 2001).

Subgrupando o fenótipo LV, e levando em consideração a data de arrolamento, após a fase aguda da doença, para diminuir as chances de que durante a infecção por *L. chagasi* o indivíduo não estivesse também infectado por GBV-C, observou-se, então, associação significativa entre o sub-fenótipos agudo, arrolado a pelo menos 1 mês da infecção aguda, com o anticorpo anti-E2, indicando que os indivíduos anticorpo E2 positivo teriam mais chances de desenvolver leishmaniose visceral.

A análise do teste de Montenegro na população exposta à *L. chagasi* verificou-se um aumento da endureção nos indivíduos positivos para RNA do GBV-

C, porém essa tendência não foi significativa. Este fato pode ter sido decorrente da forma como a população denominada DTH+ foi selecionada. Os indivíduos pertencentes a esse grupo foram agrupados baseados nos resultados do teste de Montenegro com endurecimento \geq ou $=$ a 5mm. No entanto, quando aleatoriamente foi examinada a resposta DTH quantitativa, naqueles indivíduos oriundos de Parnamirim, observou-se uma frequência significativa entre a resposta DTH e a presença ou não da viremia de GBV-C.

Para determinar a carga viral de GBV-C, o soro de 19 indivíduos infectados foi testado, por PCR em tempo real. Foi observado que a maior carga viral ($7,66E+07$) foi oriunda da amostra PAR4. O valor de Ct de 22,94, demonstrou um grau de pureza relativamente bom da amostra, validando o resultado.

A análise filogenética das 4 regiões (5'-UTR, E2, NS3 e NS5A) do genoma do GBV-C, isolado de 14 indivíduos infectados, mostrou que todas as amostras pertenciam ao genótipo 2. Gallian e colaboradores, 1998, em estudo com amostras de indivíduos residentes em área rural da Bahia observaram que 82,9% das suas amostras eram do tipo 2 e 17,1% do tipo 1 (Gallian et al., 1998). Ribeiro dos Santos e colaboradores, 2003, estudando a região 5'-UTR do genoma do GBV-C em isolados da população de São Paulo, observaram que a distribuição de GBV-C foi de 91,7 % do genótipo 2 e 8,3% do tipo 1 (Ribeiro-dos-Santos et al., 2002). Diferente dos dois estudos não encontramos o genótipo 1, provavelmente devido a sua baixa prevalência, sendo necessária, assim, uma amostragem maior. A prevalência do genótipo 1 (predominante na África) e 2 (predominante na Europa e América do Norte) no Brasil estaria consistente com a origem étnica da população

brasileira, resultante da migração de europeus e africanos desde o início da sua colonização.

Apesar de o genótipo 2 ser o mais prevalente no Brasil, pouco se sabe sobre o papel biológico dos genótipos do GBV-C. Um dos poucos estudos que relacionou o genótipo com algum fenótipo foi o de Muerhoff e colaboradores em pacientes co-infectados com GBV-C e HIV. Eles demonstraram que, nos indivíduos infectados com o genótipo 2a do GBV-C, a contagem de células CD4 tendia a ser mais baixa, comparada com aqueles infectados com genótipo 2b (Muerhoff; Tillmann; Manns; Dawson ; Desai, 2003).

Por fim, os dados deste estudo sugerem que a idade é um fator de risco para infecção por GBV-C e que tanto a viremia como a presença de anti- E2 pode persistir por anos no hospedeiro. O estudo sugere ainda, que a presença do RNA de GBV-C, possivelmente, promove maior enduração no teste de Montenegro, quando demonstrado que o indivíduo, ao perder o vírus e se tornar anti-E2 positivo, tem risco aumentado de desenvolver LV e menor média de enduração do teste de Montenegro. Contudo, não foi possível demonstrar que a viremia de GBV-C é maior nos indivíduos DTH+ (indivíduos que resolvem à infecção por desenvolverem resposta Th1), provavelmente, por se tratar de uma relação que envolva fatores mais complexos, como por exemplo, a idade, necessitando de estudos mais detalhados para evidenciar a relação de causalidade do GBV-C com a proteção contra leishmaniose visceral.

Adicionalmente, foi importante demonstrar que o genótipo 2 é o mais prevalente em nossa população, o que permitirá a realização de outros projetos

envolvendo genética populacional que respondam a questões pertinentes não somente a leishmaniose, mas também a outras doenças infecciosas.

6. CONCLUSÃO

1. Infecção por GBV-C no RN é maior na faixa de 24 a 40 anos ($p=0,0029$)
2. A idade parece ser um fator de risco para infecção por GBV-C.
3. A genotipagem dos indivíduos para GBV-C identificou apenas o genótipo 2 .
4. Indivíduos anticorpo E2 positivo parecem ter mais risco de desenvolver LV.
5. A presença do GBV-C parece conferir proteção contra a infecção por leishmania.

REFERÊNCIAS

1. ALEIXO, J. A.; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; FERNANDES, M. Z.; RAMOS, A. M.; WILSON, M. E. et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 100, n. 1, p. 79-82, 2006.
2. ALTER, H. J. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. **N.Engl.J.Med.**, v. 334, n. 23, p. 1536-1537, 1996.
3. ALTER, H. J.; NAKATSUJI, Y.; MELPOLDER, J.; WAGES, J.; WESLEY, R.; SHIH, J. W. et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. **N.Engl.J.Med.**, v. 336, n. 11, p. 747-754, 1997.
4. BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J.Infect.Dis.**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.
5. BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, J. G.; MOMEN, H.; MAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE, J. A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease 1. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
6. BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; REED, S. G. et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 67, n. 4, p. 344-348, 2002.
7. BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J.Immunol.**, v. 155, n. 6, p. 3102-3111, 1995.
8. BRITTINGHAM, A. ; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitol.Today**, v. 12, n. 11, p. 444-447, 1996.

9. BURNS, J. M., Jr.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis
1. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.
10. CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARO, R.; JOHNSON, W. D., Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J.Clin.Invest**, v. 83, n. 3, p. 860-864, 1989.
11. CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **J.Infect.Dis.**, v. 165, n. 3, p. 535-540, 1992.
12. CHULAY, J. D. ; BRYCESON, A. D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 475-479, 1983.
13. DAL, M. G.; D'AGARO, P.; BIAGI, C.; PETRONIO, F.; COMAR, M.; CAMPELLO, C. [Vertical transmission of HGV and outcome of the infected babies]. **Ann.Ig**, v. 16, n. 1-2, p. 109-114, 2004.
14. DE ANDRADE, T. M.; TEIXEIRA, R.; DE ANDRADE, J. A.; PEREIRA, C.; DE CARVALHO FILHO, E. M. [Hypersensitivity of delayed type in visceral leishmaniasis]. **Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo**, v. 24, n. 5, p. 298-302, 1982.
15. DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin.Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.
16. EVANS, T. G.; KRUG, E. C.; WILSON, M. E.; VASCONCELOS, A. W.; DE ALENCAR, J. E.; PEARSON, R. D. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 2, p. 157-166, 1989.
17. FOGEDA, M.; NAVAS, S.; MARTIN, J.; CASQUEIRO, M.; RODRIGUEZ, E.; AROCENA, C. et al. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by GB virus C/Hepatitis G virus
2. **J.Virol.**, v. 73, n. 5, p. 4052-4061, 1999.

18. FREY, S. E.; HOMAN, S. M.; SOKOL-ANDERSON, M.; CAYCO, M. T.; CORTORREAL, P.; MUSIAL, C. E. et al. Evidence for probable sexual transmission of the hepatitis g virus. **Clin.Infect.Dis.**, v. 34, n. 8, p. 1033-1038, 2002.
19. GALLIAN, P.; RODRIGUES, V.; CANTALOUBE, J. F.; DESSEIN, H.; DE, M. P.; DESSEIN, A. J. et al. High prevalence of GB-C/hepatitis G virus in a Brazilian population with helminth infection. **J.Med.Virol.**, v. 56, n. 4, p. 310-315, 1998.
20. GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens. **J.Leukoc.Biol.**, v. 50, n. 1, p. 93-103, 1991.
21. HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; MUTHA, S. S.; LOCKSLEY, R. M. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, v. 88, n. 16, p. 7011-7015, 1991.
22. ISHIBASHI, M.; SHINZAWA, H.; KUBOKI, M.; TSUCHIDA, H.; TAKAHASHI, T. Prevalence of inhabitants with anti-hepatitis C virus antibody in an area following an acute hepatitis C epidemic: age-and area-related features. **J.Epidemiol.**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 1996.
23. JERONIMO, S. M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; CHENG, C.; MONTEIRO, G. R.; NASCIMENTO, E. T. et al. An emerging peri-urban pattern of infection with Leishmania chagasi, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand.J.Infect.Dis.**, v. 36, n. 6-7, p. 443-449, 2004.
24. KONOMI, N.; MIYOSHI, C.; LA FUENTE, Z. C.; LI, T. C.; ARAKAWA, Y.; ABE, K. Epidemiology of hepatitis B, C, E, and G virus infections and molecular analysis of hepatitis G virus isolates in Bolivia
4. **J.Clin.Microbiol.**, v. 37, n. 10, p. 3291-3295, 1999.
25. KUMAR, R.; PAI, K.; SUNDAR, S. Reactive oxygen intermediates, nitrite and IFN-gamma in Indian visceral leishmaniasis. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 124, n. 2, p. 262-265, 2001.
26. LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of Leishmania (Leishmania) chagasi. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 517-1987.

27. LAMPE, E.; DE OLIVEIRA, J. M.; PEREIRA, J. L.; SABACK, F. L.; YOSHIDA, C. F.; NIEL, C. Hepatitis G virus (GBV-C) infection among Brazilian patients with chronic liver disease and blood donors. **Clin.Diagn.Virol.**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 1998.
28. LAMPE, E.; SABACK, F. L.; VIAZOV, S.; ROGGENDORF, M.; NIEL, C. Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/hepatitis G virus in Brazil 3. **J.Med.Virol.**, v. 56, n. 1, p. 39-43, 1998.
29. LASKUS, T.; RADKOWSKI, M.; WANG, L. F.; VARGAS, H.; RAKELA, J. Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. **J.Virol.**, v. 72, n. 4, p. 3072-3075, 1998.
30. LEARY, T. P.; MUERHOFF, A. S.; SIMONS, J. N.; PILOT-MATIAS, T. J.; ERKER, J. C.; CHALMERS, M. L. et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. **J.Med.Virol.**, v. 48, n. 1, p. 60-67, 1996.
31. LEFRERE, J. J.; LOISEAU, P.; MAURY, J.; LASSERRE, J.; MARIOTTI, M.; RAVERA, N. et al. Natural history of GBV-C/hepatitis G virus infection through the follow-up of GBV-C/hepatitis G virus-infected blood donors and recipients studied by RNA polymerase chain reaction and anti-E2 serology. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3776-3780, 1997.
32. LEVI, J. E.; CONTRI, D. G.; LIMA, L. P.; TAKAOKA, D. T.; GARRINI, R. H.; SANTOS, W. et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. **Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo**, v. 45, n. 2, p. 75-78, 2003.
33. LI, G.; MA, H. H.; LAU, G. K.; LEUNG, Y. K.; YAO, C. L.; CHONG, Y. T. et al. Prevalence of hepatitis G virus infection and homology of different viral strains in Southern China. **World J.Gastroenterol.**, v. 8, n. 6, p. 1081-1087, 2002.
34. LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine 10. **J.Immunol.**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990.
35. LINNEN, J.; WAGES, J., Jr.; ZHANG-KECK, Z. Y.; FRY, K. E.; KRAWCZYNSKI, K. Z.; ALTER, H. et al. Molecular cloning and disease

association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. **Science**, v. 271, n. 5248, p. 505-508, 1996.

36. MEBRAHTU, Y. B.; VAN, E. G.; GUIZANI, I.; LAWYER, P. G.; PAMBA, H.; KOECH, D. et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* s.l. in Kenya. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.**, v. 87, n. 5, p. 598-601, 1993.
37. MELBY, P. C.; TABARES, A.; RESTREPO, B. I.; CARDONA, A. E.; MCGUFF, H. S.; TEALE, J. M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Exp.Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 17-25, 2001.
38. MOSMANN, T. R. ; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties
2. **Annu.Rev.Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.
39. MUERHOFF, A. S.; TILLMANN, H. L.; MANNS, M. P.; DAWSON, G. J.; DESAI, S. M. GB virus C genotype determination in GB virus-C/HIV co-infected individuals
3. **J.Med.Virol.**, v. 70, n. 1, p. 141-149, 2003.
40. NUNNARI, G.; NIGRO, L.; PALERMO, F.; ATTANASIO, M.; BERGER, A.; DOERR, H. W. et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile.
Ann.Intern.Med., v. 139, n. 1, p. 26-30, 2003.
41. OLIVEIRA, L. A.; MARTINS, R. M.; CARNEIRO, M. A.; TELES, S. A.; SILVA, S. A.; CARDOSO, D. D. et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil
2. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 953-957, 2002.
42. OSHITA, M.; HAYASHI, N.; MITA, E.; IIO, S.; HIRAMATSU, N.; HIJIOKA, T. et al. GBV-C/HGV infection in chronic hepatitis C patients: its effect on clinical features and interferon therapy. **J.Med.Virol.**, v. 55, n. 2, p. 98-102, 1998.
43. PEARSON, R. D. ; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis.
Clin.Infect.Dis., v. 22, n. 1, p. 1-13, 1996.

44. POLGREEN, P. M.; XIANG, J.; CHANG, Q.; STAPLETON, J. T. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals
2. **Microbes.Infect.**, v. 5, n. 13, p. 1255-1261, 2003.
45. PONCE, C.; PONCE, E.; MORRISON, A.; CRUZ, A.; KREUTZER, R.; MAHON-PRATT, D. et al. Leishmania donovani chagasi: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras
1. **Lancet**, v. 337, n. 8733, p. 67-70, 1991.
46. REED, K. E. ; RICE, C. M. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. **Curr.Top.Microbiol.Immunol.**, v. 242, p. 55-84, 2000.
47. REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. **Clin.Dermatol.**, v. 14, n. 5, p. 471-478, 1996.
48. REED, S. G.; BADARO, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E. M.; LORENCO, R.; LISBOA, A. et al. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am.J.Trop.Med.Hyg.**, v. 35, n. 1, p. 79-85, 1986.
49. RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; NISHIYA, A. S.; NASCIMENTO, C. M.; BASSIT, L.; CHAMONE, D. F.; FOCACCIA, R. et al. Prevalence of GB virus C (hepatitis G virus) and risk factors for infection in Sao Paulo, Brazil.
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., v. 21, n. 6, p. 438-443, 2002.
50. ROSS, R. S.; VIAZOV, S.; SCHMITT, U.; SCHMOLKE, S.; TACKE, M.; OFENLOCH-HAEHNLE, B. et al. Distinct prevalence of antibodies to the E2 protein of GB virus C/hepatitis G virus in different parts of the world.
J.Med.Virol., v. 54, n. 2, p. 103-106, 1998.
51. ROTH, W. K.; WASCHK, D.; MARX, S.; TSCHAUDER, S.; ZEUZEM, S.; BIALLECK, H. et al. Prevalence of hepatitis G virus and its strain variant, the GB agent, in blood donations and their transmission to recipients
2. **Transfusion**, v. 37, n. 6, p. 651-656, 1997.
52. SAITO, I.; MIYAMURA, T.; OHBAYASHI, A.; HARADA, H.; KATAYAMA, T.; KIKUCHI, S. et al. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 87, n. 17, p. 6547-6549, 1990.

53. SEIPP, S.; SCHEIDEL, M.; HOFMANN, W. J.; TOX, U.; THEILMANN, L.; GOESER, T. et al. Hepatotropism of GB virus C (GBV-C): GBV-C replication in human hepatocytes and cells of human hepatoma cell lines. **J.Hepatol.**, v. 30, n. 4, p. 570-579, 1999.
54. SIMONS, J. N.; PILOT-MATIAS, T. J.; LEARY, T. P.; DAWSON, G. J.; DESAI, S. M.; SCHLAUDER, G. G. et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 92, n. 8, p. 3401-3405, 1995.
55. STAPLETON, J. T. GB virus type C/Hepatitis G virus. **Semin.Liver Dis.**, v. 23, n. 2, p. 137-148, 2003.
56. STAPLETON, J. T. ; CHALONER, K. GB virus C and survival in HIV-positive people. **AIDS**, v. 18, n. 17, p. 2343-2344, 2004.
57. STAPLETON, J. T.; WILLIAMS, C. F.; XIANG, J. GB virus type C: a beneficial infection? **J.Clin.Microbiol.**, v. 42, n. 9, p. 3915-3919, 2004.
58. TACKE, M.; SCHMOLKE, S.; SCHLUETER, V.; SAULEDA, S.; ESTEBAN, J. I.; TANAKA, E. et al. Humoral immune response to the E2 protein of hepatitis G virus is associated with long-term recovery from infection and reveals a high frequency of hepatitis G virus exposure among healthy blood donors. **Hepatology**, v. 26, n. 6, p. 1626-1633, 1997.
59. THOMAS, D. L.; VLAHOV, D.; ALTER, H. J.; HUNT, J. C.; MARSHALL, R.; ASTEMBORSKI, J. et al. Association of antibody to GB virus C (hepatitis G virus) with viral clearance and protection from reinfection. **J.Infect.Dis.**, v. 177, n. 3, p. 539-542, 1998.
60. WANG, J. T.; TSAI, F. C.; LEE, C. Z.; CHEN, P. J.; SHEU, J. C.; WANG, T. H. et al. A prospective study of transfusion-transmitted GB virus C infection: similar frequency but different clinical presentation compared with hepatitis C virus. **Blood**, v. 88, n. 5, p. 1881-1886, 1996.
61. WILLIAMS, C. F.; KLINZMAN, D.; YAMASHITA, T. E.; XIANG, J.; POLGREEN, P. M.; RINALDO, C. et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. **N.Engl.J.Med.**, v. 350, n. 10, p. 981-990, 2004.

62. WILSON, M. E.; YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B. L.; MENTE, K. A.; MCGOWAN, S. E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. **J.Immunol.**, v. 161, n. 11, p. 6148-6155, 1998.
63. XIANG, J.; GEORGE, S. L.; WUNSCHMANN, S.; CHANG, Q.; KLINZMAN, D.; STAPLETON, J. T. Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2040-2046, 2004.
64. XIANG, J.; WUNSCHMANN, S.; DIEKEMA, D. J.; KLINZMAN, D.; PATRICK, K. D.; GEORGE, S. L. et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. **N.Engl.J.Med.**, v. 345, n. 10, p. 707-714, 2001.
65. XIANG, J.; WUNSCHMANN, S.; SCHMIDT, W.; SHAO, J.; STAPLETON, J. T. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. **J.Virol.**, v. 74, n. 19, p. 9125-9133, 2000.
66. ZUCKERMAN, A. J. Alphabet of hepatitis viruses. **Lancet**, v. 347, n. 9001, p. 558-559, 1996.

Apêndice A



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Biociências
Departamento de Bioquímica
Laboratório de Imunogenética

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **Prevalência de GBV-C/HGV em uma população susceptível à infecção por Leishmania no Nordeste do Brasil**

Pesquisadores: **Selma M.B. Jeronimo, Eliana Tomaz, Josane R. de Lima, Mary E. Wilson, Jack Stapleton, Richard D. Pearson**

Estamos através deste estudo levantando dados sobre o vírus G no Rio Grande do Norte. Este vírus pode estar relacionado com hepatite. Para realizar esta pesquisa, estamos solicitando a sua colaboração como voluntário. Explicaremos como será realizado o estudo e, caso concorde em participar do mesmo, solicitamos que você assine este termo. Este termo pode conter palavras ou expressões que são usadas freqüentemente no meio médico-científico. Caso não esteja claro, por favor, informe-nos, para que possamos esclarecer o significado da melhor maneira possível.

NÚMERO DE PARTICIPANTES NESTE ESTUDO

Aproximadamente 1000 pessoas participarão deste estudo. Esta população é residente no Rio Grande do Norte e será estudada na Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

OBJETIVO

Este estudo envolve pesquisa, tendo como objetivo determinar prevalência de GBV-C/HGV na população geral do Rio Grande do Norte.

PESQUISA GENÉTICA

Este estudo se propõe a investigar a presença do RNA do vírus GBV-C/HGV no soro. Para isso, será necessária coleta de sangue para obtenção do soro de onde será extraído o RNA total (do doador e do vírus). O RNA é a substância encontrada dentro células oriundas do DNA, responsável por características do nosso corpo.

PROCEDIMENTO

Procedimento a ser realizado coleta de 10 ml de sangue para extração de soro e RNA. O sangue será coletado pelos funcionários do banco de sangue ao término da doação.

RISCOS

Os riscos associados à participação neste estudo são mínimos e relacionados à doação de sangue, os quais podem ser sangramentos ou manchas arroxeadas no local da coleta do sangue, infecção e desmaio. Os riscos desses procedimentos são minimizados, seguindo os cuidados de higiene e pressão na área puncionada.

RESULTADO DO TESTE

Se você desejar, será informado sobre o resultado do teste para o RNA do vírus GBV-C/HGV. Em caso de resultado positivo você será encaminhado para acompanhamento clínico, pelas Doutoradas Selma Jerônimo e Eliana Tomaz, no Hospital Giselda Trigueiro, no Ambulatório do Hospital Giselda Trigueiro. Este ambulatório funciona todas as quintas-feiras às 14 horas.

BENEFÍCIOS

É recente a descrição do vírus G, não sendo descrito complicações clínicas relacionadas à presença do mesmo. Propomos, então, avaliar o percentual de indivíduos infectados pelo vírus e, aqueles que forem positivos e desejarem ser acompanhados no ambulatório do Hospital Giselda Trigueiro, poderão fazê-lo. Portanto, o benefício deste estudo será de podermos determinar se em longo prazo, o vírus G exerce alguma influência danosa ao indivíduo.

CONFIDENCIALIDADE DO ESTUDO

O Registro da participação neste estudo será mantido confidencial, até o limite permitido pela lei. No entanto, agências Federais que regulamentam no Brasil a pesquisa com seres humanos podem inspecionar e copiar registros pertinentes à pesquisa e estes podem conter informações identificadoras. Guardaremos os registros de cada indivíduo, em sala trancada, e somente os pesquisadores trabalhando na equipe terão acesso a estas informações. Cada indivíduo receberá um número para ser utilizado no laboratório. Se qualquer relatório ou publicação resultar deste trabalho, a identificação do paciente não será revelada. Resultados serão relatados de forma sumariada o indivíduo não será identificado.

Esta pesquisa envolve o estudo de RNA e assumimos o compromisso que o mesmo será usado para os objetivos aqui propostos. Pedimos permissão para guardar o RNA, o soro e o plasma não utilizados, no Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em tubos identificados através de um código. Seu nome não aparecerá no tubo. Qualquer outro projeto que venhamos a fazer com qualquer amostra coletada de você, que seja diferente do protocolo aqui escrito, será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, além de ser solicitado um novo termo de consentimento. Não permitiremos acesso às informações encontradas a terceiros; tais como, seguradoras de saúde e empregadores.

DANO ADVINDO DA PESQUISA

Se houver algum dano ou se algum problema ocorrer decorrente desse estudo, o tratamento médico será fornecido sem ônus para o paciente e será providenciado pela Dr. Selma Jerônimo, sendo o telefone de contato (84) 215-3428.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Toda participação é voluntária. Não há penalidade para alguém que decida não participar neste estudo. Ninguém também será penalizado se decidir desistir de participar do estudo, em qualquer época.

PERGUNTAS

Estimulamos que vocês façam perguntas a respeito da pesquisa. Se houver alguma pergunta, por favor, contate a Dra. Selma Jerônimo (84-215-3428) no Departamento de Bioquímica da UFRN.

CONSENTIMENTO PARA INFORMAÇÃO DO RESULTADO DO TESTE

Desejo receber o meu resultado do teste para o RNA do GBV-C/HGV

Sim Não

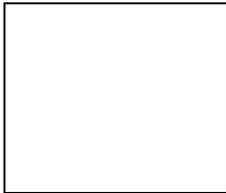
CONSENTIMENTO PARA ARMAZENAR O MATERIAL COLETADO

Dou permissão para que o soro e o RNA extraídos do meu sangue e não utilizados nesta presente pesquisa, sejam guardados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, conforme descrito acima.

Sim Não

CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO

Estou de acordo em participar do estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido e os possíveis riscos existentes da minha participação neste estudo. Foi-me garantido que serei contactado no futuro, caso essas amostras sejam utilizadas em um novo projeto, de maneira que eu possa me pronunciar a respeito do seu uso ou não. Foi-me também garantidos esclarecimentos que venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir da participação em qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo a minha pessoa ou a minha família. Minha participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais. Foi-me garantido o anonimato e o sigilo dos dados referentes à minha identificação.



Impressão digital para aqueles impossibilitados de escreverem seu nome ou não alfabetizados.

Familiar

Titular (letra de forma)

Assinatura

Data

Testemunha(letra de forma)

Assinatura

Data

COMPROMISSO DO INVESTIGADOR

Eu discuti as questões acima apresentadas com os indivíduos participantes no estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e obrigações relacionadas a este projeto.

_____ Data:

__/__/__

Assinatura do Pesquisador

Apêndice B

PREVALÊNCIA DE GBV-C ENTRE OS DOADORES DE SANGUE

IDENTIFICAÇÃO

Registro:

Doador:		Data:	
Doac:	Identidade:		Sexo:
Data de nasci.:	Nacionalidade:		
Naturalidade:	Profissão:		
Endereço:		Município:	
Bairro:	Telefone:		

QUESTIONÁRIO

Tem antecedente de Hepatite?			Sim	Não
Tipo?	A	B	C	Outra

Alguém na sua família já teve Hepatite?			Sim	não
Grau de parentesco?				
Tipo?	A	B	C	Outra

Já recebeu transfusão de sangue?	Sim	Não
----------------------------------	-----	-----

Tem vida sexual ativa?	Sim	Não
------------------------	-----	-----

Já teve alguma experiência homossexual?	Sim	Não
---	-----	-----

Já usou drogas injetáveis?	Sim	Não
----------------------------	-----	-----

Já colocou um piercing?	Sim	Não
-------------------------	-----	-----

Já fez tatuagem?	Sim	Não
------------------	-----	-----

Já viajou para outro estado ou outro país?	Sim	Não
Qual?		

Apêndice C

GENÓTIPO	IDENTIFICAÇÃO NO BLAST	NOME
Genótipo 1	AB013500	GB virus C gene for polyprotein, complete cds, isolate: HGV-GA128
	U36380	Hepatitis GB virus C structural and non structural proteins gene, partial cds
	AB003291	Hepatitis GB virus C structural and non structural proteins gene, partial cds
Genótipo 2	U63715	Hepatitis GB virus C polyprotein gene, complete cds
	AB013501	GB virus C gene for polyprotein, complete cds, isolate: HGV-BL230
	AF104403	Hepatitis GB virus C/G polyprotein precursor, gene, complete cds
	AF121950	Hepatitis G virus strain lowan, complete genome
	D90600	Hepatitis GB virus C genomic RNA for polyprotein isolate GT110, complete cds
	AF309966	Hepatitis G virus isolate PEI polyprotein precursor RNA, complete cds
	AF081782	Hepatitis G virus strain HGV-lw isolate pHGVqz, complete genome
Genótipo 3	D87262	Hepatitis GB virus C genomic RNA, complete sequence, complete cds
	D87263	Hepatitis GB virus C genomic RNA, complete sequence, complete cds
	AB003293	Hepatitis GB virus C genomic RNA for polyprotein, complete cds, isolate:G13HC
	AB003290	Hepatitis GB virus C genomic RNA for polyprotein, complete cds, isolate:CG07BD
	AB008335	Hepatitis GB virus C genomic RNA, complete sequence, strain: K3732
	AF006500	Hepatitis G virus polyprotein precursor, gene, complete cds
Genótipo 4	AB021287	Hepatitis G virus gene for polyprotein, complete cds
	AB018667	Hepatitis G virus genomic RNA for polyprotein, complete cds
	AB003292	Hepatitis GB virus C genomic RNA for polyprotein, complete cds, isolate:G05BD
Genótipo 5	AY949771	GB virus C/Hepatitis G virus isolate D50 polyprotein gene, complete cds

Apêndice D



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOCÍMICA
LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA

MÉTODO DE DETECÇÃO DO VÍRUS G

É possível detectar a presença do vírus G no nosso corpo através da coleta de sangue. Do sangue é extraído o RNA das células e utilizando-se uma técnica chamada PCR, o RNA do vírus é identificado. Estes testes só estão disponíveis em laboratórios de pesquisa.

TRATAMENTO

Não são conhecidos sintomas relacionados ao vírus G ou a sua rota de infecção, decorrente destes fatores não há necessidade de tratamento. Porém foi observado que a maioria das pessoas infectadas com o vírus G conseguem se livrar do vírus aproximadamente 12 meses após a infecção inicial.

Os casos positivos serão convidados a comparecer ao ambulatório do Hospital Giselda Trigueiro, para acompanhamento da evolução da infecção.

CONTATO

Campus Universitário
Av. Sen. Salgado Filho-
S/N-Lagoa Nova
CEP: 59.072-970
Centro de Biociências
Departamento de Bioquímica
Dra. Selma Jerônimo
Fone: (84) 3215-3428
e-mail: smbj@cb.ufrn.br

Vírus da Hepatite G

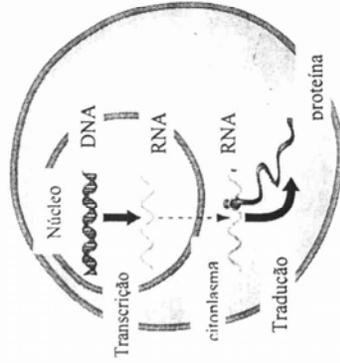
NATAL - RN
2004

INTRODUÇÃO

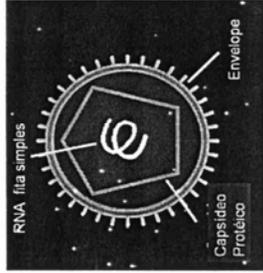
O que é um vírus? São parasitas intracelulares que contêm material genético próprio protegido por uma cobertura protéica. Alguns vírus ainda contêm um envelope lipídico e podem ter como material genético DNA ou RNA.

DNA e RNA

Todas as células possuem DNA, uma molécula onde estão contidas todas as informações das nossas características (cor da pele e dos olhos, por exemplo). A partir do DNA, a mensagem para cada informação é passada através do RNA e, traduzida, dentro da própria célula, em proteínas.



HEPATITE G



Vírus G

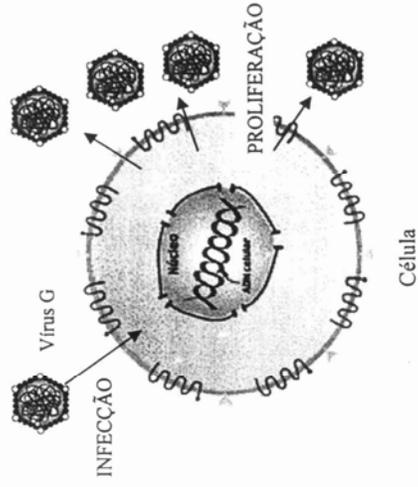
O vírus da hepatite G, é formado por RNA e é transmitido de uma pessoa para outra, através de transfusão de sangue, contato sexual ou de mãe para filho (placentária).

O vírus G foi recentemente descrito, e não se conhece a evolução do vírus no organismo humano nem em quanto tempo os sintomas aparecem. Sabemos apenas, que não foi encontrada relação do vírus G com hepatite fulminante. Contudo, tem sido encontrada alta prevalência deste vírus em pacientes com outras formas clínicas de hepatite.

INFECÇÃO

Para a sua propagação os vírus dependem de uma célula, que fornece a maquinaria para a síntese do material genético e da cobertura viral.

O vírus G ao entrar no nosso organismo é transportado pela corrente sanguínea até alcançar as células alvo que são principalmente células do sangue e do fígado.



Anexo A



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 2628/2004

Registro CONEP: 10875 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 086/04

Processo nº 25000.136071/2004-11

Projeto de Pesquisa: "Papel do vírus GBV-C/HGV na modulação da resposta imune à infecção por *Leishmania chagasi*".

Pesquisador Responsável: Dr^a. Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Instituição: Laboratório de Imunogenética da UFRN

Área Temática Especial: genética humana e cooperação estrangeira.

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 2195/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

a) foram atendidas/esclarecidas as solicitações do referido parecer inclusive as referentes ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE;

b) O projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 , 251/97 e 292/99 , sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada .

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 29 de Dezembro de 2004

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)