

ALINE DE JESUS BARBOSA

**IDENTIFICAÇÃO DO GBV-C NOS COMPARTIMENTOS HEPÁTICO E
LINFOCITÁRIO EM PACIENTES HIV-1 SOROPOSITIVOS CO-INFECTADOS
PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ALINE DE JESUS BARBOSA

**IDENTIFICAÇÃO DO GBV-C NOS COMPARTIMENTOS HEPÁTICO E
LINFOCITÁRIO EM PACIENTES HIV-1 SOROPOSITIVOS CO-INFECTADOS
PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof^o Dr. Celso Granato

Co-orientador: Prof^o Dr. Ismael Cotrim

Co-orientadora: Prof^a Dra. Valéria Lanzoni

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Aline de Jesus

Identificação do GBV-C nos compartimentos hepático e linfocitário em pacientes HIV-1 soropositivos co-infectados pelo vírus da Hepatite C. /Aline de Jesus Barbosa. -- São Paulo, 2008.
xviii, 92f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Infectologia.

Título em inglês: GBV-C identification in the hepatic and lymphocytic compartments in HIV-HCV co-infected patients.

1.GBV-C. 2.Hepatite G. 3.HCV. 4.HIV. 5.Co-infecção.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Emilia Inoue Sato

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Sérgio Barsanti Wey

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

ALINE DE JESUS BARBOSA

**IDENTIFICAÇÃO DO GBV-C NOS COMPARTIMENTOS HEPÁTICO E
LINFOCITÁRIO EM PACIENTES HIV-1 SOROPOSITIVOS CO-INFECTADOS
PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. João Renato Rebello Pinho

Responsável pelo Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical –
Instituto de Medicina Tropical – FMUSP

Profª Dra. Maria Lúcia C. Gomes Ferraz

Professora Adjunta da Disciplina de Gastroenterologia - UNIFESP

Profº Dr. David Salomão Lewi

Livre-Docente da Disciplina de Infectologia - UNIFESP

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Edmilson e Joselita pelo amor incondicional, incentivo e por todos os ensinamentos e princípios.

Ao meu irmão Rodrigo, a minha cunhada Hérica e ao meu primo Giovane pelo convívio e momentos de alegria em nossa família.

Aos meus familiares e afilhados Kayky, Yasmin e Aya pelo carinho e a importância que vocês representam para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Celso Granato pela oportunidade e confiança.

Aos pacientes que consentiram em participar deste trabalho e a importância que eles representam.

A equipe do CCDI, Danilo, Rose, Marli e a Milda pelo enorme apoio nas coletas do Projeto vinculado.

Ao Prof^o Dr. Ismael Cotrim do Laboratório de Ginecologia Molecular pelo apoio científico e pela paciência.

A Prof^a Dra. Valéria Lanzoni do Departamento de Anatomia Patológica pela atenção, compreensão e pelo profissionalismo.

Ao Prof^o Dr. Venâncio Alves do Departamento de Patologia - FMUSP pela cordialidade em doar as lâminas de biópsia hepática.

Ao Prof^o Dr. Marcello Franco pelo apoio.

Ao Ricardo Bertolla pela colaboração e apoio na representação fotográfica das lâminas de Imunofluorescência.

A Dra. Cristine Dobo do Laboratório de Patologia Molecular pela amizade e interesse em aplicar seus conhecimentos.

A Dra. Celina por fornecer o espaço no Laboratório de Patologia Molecular.

Ao Marcinho do Laboratório de Ginecologia Molecular pela colaboração.

A Adriana Bruscato, pela dedicação e orientação na realização da análise estatística e da metanálise.

A *Roche Diagnostics* pela doação do Kit de ELISA.

Aos colegas de viagem Guarujá - São Paulo durante os dois anos de Mestrado pelo carinho e incentivo.

Aos amigos de sempre, Luciano, Eddy, Danúbia, Akira, Nir, Gil, Petterson, Fernanda, Antônio, Aline, Rinaldo, Emerson, Flávia, Colin, Kátia, Regina e Jenny pela amizade e pelo incentivo.

A Giovana Baggio-Zappia, pela amizade, pelo apoio, aprendizado e pelos muitos trabalhos realizados em conjunto.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia I e Virologia, Tais Pavanelli, Natália Gomes, Viviane Sousa, Maria Fernandes, Milena Brunialti, Leandro Willish, Graziela Lanzara, Antônia da Cunha, Sidnéia Souza, Marialice Mendes, Ellen Ricci, Ari Watanabe, Sandra Guatura, Selma Cristina, Maria de Jesus, Amanda Alves, Elaine Lima, Emerson Carraro, Michelli Carol, Eliane Caccia, Wagner Garduzi e aos colegas do Laboratório de Retrovirologia, Charlys Costa, Cecília Sucupira, Michelle Zanoni, Wagner Alkmim, Rafael Azevedo, Mariana Lima, Carla, Beth, Celina, Dani e Rê pela convivência e aprendizado.

A Deus por mostrar esse caminho.

Obrigada!!!!!!!

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro ao Projeto vinculado, nº processos 05/57434-6 e 05/57611-5, respectivamente.

“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo... Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade...”

Walt Disney

SUMÁRIO

Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Lista de Figuras	XII
Lista de Quadros	XIII
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Gráficos	XV
Lista de Abreviaturas	XVI
Resumo	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2 Virologia Molecular do GBV-C.....	2
1.2.1 Biologia Molecular e Filogenética.....	2
1.2.2 Genótipos.....	4
1.2.3 Sítios de replicação.....	6
1.3 Epidemiologia e transmissão do GBV-C	7
1.4 Diagnóstico.....	9
1.5 Associação com outras doenças.....	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 GERAIS.....	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Casuística.....	13
3.2 Análise Histológica	14
3.3 Coleta de sangue e separação de amostras.....	15
3.4 Isolamento de PBMC – Método gradiente de <i>Ficoll-Paque</i>	17
3.5 Contagem de Linfócitos T CD4 e CD8	18
3.6 Testes Bioquímicos	20
3.7 Quantificação do RNA do HIV	22
3.8 Quantificação do RNA do HCV	23
3.9 Genotipagem do HCV	23
3.10 Teste de ELISA do GBV-C – Kit Comercial.....	23
3.11 Descongelamento de PBMC	24
3.12 Extração de RNA viral de PBMC.....	25
3.13 Extração de RNA viral de material parafinado.....	25
3.14 RT-PCR qualitativo com plasma	26
3.15 Padronização do <i>Real Time - PCR</i> para GBV-C	28
3.16 Controle Interno: Análise de expressão do GAPDH.....	29
3.17 Silanização.....	31
3.18 Pré-tratamento dos cortes de biópsia hepática	32
3.19 Análise de <i>primers</i> para a técnica de RT-PCR <i>in situ</i>	33
3.20 RT-PCR <i>in situ</i>	35
3.21 Revelação RT-PCR <i>in situ</i>	37

3.22	Imunofluorescência Indireta <i>in house</i>	37
3.23	Imuno-histoquímica.....	39
3.24	Inferência estatística.....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Perfil geral da coorte.....	40
4.2	Análise histopatológica da coorte.....	43
4.3	Testes histopatológicos e com PBMC.....	44
4.3.1	RT-PCR <i>in situ</i>	44
4.3.2	Controle: Análise de expressão do GAPDH.....	46
4.3.3	RT-PCR qualitativo em PBMC.....	46
4.3.4	Imunofluorescência Indireta <i>in house</i> e Imuno-histoquímica.....	47
4.4	Marcadores de infecção pregressa e atual pelo GBV-C.....	48
4.5	Comparação entre grupos com variáveis histológicas.....	48
4.6	Comparação entre os grupos com ou sem marcadores do GBV-C.....	49
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	56
7	ANEXOS.....	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ABSTRACT.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica comparativa do GBV-C e HCV.	2
Figura 2. Filogenia dos vírus GB (GBV-A, GBV-B e GBV-C) e sua relação com outros membros da família <i>Flaviviridae</i>	4
Figura 3. Distribuição dos genótipos do GBV-C.	5
Figura 4. Sub-populações celulares – FSC vs SSC.	19
Figura 5. MultiSET™ Lab Report – Gate Linfócitos T CD4 e CD8.	19
Figura 6. Aparelho para RT-PCR in situ. Perkin Elmer Genamp In Situ PCR System 1000 (a) e (b).	36
Figura 7. Padronização para Controle Positivo do RT-PCR <i>in situ</i>	45
Figura 8. Padronização para Controle Interno com GAPDH.	46
Figura 9. RT-PCR qualitativo em PBMC.	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Valores de Referência da Contagem de Linfócitos T CD4 e CD8.	20
Quadro 2. Valores de Referência dos testes bioquímicos.	21
Quadro 3. Ciclagem da RT para Análise de expressão do GAPDH.	30
Quadro 4. Ciclagem da PCR para Análise de expressão do GAPDH.	31
Quadro 5. Ciclagem da RT para análise de <i>primers</i> da RT-PCR <i>in situ</i>	34
Quadro 6. Ciclagem da PCR para análise de <i>primers</i> da RT-PCR <i>in situ</i>	35
Quadro 7. Ciclagem do RT-PCR <i>in situ</i>	36
Quadro 8. Carga viral do HCV em \log^{10} dos 20 pacientes.	41
Quadro 9. Características histopatológicas da coorte.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil geral da amostra quanto ao gênero, forma de exposição ao HIV e antecedente de doença definidora de AIDS.	40
Tabela 2. Perfil geral da amostra quanto ao tempo de diagnóstico de infecção pelo HIV, carga viral do HIV, contagem de linfócitos T CD4 e CD8.	41
Tabela 3. Perfil bioquímico da coorte.	42
Tabela 4. Estadiamento e atividade necro-inflamatória nas biópsias com diagnósticos de Hepatite crônica e Fígado reacional de pacientes co-infectados pelo HIV-HCV comparados aos que apresentam positividade para o GBV-C RNA/E2.....	49
Tabela 5. Comparação entre os grupos HIV-HCV e HIV-HCV-GBV-C E2.	50
Tabela 6. Comparação entre os grupos HIV-HCV-GBV-C E2 e RNA.	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C encontrados na coorte. ...	42
Gráfico 2. Biópsia hepática. (a) Fígado Reacional. (b) Hepatite Crônica sem atividade de interface. (c) Hepatite Crônica com discreta atividade de interface. (d) Hepatite Crônica com moderada atividade de interface.	44
Gráfico 3. Distribuição dos marcadores do GBV-C na coorte.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Antigo TGP – alanina aminotransaminase
AP	Atividade parenquimatosa
APP	Atividade peri-portal
AST	Antigo TGO – aspartato aminotransaminase
bDNA	Moléculas de DNA ramificadas
BM	Banho-maria
BP	Pares de base (<i>base pairs</i>)
BSA	Albumina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BVDV	Vírus da Diarréia Bovina (<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i>)
CCR5	Receptor de quiomocinas (<i>CC chemokine receptor 5</i>)
CD4	Grupo de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>) de células T restritas à classe II do MHC
CD8	Grupo de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>) de células T restritas à classe I do MHC (linfócitos T citotóxicos)
CSFV	Vírus da Febre Suína (<i>Swine Fever Virus</i>)
DAB	Diaminobenzidina
DF	Vírus da Dengue (<i>Dengue Virus</i>)
DIC	Interferência diferencial
DST	Doença sexualmente transmissíveis
E	Estadiamento
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA/EIE	Enzimaimunoensaio
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FITC	Fluoresceína isotiocianato (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
FSC	Dispersão frontal
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GBV-A	Vírus A do GB
GBV-B	Vírus B do GB
GBV-C	Vírus C do GB
GGT	Gama-glutamil transferase

HCV	Vírus da Hepatite C (<i>Hepatitis C Virus</i>)
HE	Hematoxilina-Eosina
HGV	Vírus da Hepatite G (<i>Hepatitis G Virus</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IF	Imunofluorescência
IFCC	Federação Internacional da Química Clínica
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IIP	Infiltrado Inflamatório portal
INF	Interferon
IRES	Entrada ribossomal
ISH	Hibridização <i>in situ</i> (<i>In Situ Hybridization</i>)
IVDus	Usuários de drogas injetáveis
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa (<i>Japanese encephalitis Virus</i>)
PBMC	Células mononucleares (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RLU	Unidade relativa de luz
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Transcriptase Reversa
ss+RNA	Fita simples senso positiva
SSC	Dispersão lateral
TBEV	Vírus da Encefalite por Carrapato (<i>Tick-borne Encephalitis Virus</i>)
WNV	Vírus do Nilo Ocidental (<i>West Nile Virus</i>)
YFV	Vírus da Febre Amarela (<i>Yellow Fever Virus</i>)

RESUMO

Introdução: O GBV-C está intimamente relacionado ao vírus da Hepatite C. Diferente do HCV, o GBV-C não parece ser hepatotrópico e não causa Hepatite aguda ou crônica. Devido a similaridade nas vias de transmissão, a co-infecção HIV-GBV-C é extremamente comum; além disso, estudos demonstraram que a viremia pelo GBV-C apresenta efeito benéfico na progressão e mortalidade em relação a doença causada pelo HIV. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi identificar os compartimentos infectados pelo GBV-C em pacientes HIV soropositivos co-infectados pelo HCV e estabelecer relações quanto à presença de marcadores de infecção pelo GBV-C e correlacioná-los com os parâmetros laboratoriais e achados histológicos na tripla infecção. **Métodos:** Pacientes HIV-HCV co-infectados submetidos à biópsia hepática no Hospital São Paulo entre maio de 2006 e maio de 2007 foram incluídos no estudo. O plasma desses pacientes foi testado para a presença de marcadores de replicação ativa (GBV-C RNA) e anticorpos contra a proteína E2 do GBV-C (anti-E2 HGV). Foram coletados dados demográficos e realizadas a contagem de células T CD4/CD8, quantificação da carga viral do HIV, HCV e do GBV-C. Os espécimes de biópsia hepática foram analisados no Departamento de Patologia da UNIFESP e corados pela Hematoxilina-Eosina e Tricômio de Masson. Nas biópsias com diagnóstico de hepatite crônica e fígado reacional foram avaliados o estadiamento e as atividades peri-portal e parenquimatosa utilizando os critérios de semiquantificação recomendados pelo Consenso Nacional sobre a Classificação das Hepatites Crônicas. Foram aplicadas as metodologias de RT-PCR *in situ* e Imunofluorescência Indireta *in house* (IFI) para identificar possíveis compartimentos infectados pelo GBV-C. **Resultados:** Foram incluídos 20 pacientes HIV-HCV co-infectados com média de idade de 43,0 (6,2) anos, 55% (11/20) do gênero masculino e 40% (8/20) tinham exposição parenteral. Destes, 30% (6/20) possuíam algum marcador de infecção pelo GBV-C, sendo que 15% (3/20) apresentavam positividade ao teste de ELISA para determinação qualitativa de anticorpos contra a proteína E2 do GBV-C e, os outros 15% (3/20) foram positivos quanto à presença de RNA do GBV-C em plasma. A detecção do GBV-C RNA pelo RT-PCR *in situ* foi limitada, possivelmente por não ser mesmo um vírus hepatotrópico ou devido a degradação de RNA, assim como, a IFI *in house* com difícil interpretação e resultados inconclusivos. As correlações entre níveis de cargas virais de HIV e GBV-C foram prejudicadas, provavelmente devido ao número de pacientes incluídos.

Conclusões: Apesar da pequena casuística incluída, observou-se que pacientes com replicação ativa (RNA) pelo GBV-C apresentaram menor grau de acometimento histológico hepático e menor carga viral do HCV quando comparados aos pacientes sem infecção ativa, embora essa diferença não atingisse significância estatística.

1.1 Considerações Gerais

Em 1967, Deinhardt *et al.* descreveram o agente GB após inoculação em tamarins (*Saguinus sp.*) com o soro de um cirurgião de trinta e quatro anos (com iniciais GB) com hepatite aguda (bralet1). Os tamarins submetidos ao estudo desenvolveram hepatite entre 16 a 40 dias apresentando níveis elevados das enzimas hepáticas e histologia hepática anormal. A décima primeira passagem seriada de inoculação nos tamarins foi designada como a passagem 11 do GB H205 (*H205 GB pass11*) e demonstrou-se infecciosa aos mesmos, tornando-se então a fonte do agente GB para estudos subsequentes (2).

Em 1995, Simons *et al.* identificaram dois agentes semelhantes ao GB no soro do tamarim identificado como T-1053, que fora infectado com uma alíquota do soro *H205 GB pass 11*. Nas seqüências analisadas, demonstrou-se a presença de duas moléculas distintas de RNA denominando-as, vírus A do GB (GBV-A) e vírus B do GB (GBV-B), que contam com 9453 e 9143 nucleotídeos, respectivamente (3).

Análises dos dois genomas revelaram similaridade com a família *Flaviviridae*, e assim como o vírus da hepatite C (HCV), possuem genoma RNA de fita simples de polaridade positiva, sugerindo que o GBV-A e o GBV-B pudessem ser agentes causadores de hepatite não - A-E (4, 5).

Supondo que poderia haver vírus relacionados ao GBV-A e GBV-B em humanos, um método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) empregando *primers* que compartilhavam as seqüências entre o GBV-A, GBV-B e HCV foi desenvolvido para testar soros humanos. Isso levou à descoberta de um terceiro vírus, denominado vírus C do GB (GBV-C) , que poderia ser o responsável por alguns dos casos de Hepatites não-A a não-E (4).

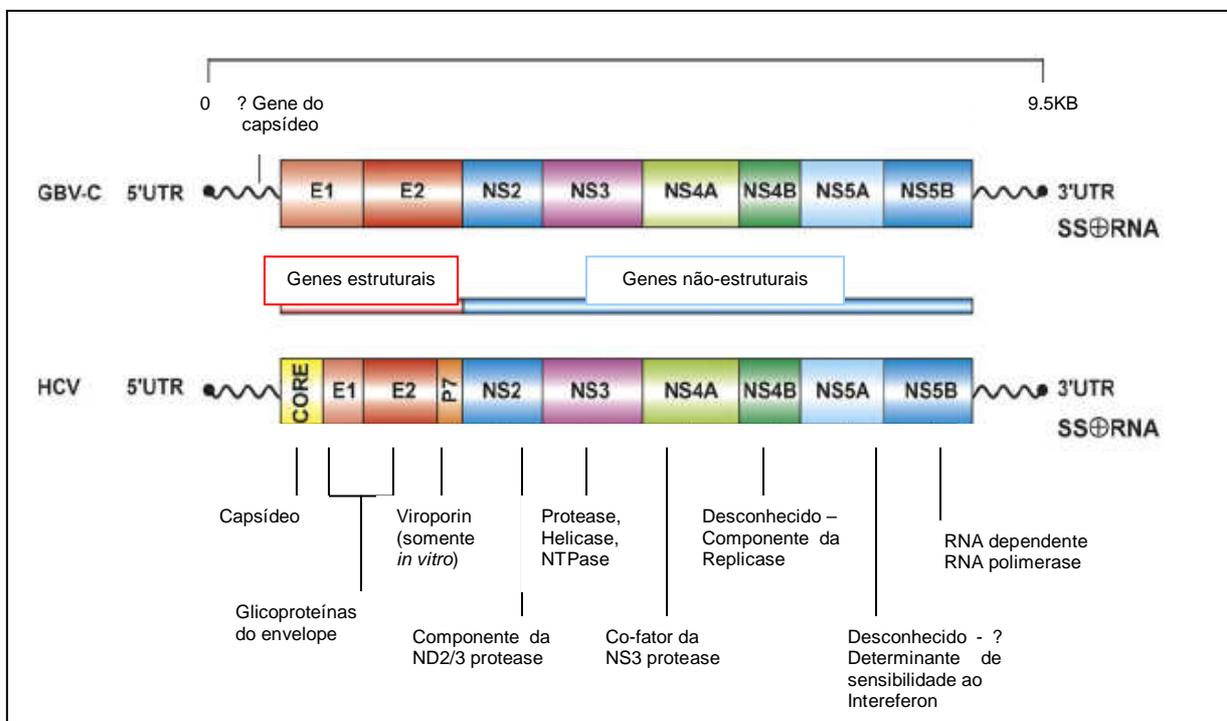
Em prosseguimento aos estudos anteriores, Linnen *et al.* descreveram um novo vírus RNA, isolado da amostra de um paciente com hepatite crônica co-infectado com HCV, sendo denominado vírus da hepatite G (HGV) (6). O GBV-C e HGV foram, a seguir, comparados e reconhecidos como isolados do mesmo vírus, com uma homologia de 95% na seqüência de aminoácidos e 85% nas bases nucleotídicas (7-9).

Considerando que o vírus da Hepatite G não causa hepatite e não exacerba uma hepatite pré-existente (10), o termo GBV-C será adotado na Dissertação.

1.2 Virologia Molecular do GBV-C

1.2.1 Biologia Molecular e Filogenética

O GBV-C é um vírus RNA de fita simples senso positivo (ss+RNA) sendo o RNA mensageiro (RNAm) o próprio material genético. Com base na seqüência e organização do genoma, o GBV-C é pertencente à família *Flaviviridae*, sendo intimamente relacionado ao HCV (6, 11). O GBV-C, em comparação com o HCV, possui aproximadamente 25% de homologia na seqüência de aminoácidos e seus genomas apresentam aproximadamente 9400 (GBV-C) e 9600 (HCV) nucleotídeos (11). A organização genômica comparativa entre o GBV-C e o HCV, assim como as inúmeras funções do HCV estão dispostas na Figura 1.



Adaptado de Berzsenyi MD *et al.*, 2005.

Figura 1. Organização genômica comparativa do GBV-C e HCV.

As proteínas não-estruturais do GBV-C e as respectivas funções consistem em: NS2 (protease), NS3 (serino protease/RNA helicase), NS4A que é um co-fator para a protease NS3, a proteína NS5A que está envolvida com a interação e sensibilidade ao interferon (INF) (com a proteína-quinase RNA dupla-fita (PKR)) e o NS5B (RNA polimerase RNA - dependente) (12-14).

As similaridades nas seqüências de aminoácidos entre o GBV-C e HCV ocorrem no interior da extremidade N-terminal das regiões NS3 e NS5B (11) ; por outro lado, há pequena ou nenhuma semelhança no número e arranjo dos genes que codificam as proteínas de superfície (E1 e E2) entre o GBV-C e HCV. Entre os isolados de GBV-C há variações limitadas nos genes que codificam as proteínas de superfície, contrariamente ao que ocorre no HCV e HIV, onde a variabilidade está relacionada à persistência viral (8, 15).

O genoma do GBV-C possui um sítio interno de entrada ribossomal (IRES) na região 5` não-codificante (5`UTR/NTR/NCR) que direciona para a tradução do RNA mensageiro (16). Esta região é consideravelmente maior no GBV-C do que a correspondente no HCV (aproximadamente 555 *versus* 342 nucleotídeos) e representa uma das maiores diferenças entre os dois vírus (11, 17).

O GBV-C contém uma fase aberta de leitura (ORF) para codificar uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. A região que codifica as proteínas estruturais no GBV-C consiste de duas proteínas de superfície, chamadas E1 e E2 (6, 11). Essas proteínas têm somente 1 (E1) e 3 (E2) sítios de glicosilação ligados a *N*, em comparação com os 5 e 11 sítios presentes nas proteínas E1 e E2 do HCV, respectivamente. A proteína E2 do GBV-C não possui uma região hipervariável como a encontrada na região amino-terminal da proteína E2 do HCV, ou seja, essa diferença pode ser devida à alta taxa de *clearance* viral do GBV-C em relação ao HCV (14, 16).

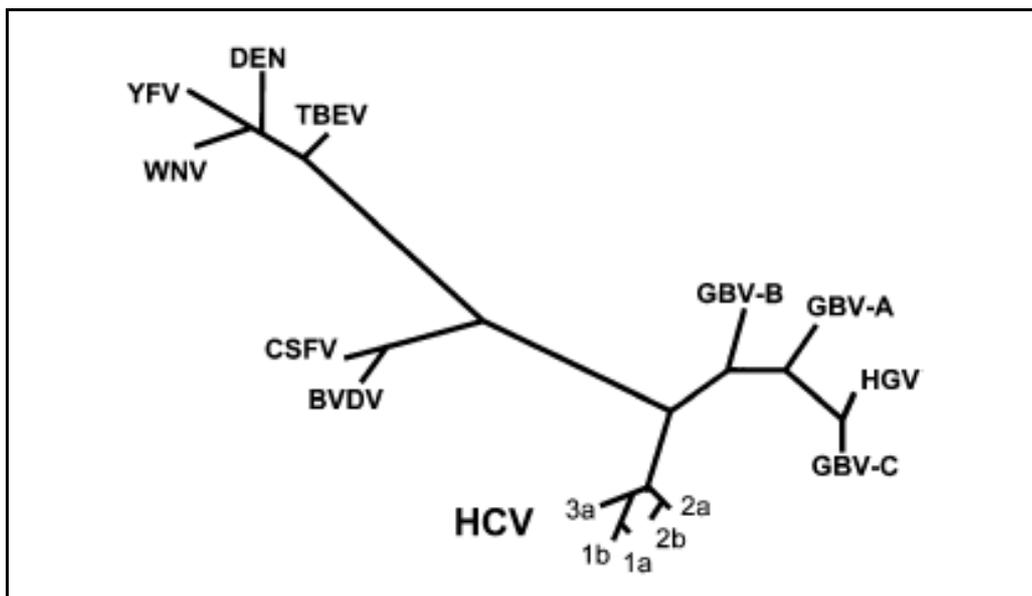
Para determinar o mecanismo e o sítio de iniciação da seqüência do GBV-C, Simons *et al.* demonstraram que o códon AUG codifica um aminoácido na região amino-terminal da proteína E1 e que é capaz de iniciar a tradução, ao passo que a região *upstream* do AUG não a faz. Além disso, a freqüência de polimorfismos nos códons de posições 1 e 2 da região *upstream* do AUG sugere que a região não seja codificante, levando-se a especular sobre a falta da proteína do *core* no GBV-C análoga à proteína do capsídeo do HCV (18).

As diferenças existentes entre os isolados de GBV-C foram atribuídas aos pontos de mutações, deleções e inserções dos nucleotídeos da região 5`-UTR, que

seriam características de cada isolado de GBV-C, o que torna difícil esclarecer a identificação do gene *core* (10, 17-19).

No entanto, a caracterização biofísica das partículas de GBV-C no plasma demonstrou que o vírus possui uma estrutura nucleocapsídica, presumivelmente relacionada à proteína do *core*. Foi encontrado que a seqüência de um gene que codifica o peptídeo que representa a região proximal do E1 é altamente conservada entre os isolados de GBV-C (20).

A identidade sequencial entre o GBV-C e o HCV sugere que estes vírus estão relacionados. No entanto, há outros vírus relacionados à família dos Flavivírus que podem infectar seres humanos (Figura 2), assim como, os vírus da Febre Amarela (YFV), da Dengue (DF), da Encefalite Japonesa (JEV), da Encefalite por Carrapato (TBEV) e do Nilo Ocidental (WNV) (21). Dentro do gênero *Pestivirus*, incluem-se os vírus da Febre Suína (CSFV) e da Diarréia Bovina (BVDV) que estão mais relacionados aos vírus GB e HCV (13).



Polgreen PM *et al.*, 2003.

Figura 2. Filogenia dos vírus GB (GBV-A, GBV-B e GBV-C) e sua relação com outros membros da família *Flaviviridae*.

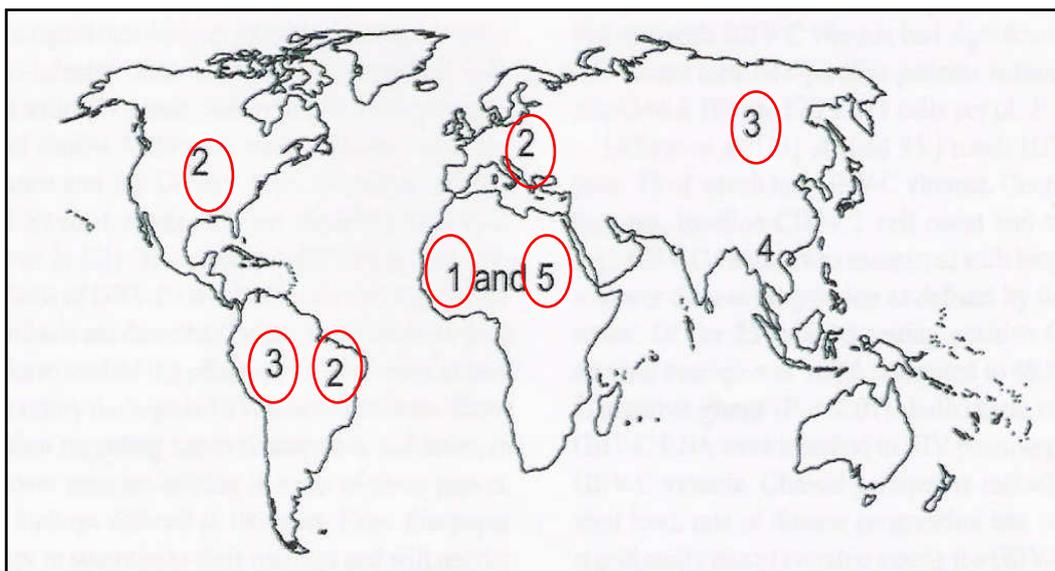
1.2.2 Genótipos

O GBV-C foi encontrado em espécies de primatas do Antigo e do Novo Mundo, sugerindo que esse agente seja um vírus ancestral e que esteve presente em primatas

antes da divisão dos continentes incluindo, por exemplo, tamarins e sagüis. A infecção pelo GBV-C é extensamente disseminada na população humana, com uma frequência de infecção pregressa ou ativa que varia de 5 a 15%. Essa distribuição é mais ampla em populações isoladas, como os habitantes de tribos indígenas na Papua-Nova Guiné, África Sub-Saariana e Américas Central e Sul (15, 22).

Diferentes isolados ou genótipos de GBV-C exibem uma variabilidade limitada com relação às seqüências de nucleotídeos, com uma variação máxima de 13%, ao contrário do HCV que possui 30% de divergência entre os genótipos. Comparando-se isolados epidemiologicamente distintos de GBV-C, foi proposta a existência de quatro arranjos filogenéticos. Recentemente, a análise do gene E2 de um determinado isolado da África do Sul sugeriu a existência de um quinto genótipo (13).

Os genótipos 1 e 5 são encontrados na África e são relativamente distintos na região 5'-UTR, enquanto que os grupos restantes correspondem às três principais rotas de migração da África à Europa (genótipo 2), ao norte Asiático (genótipo 3) e ao sul Asiático (genótipo 4). O genótipo 3 é também encontrado na América do Sul, provavelmente devido à migração dos primeiros habitantes do território que chegaram através do Estreito de Bering. Já o genótipo 2, que é principalmente encontrado na Europa e América do Norte, agrupa-se com o genótipo 3 na América do Sul (Figura 3). Apesar de todos os quatro genótipos (1-4) serem encontrados no Japão, a maioria é pertencente ao grupo 3 (22-24).



Adaptado Polgreen PM *et al.*, 2003.

Figura 3. Distribuição dos genótipos do GBV-C.

O primeiro estudo no Brasil que analisou a distribuição filogenética e genotípica do GBV-C reuniu mais de 1.000 pessoas na cidade de São Paulo. Desta maneira, conseguiu-se identificar que os genótipos 1 e 2 estão presentes nas populações do nordeste e sudeste do país, provenientes da África e da Europa (25). Levi *et al.* detectaram a presença dos genótipos 1, 2 e 3 em amostras selecionadas ao acaso de doadores do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês em São Paulo (26).

1.2.3 Sítios de replicação

O tropismo tecidual do GBV-C em humanos permanece ainda questionável. Diferente do que ocorre com o HCV, onde o fígado é o principal sítio de replicação, o GBV-C parece não ser hepatotrópico, comportando-se então como um vírus que não se replica em hepatócitos e não causa hepatite aguda ou crônica (8).

Bralet *et al.* compararam as características histopatológicas de 88 pacientes com HCV crônico mono-infectados e 17 pacientes com HCV co-infectados por GBV-C e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os dois grupos, sugerindo que o impacto da infecção pelo GBV-C não afete a gravidade e as características histopatológicas da infecção causada pelo HCV (27).

Laskus *et al.* examinaram a possível presença das seqüências de RNA do GBV-C e do HCV nas amostras de biópsia e soro de um grupo de pacientes com infecção crônica pelo HCV e co-infectados por GBV-C. Com relação ao hepatotropismo do GBV-C, não foi possível se concluir definitivamente, pois há possibilidade de que a falta de replicação no fígado esteja associada com uma interferência resultante da replicação pelo HCV (28, 29).

Dando continuidade ao estudo referente aos sítios de replicação do GBV-C, Laskus *et al.* estudaram os tecidos de autópsia de quatro pacientes HIV - positivos e as células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMCs) de outros seis pacientes também HIV - soropositivos. O RNA viral foi encontrado em três das quatro amostras da medula óssea, nas duas amostras do baço e em uma das quatro amostras do fígado (30).

Kobayashi *et al.*, analisaram a replicação de GBV-C em PBMCs através do PCR de fita-específica. Na hibridização *in situ* (FISH) ambas as fitas positiva (genômica) e negativa (anti-genômica) para GBV-C foram encontradas nos tecidos em estudo, uma

vez que, a presença de fita negativa é evidência de replicação viral. Os resultados demonstraram que o GBV-C não replica em hepatócitos, mas sim em PBMCs. A replicação do GBV-C foi mais ativa, apresentando sinais positivos mais intensos quando verificada em pacientes que foram submetidos à terapia imunossupressora (31).

Fogeda *et al.* investigaram a infecção *in vitro* de PBMCs e do soro e observaram somente uma pequena proporção de variantes de GBV-C presentes no soro que eram capazes de infectar PBMCs, sugerindo a presença de variantes linfotrópicos, ou seja, pela primeira vez foi demonstrada a replicação de GBV-C em células linfóides humanas de acordo com as condições de infecção experimental - *in vitro* (32).

Na tentativa de elucidar a presença e replicação de GBV-C no fígado humano, Seipp *et al.* através da técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), encontraram fitas positivas de RNA do GBV-C em hepatócitos e os sinais de hibridização foram restritos ao citoplasma. As fitas negativas de RNA do GBV-C foram também encontradas no mesmo compartimento celular, mas em um número menor de células. Com esses resultados, concluiu-se que o GBV-C é um vírus com potencial hepatotrópico (33).

Halasz *et al.* avaliaram 17 doadores de sangue saudáveis que consentiram à realização da biópsia hepática. A replicação do GBV-C foi identificada no citoplasma dos hepatócitos de 10 doadores pela metodologia de ISH (*In Situ Hybridization*) para detecção da fita positiva da região 5' UTR do GBV-C e IF (*Immunofluorescence*) para detecção do antígeno E2 do GBV-C, mas não houve evidências de doença hepática (34).

1.3 Epidemiologia e transmissão do GBV-C

Uma avaliação semi-quantitativa de RNA do GBV-C no soro e no fígado demonstrou que os títulos foram 10 a 100 vezes mais altos no soro do que no fígado. Isso diferente do que ocorre com o HCV que, por ser um vírus hepatotrópico, está presente em maiores concentrações no fígado do que no soro (35).

Após o período de viremia assintomática pelo GBV-C, a maioria dos portadores de RNA viral apresenta uma neutralização dos vírus circulantes em decorrência do surgimento de anticorpos contra a proteína E2 (anticorpo E2 do GBV-C). Essas

características, quando relacionadas ao HCV, por exemplo, podem estar associadas a um escape imune e persistência viral, em que aproximadamente 75% das infecções são persistentes. Em contraposição, apenas 25% das infecções pelo GBV-C persistem e isso possivelmente está relacionado à reatividade contra a proteína E2 (9, 12, 13, 36).

A infecção pelo GBV-C é relativamente comum e apresenta uma ampla distribuição. A prevalência de infecção pelo GBV-C encontrada na população geral da cidade de São Paulo foi de 5,1%, sendo encontrada entre 5,2-9% em doadores de sangue na população brasileira, 0,8-1,4% nos Estados Unidos e 1,8-3,2% na Europa (12, 37-41).

Como o GBV-C parece não se associar a doença, os hemoderivados não são triados para a presença do vírus e, aproximadamente 1 em cada 70 unidades de hemoderivados contém RNA do GBV-C nos Estados Unidos (9).

Devido ao modo de transmissão semelhante, a co-infecção do HIV – GBV-C é mais comum do que entre o HIV – HCV; em média, 39% dos pacientes HIV - positivos são virêmicos para GBV-C e outros 47% apresentavam anticorpos para E2 (12). A forma de transmissão do GBV-C melhor documentada é a via parenteral, especialmente por transfusões de sangue e/ou hemoderivados. Foi bem relatada por Linnen e Alter a ocorrência de hepatite pós-transfusional quando analisaram que dois de doze pacientes estudados, negativos para GBV-C por RT-PCR antes da transfusão, tornaram-se positivos após múltiplas transfusões (politransfundidos) (6, 28).

Em um estudo com pessoas saudáveis, sem fatores de risco para a transmissão sanguínea do GBV-C e com níveis de alanina aminotransferase (ALT) normais, o RNA do GBV-C foi detectável em 1,9% dos indivíduos, ao passo que o mesmo foi encontrado em 6,8% dos pacientes hemodialisados, 18,2% dos HIV-soropositivos, 21,1% das amostras de pacientes submetidos a transfusão sanguínea, 24,4% dos HCV-soropositivos, 28,8% em usuários de drogas injetáveis (IVDUs) e 35,2% dos hemofílicos (42).

Um amplo estudo epidemiológico avaliou a prevalência de RNA do GBV-C e anticorpos anti-GBV-C, particularizando a transmissão sexual. As pessoas que adquiriram alguma doença sexualmente transmissível (DST) que eram mais ativas sexualmente apresentavam prevalências mais elevadas, ou seja, as pessoas submetidas a tratamento para uma DST apresentaram um risco mais alto de serem infectadas pelo GBV-C do que as que nunca fizeram uso do mesmo (43).

Pinho *et al.* relataram a alta prevalência de GBV-C encontrada entre diferentes populações no Brasil, incluindo pacientes com hepatite não - A-E e hepatite C, doadores de sangue e aqueles com contato intra-familiar. A via de transmissão dentro da família foi considerada provável, seja através do contato sexual entre os pais, seja pela transmissão vertical (materno-fetal) (41). Apesar da transmissão parenteral do GBV-C ser altamente eficiente, Seifreid *et al.* encontraram que 32% de pacientes com anemia aplásica eram positivos e as transmissões sexual e vertical foram consideradas as vias comuns (44).

1.4 Diagnóstico

A infecção pelo GBV-C foi inicialmente determinada pela detecção de RNA viral no soro, plasma ou sangue total utilizando RT-PCR com *primers* degenerados de seqüências conservadas do gene NS3. Uma segunda geração de ensaios RT-PCR empregando *primers* derivados da região 5'-UTR foi utilizada para detectar genótipos de GBV-C sem reação-cruzada com o HCV ou outros flavivírus (45).

A detecção da resposta sorológica à infecção pelo GBV-C pode ser realizada através de dois métodos diferentes: Enzimaimunoensaio (EIA/EIE) para anticorpos anti-E2 e Western Blot. Entretanto, o Western Blot não demonstrou ser uma boa ferramenta para detectar anticorpos anti-E2 do GBV-C (46). O ensaio de RT-PCR empregando a enzima rTth apresenta uma especificidade maior que o RT-PCR convencional e é uma forma eficiente de evitar o possível erro de pareamento, pois catalisa a síntese de cDNA em altas temperaturas com uma enzima termoestável – *Tth* - que permite a detecção da fita de RNA negativa do GBV-C (30, 47).

O índice de infecção avaliado pela presença de RNA do GBV-C subestima a real taxa de infecção. Dessa forma, para fins epidemiológicos, considera-se que a taxa total de infecção pelo GBV-C seja dada pela freqüência de pacientes soropositivos (anti-E2) mais a freqüência de pacientes positivos para o RNA do GBV-C. Para fins de pesquisa, empregam-se as técnicas moleculares, RT-PCR (PCR pós-transcrição reversa) e a PCR em tempo real.

1.5 Associação com outras doenças

A infecção pelo GBV-C não tem sido associada com outras doenças. Já foram avaliados pacientes com: Carcinoma Hepatocelular, Hepatite Alcoólica, Anemia Aplásica, Doença Hepática Auto-Imune, Linfoma de Hodgkin, Líquen Plano Oral, Leucemia, Mielodisplásica, Doença Mieloproliferativa, Mieloma Múltiplo, Câncer Oral, Vasculites, Crioglobulinemia, Síndrome de Sjögren, Glomerulonefrite e Talassemia (13, 16).

De qualquer modo, a presença do HIV e a co-infecção pelo GBV-C evidencia que essa associação oferece um benefício quanto ao tempo necessário para a progressão da doença provocada pelo HIV (AIDS) (8, 13).

Toyoda *et al.* demonstraram o efeito da co-infecção pelo GBV-C no curso da infecção pelo HIV em pacientes hemofílicos no Japão. Relataram que há um retardo significativo na evolução da doença quando compararam os grupos de pacientes HIV-soropositivos co-infectados com GBV-C e mono-infectados com HIV (36, 48).

Pacientes HIV-soropositivos co-infectados por GBV-C apresentam uma melhor taxa de sobrevivência e contagem mais alta de células CD4+ do que pacientes HIV-soropositivos e GBV-C negativos (49, 50). Como tem sido demonstrado que o GBV-C replica em células T CD4+ *in vitro*, isso nos leva a especular que o mesmo pudesse causar uma interferência viral com o HIV, revelando que o GBV-C seja um fator de prognóstico favorável na doença causada pelo HIV (17, 51).

O mecanismo exato das interações do GBV-C e HIV à resposta imune do hospedeiro ainda permanece indefinido. Nattermann *et al.* demonstraram que a reação entre o receptor celular CD81 e a proteína E2 do GBV-C reduz a expressão do co-receptor de cepas de HIV na superfície celular, o CCR5 (*CC chemokine receptor 5*). A exposição da proteína E2 do GBV-C aos linfócitos induz a secreção de RANTES (um ligante natural de CCR5) que leva à internalização de CCR5. Esse mecanismo poderia contribuir para o retardo da progressão da infecção causada pelo HIV em pacientes co-infectados pelo GBV-C (52).

Uma vez que tanto o HCV, cujo receptor celular é o CD81 (53), como o GBV-C, que modula a expressão desse e de outros receptores celulares de quimiocinas, atuam de forma a interferir na expressão de inúmeras outras citocinas, e acometem frequentemente os mesmos pacientes, torna-se interessante a avaliação dessa co-infecção pelos dois agentes virais (HCV e GBV-C) quando na presença do HIV, para

obtenção de inferências clínicas e a avaliação do impacto sobre a bioquímica hepática, nesses pacientes co-infectados.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

- Identificar compartimentos celulares infectados pelo GBV-C;
- Determinar a localização intracelular do GBV-C;
- Estabelecer relações entre presença e/ou carga viral para GBV-C e acometimento clínico-laboratorial da infecção pelo HIV e HCV.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia de RT-PCR *in situ* e Imunofluorescência Indireta para identificar a presença e o sítio de replicação do GBV-C em tecido hepático;
- Aplicar a metodologia de RT-PCR qualitativo para detecção de GBV-C em plasma;
- Estabelecer correlações entre parâmetros laboratoriais ligados à infecção pelos vírus HIV e HCV, tais como, níveis de viremia, grau de acometimento hepático e os locais de replicação do GBV-C.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Estudo do tipo transversal e prospectivo com inclusão de pacientes comprovadamente HIV soropositivos co-infectados pelo HCV que foram triados no período de maio/2006 a maio/2007 na Enfermaria da Disciplina de Infectologia – UNIFESP do Hospital São Paulo. Os pacientes devidamente esclarecidos e que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura de um Termo de Consentimento (Anexo I), foram submetidos a uma coleta de sangue.

Neste período, os pacientes com HCV RNA positivo independentemente do nível de ALT (alanina aminotransaminase – antigo TGP) (54) foram submetidos a biópsia hepática percutânea guiada por Ultrassom, utilizando-se agulha *Tru-cut* 16G.

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, conforme consta do processo nº 1296/05, cujo parecer encontra-se em anexo (Anexo II).

Critérios de Inclusão:

- pacientes entre 18 e 70 anos de idade;
- pacientes HIV soropositivos co-infectados pelo HCV;
- ter indicação de biópsia hepática segundo critérios definidos pelos clínicos do Ambulatório de Hepatites/Co-infecção da DIPA;
- assinar Termo de Consentimento.

Critérios de Exclusão:

- indivíduos co-infectados pelo HBV;
- indivíduos com diagnóstico de hepatopatia de outras etiologias;
- indivíduos em uso de medicações hepatotóxicas, exceto antirretrovirais (ARV);

3.2 Análise Histológica

Os espécimes de biópsia hepática dos pacientes incluídos no Projeto foram analisadas por um Patologista sem conhecimento prévio dos dados sorológicos – Prof^a Dra Valéria Lanzoni do Departamento de Anatomia Patológica da UNIFESP.

O fragmento hepático foi fixado em solução de formol a 10% com desidratação em álcool etílico e diafanização em xilol. A seguir procedeu-se a inclusão do material em parafina. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo convencional, cuja espessura variou entre 3 a 4µm de espessura. Foram realizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômio de Masson, Azul de Prússia (método de Perls) e impregnação das fibras reticulares pela prata (método de Gomory).

Nas biópsias com diagnóstico de hepatite crônica e fígado reacional foram avaliados o estadiamento e as atividades peri-portal e parenquimatosa utilizando os critérios de semiquantificação recomendados pelo Consenso Nacional sobre a Classificação das Hepatites Crônicas (55).

Critérios de semiquantificação:

1) Alterações Estruturais

0. arquitetura lobular normal;
1. expansão fibrosa de espaços-porta;
2. expansão fibrosa portal com septos porta-porta;
3. preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, podendo ser vistos esboços de nódulos;
4. cirrose, plenamente identificada à biópsia ou predomínio de áreas nodulares em relação a lóbulos remanescentes.

2) Infiltrado Inflamatório Portal / Septal

Semiquantificação de 0 a 4, independentemente da formação de folículos linfóides.

0. raros linfócitos portais;
1. aumento discreto do número de linfócitos portais;

2. aumento moderado do número de linfócitos portais;
3. aumento acentuado do número de linfócitos portais;
4. aumento muito acentuado do número de linfócitos portais.

3) Atividade Periportal / Perisseptal

0. ausência de lesões da interface espaço-porta / parênquima;
1. extravasamento de linfócitos para a interface (*spill over*), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados;
2. necrose em saca-bocados discreta (pequenas áreas em poucos espaços-porta);
3. necrose em saca-bocados moderada (extensas áreas em poucos espaços-porta ou pequenos focos em muitos espaços-porta);
4. necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços-porta.

4) Atividade Parenquimatosa

0. hepatócitos normais, isomorfos;
1. alterações discretas de hepatócitos, incluindo tumefação ou retração acidófilica, eventualmente acompanhada de infiltrado linfo-histiocitário, e raros focos de necrose;
2. necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios;
3. necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente;
4. necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios, associada a necrose confluyente extensa / múltipla.

3.3 Coleta de sangue e separação de amostras

Neste Projeto foram realizados testes de RT-PCR e o anticoagulante de escolha foi o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pois o sangue heparinizado apresenta efeito inibitório sobre a transcriptase reversa (RT-PCR) e na amplificação da reação (56).

Foram coletados seis tubos com EDTA, sendo três destinados à separação de PBMC, um para contagem de Linfócitos T CD4 e CD8, dois para quantificação das CV do HIV e HCV e genotipagem do HCV. Além desses, foi coletado um tubo seco para teste bioquímico: AST (aspartato aminotransaminase – antigo TGO), ALT e GGT (gama-glutamil transferase). No período que antecedeu a biópsia, todos os pacientes encontravam-se em jejum de 8 horas.

As amostras de sangue em tubo seco foram encaminhadas ao Laboratório Central do Hospital São Paulo e as em tubo EDTA foram processadas no Laboratório de Imunologia I e Virologia – UNIFESP destinadas à contagem de Linfócitos T CD4 e CD8, cuja técnica exige sangue total. Todos os outros tubos de sangue foram centrifugados a 2.500rpm por 10 minutos à 22°C.

Após centrifugação, o plasma foi retirado dos três tubos de separação de PBMC e armazenado a -80°C em tubos tipo *ependorf* em alíquotas de 500µL para realização do teste de ELISA e realização de RT-PCR qualitativo do GBV-C enquanto que a porção figurada foi reservada para separação de células (apenas PBMC) – método de *Ficoll-Paque*.

As amostras para análise quantitativa do HIV/HCV e genotipagem do HCV foram centrifugadas, separadas (plasma e *buffy coat*) em tubos tipo *ependorf* em alíquotas de 1mL e armazenadas a -20°C. Posteriormente, foram entregues ao Laboratório de Retrovirologia do Hospital São Paulo e, por esse motivo, foram separadas pelas integrantes do Projeto vinculado para prevenir a troca de substâncias entre as porções celular e líquida a fim de não comprometer os resultados.

Todos os resultados de CD4/CD8, cargas virais do HIV-HCV e genotipagem do HCV dos pacientes incluídos no protocolo foram entregues ao Ambulatório do CCDI (Centro de Controle de Doenças Infecciosas) nos seus respectivos prontuários, assim como os resultados dos testes do GBV-C (anexo III).

Os dados demográficos, tipo de transmissão, esquema ARV, exames complementares e anatomopatológico foram coletados para posterior correlação (anexo IV).

3.4 Isolamento de PBMC – Método gradiente de *Ficoll-Paque*

O sangue contendo EDTA foi centrifugado a 2.500rpm por 10 minutos à 22°C; o plasma foi armazenado como detalhado no item anterior, e a camada de glóbulos brancos (anel de leucócitos) formada entre o plasma e as hemácias foi removida com a utilização de uma pipeta *Pasteur* e ressuspensa em 5mL de solução fisiológica.

Essa suspensão de células foi transferida cuidadosamente para um tubo contendo 2mL de *Ficoll-Paque*TM Plus (*Amersham Biosciences AB*) com densidade de 1077g/mL e centrifugada a 2.000rpm por 20 minutos.

A camada de células (nuvem de leucócitos) localizada entre a solução fisiológica e o *Ficoll-Paque* foi retirada com uma pipeta *Pasteur* e transferida para um tubo contendo 5mL de RPMI suplementado (R10). Foi homogeneizada suavemente e centrifugada a 1.500rpm por 5 minutos; esse último processo foi repetido por mais duas vezes, desprezando-se o sobrenadante e ressuspensando o *pellet*.

Após essa etapa, foram adicionados 3mL de solução de lise (cloreto de amônio) agindo por 2 minutos. Decorrido esse tempo, adicionaram-se 10mL de R10 para cessar a ação da solução de lise, centrifugando-se a seguir a 1.500rpm por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e adicionaram-se mais 10mL de meio R10.

Em seguida, 10µL dessa suspensão de células foram transferidos para o tubo tipo *ependorf* contendo 90µL de corante *Trypan Blue* 0,1% (diluição 1:10) em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e ajustada em câmara de *Newbauer* para manter uma concentração de 1×10^7 células/mL. Devido ao corante, as células coradas em azul foram consideradas inviáveis e as células translúcidas, viáveis.

Segue abaixo o cálculo da contagem de células:

Número total de células = número de células contadas x 10.000 / número de quadrantes contados x diluição de células x volume da suspensão celular.

A suspensão de células foi centrifugada por mais uma vez a 1.500rpm durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em meio de congelamento mantendo em média 1mL de volume total por criotubo. As amostras no criotubo foram devidamente acondicionadas por 24 horas, no máximo por três dias, na caixa *Strata Cooler (Stratagene)*, no freezer a -80°C, e identificadas de acordo com o número de protocolo interno. Após esse período, as amostras em criotubo foram transferidas para o nitrogênio líquido.

- Meio de Congelamento 1:10

10% DMSO (5mL) + 90% soro bovino fetal (45mL)

- Suplementação do meio RPMI1640 (R10) - para 500mL

5mL de L-glutamina

5mL de penicilina/estreptomicina

5mL de HEPES

5mL de piruvato

50mL de soro bovino fetal (inativado em três ciclos de 56°C)

500µL 2-mercaptoetanol

3.5 Contagem de Linfócitos T CD4 e CD8

A Imunofenotipagem linfocitária foi realizada no Laboratório de Imunologia I e Virologia - UNIFESP através de Citômetro de Fluxo modelo FACSCalibur™ (*Becton Dickinson, USA*), em amostras de sangue total, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD4/CD3 e anti-CD8/CD3 (*Becton Dickinson, San Jose, C.A., USA*).

A correlação entre as medidas de FSC e SSC pode ajudar a diferenciar os tipos de células de uma população celular heterogênea. A “dispersão frontal” de luz laser (FSC) é proporcional à área da superfície ou ao tamanho da célula e a “dispersão lateral” de luz laser (SSC) é proporcional à granulação ou complexidade interna da célula. As principais sub-populações de leucócitos podem ser diferenciadas usando-se FSC e SSC (Figura 4).

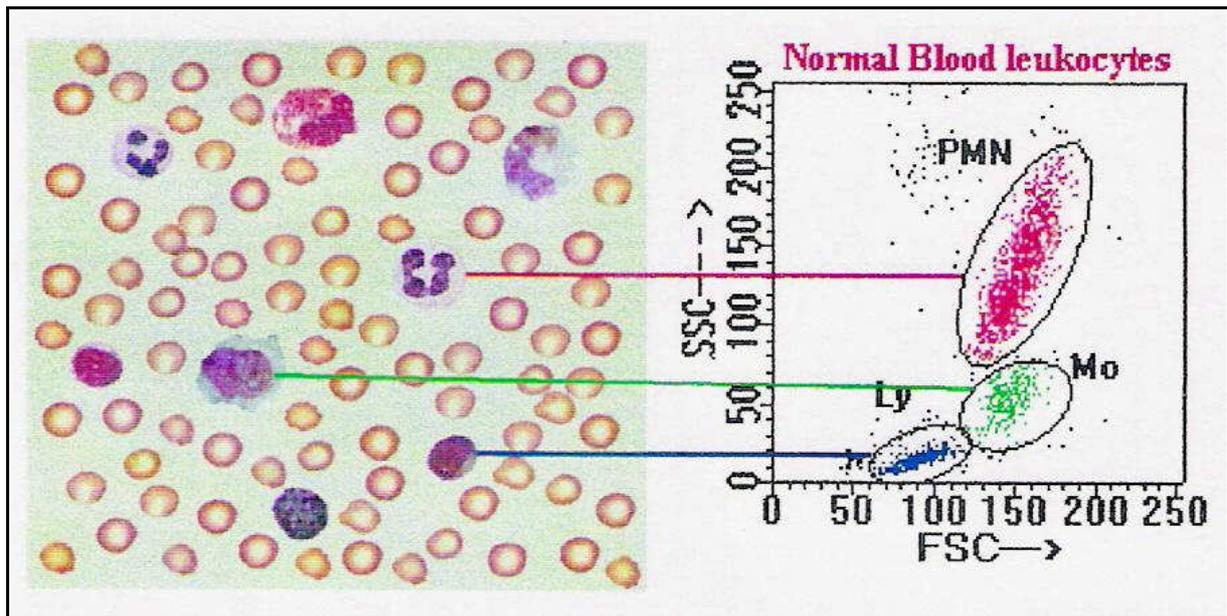


Figura 4. Sub-populações celulares – FSC vs SSC.

Um corante fluorescente conjugado com um anticorpo monoclonal pode ser usado para identificar um tipo específico de célula com base em cada marcador antigênico da superfície celular. Em uma população celular mista, fluorocromos diferentes podem ser usados para diferenciar sub-populações (Figura 5).

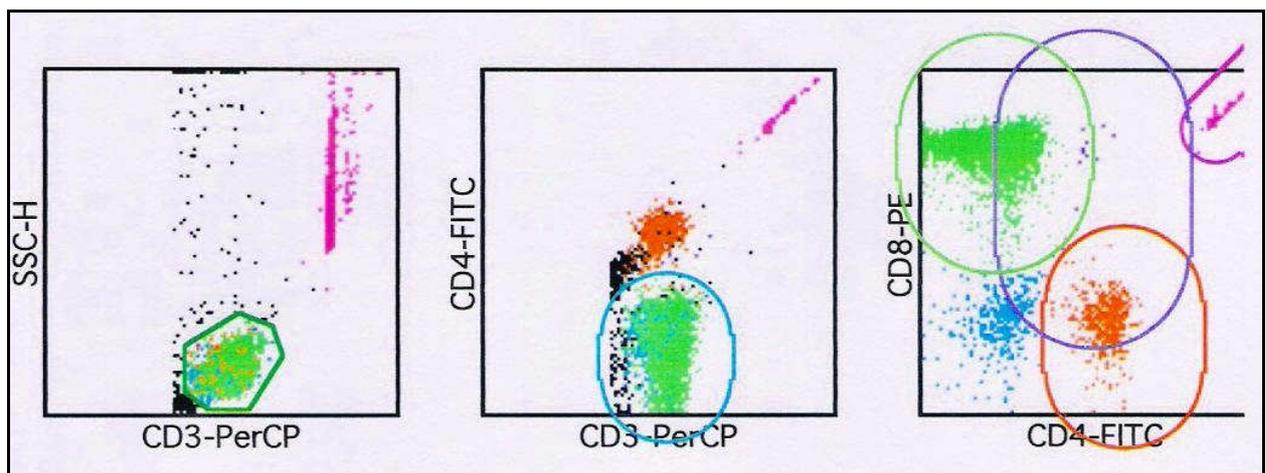


Figura 5. MultiSET™ Lab Report – Gate Linfócitos T CD4 e CD8.

Os valores de referência (Quadro 1) adotados pelo Laboratório de Imunologia I e Virologia - UNIFESP para a contagem de linfócitos T CD4 e CD8 estão descritos logo abaixo:

T Lymphs (CD3+) Abs Cnt	873	-----	2524 céls/mm ³
T Helper Lymphs (CD3+CD4+) Abs Cnt	545	-----	1623 céls/mm ³
T Suppressor Lymphs (CD3+CD8+) Abs Cnt	264	-----	1004 céls/mm ³

Quadro 1. Valores de Referência da Contagem de Linfócitos T CD4 e CD8.

Não foram estabelecidos, até o presente momento, valores de referência para linfócitos T CD4 e CD8 da população brasileira. Para esse modelo de equipamento (FACSCalibur™) a fonte utilizada é a população norte-americana, como descrita abaixo:

- BD FACSCalibur™

Os valores de referência para linfócitos T CD4 e CD8 que aparecem no *Physician Report* gerado no programa MultiSET™ são procedentes de estudos com sangue de adultos hematologicamente normais com idades entre 18 e 65 anos, realizados nas seguintes instituições: *Cleveland Clinic*, *Johns Hopkins Hospital*, *Institute of Tropical Medicine* e *UNC Hospital*.

3.6 Testes Bioquímicos

O sangue coletado em tubo seco foi encaminhado ao Laboratório Central do Hospital São Paulo e analisado no AU640™ (*Chemistry Immuno Analyzer - OLYMPUS®*). Seguem abaixo (Quadro 2) as metodologias e valores de referência dos testes:

Testes	AST	ALT	GGT
Métodos	Cinético UV	Cinético UV	Cinético colorimétrico
Valores de referência*	Até 32U/L	Até 31U/L	1 a 24U/L

*Valores de referência do Laboratório Central – Hospital São Paulo/UNIFESP

Quadro 2. Valores de Referência dos testes bioquímicos.

As transaminases de interesse clínico são as AST e ALT, que constituem um grupo de enzimas que catalisam a conversão de aminoácidos e alfa-cetoácidos por transferência de grupos amino e são marcadores de lesão hepatocelular. A GGT encontra-se elevada não apenas na colestase, mas também em lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas.

Princípios dos Métodos:

AST: O procedimento AST da OLYMPUS utiliza uma modificação da metodologia recomendada pela Federação Internacional da Química Clínica (IFCC). Nesse método, a AST catalisa a transaminação do aspartato e α -oxoglutarato, formando L-glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é então reduzido a L-malato pela desidrogenase de malato, ao passo que o NADH é simultaneamente convertido em NAD⁺. A diminuição na absorção devida ao consumo do NADH é medida em 340/380nm e é proporcional à atividade da AST na amostra.

ALT: O procedimento ALT da OLYMPUS é baseado nos princípios por Wroblewski e LaDue e utiliza uma modificação da metodologia recomendada pela IFCC. ALT transfere o grupo de amino da alanina para um α -oxoglutarato para formar piruvato e glutamato. O piruvato entra numa reação catalisada de desidrogenase lactato com NADH para produzir lactato e NAD⁺. A diminuição na absorção devida ao consumo do NADH é medida em 340/380nm e é proporcional à atividade dessa enzima na amostra.

GGT: O procedimento GGT da OLYMPUS é baseado na modificação de procedimento de Szasz. GGT catalisa a transferência do grupo gama-glutamil do substrato, gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, para glicilglicina, resultando em 5-amino-2-nitrobenzoato. A mudança na absorção em 410/480nm é devida à formação de 5-amino-2-nitrobenzoato e é diretamente proporcional à atividade da GGT na amostra.

3.7 Quantificação do RNA do HIV

A quantificação da carga viral do HIV foi realizada no Laboratório de Retrovirologia do Hospital São Paulo por metodologia *branched DNA HIV-1 RNA 3.0 ASSAY (bDNA – Bayer)*. É um ensaio de hibridação em fase sólida tipo sanduíche de ácidos nucleicos usando moléculas de DNA ramificadas (bDNA).

A amostra é tratada com reagente de lise e o material nucleico do vírus liberado é então hibridado em solução usando dois conjuntos de sondas oligonucleotídeas. Uma das sondas serve como sonda de captura (localizada na superfície dos pocinhos da placa) que hibrida especificamente com o RNA do HIV e faz com que o RNA do HIV fique ligado à placa. A segunda sonda serve para fixar o RNA do HIV à placa e também para hibridar com um outro conjunto de sondas: pré-amplificadora e amplificador (bDNA); a essa última se atribui a função de aumentar o nível de sinal da hibridação.

As moléculas de bDNA atuam como amplificadoras por se ligar a uma sonda marcada com fosfatase alcalina. Desta maneira, o sinal gerado pelo complexo HIV RNA-sondas é amplificado para detecção e quantificação do RNA viral. Finalmente, a adição de um substrato quimioluminescente reage com a última sonda e o sinal é lido em um luminômetro. A unidade relativa de luz (RLU) gerada é proporcional à quantidade de RNA do HIV na amostra.

As cópias de RNA do HIV são calculadas usando uma curva padrão gerada por um conjunto de seis calibradores e três controles HIV externos. A faixa de detecção de 50 a 500.000 cópias/mL apresenta boa linearidade em todo o intervalo.

3.8 Quantificação do RNA do HCV

A carga viral para o RNA do HCV ou PCR quantitativo para o HCV é realizada no Centro de Genomas – Laboratório de Biologia molecular especializado em Doenças Infecciosas e Genética Humana utilizando a metodologia de RT-PCR quantitativo em Tempo Real PCR (*Real time PCR*) – *TaqMan*.

O limite de detecção do Kit é de 200UI/mL e um teste com resultado indetectável não exclui definitivamente a presença da infecção, sendo que alguns pacientes podem apresentar baixos níveis de viremia que oscilem em determinados momentos abaixo e, em outros, acima do limite de detecção.

3.9 Genotipagem do HCV

A genotipagem do HCV é realizada no Centro de Genomas – Laboratório de Biologia molecular especializado em Doenças Infecciosas e Genética Humana utilizando como metodologia o Sequenciamento Genômico de produto do PCR seguido de Análise Filogenética.

A técnica é utilizada como parâmetro auxiliar no prognóstico e indicação do tratamento. De acordo com a Conferência Internacional de Consenso em Hepatite C realizada em fevereiro de 1999 em Paris, pacientes infectados com os genótipos 1 e 4 e com carga viral elevada necessitam de tratamento mais prolongado do que aqueles infectados com outros genótipos. O limite de sensibilidade do teste é de 600UI/mL.

3.10 Teste de ELISA do GBV-C – Kit Comercial

O Kit *μPLATE Anti-HGenv* foi gentilmente doado pela *Roche Diagnostics* para determinação qualitativa de anticorpos contra a proteína E2 do GBV-C. Para esse teste foi utilizado plasma colhido em EDTA estocado a -80°C. Inicialmente, as amostras foram pré-diluídas na relação 1+20 utilizando *Sample Buffer* (200μL de tampão + 10μL de amostra e controles positivo e negativo).

Após homogeneização, 20µL das amostras e controles diluídos foram adicionados nos micropoços de poliestireno revestidos com Estreptavidina e incubados no *shaker* com 80µL da solução 2a (antígeno E2 do GBV-C) em temperatura ambiente (TA) por 2 horas. Posteriormente, os poços foram lavados cinco vezes com a solução 9a (concentrado de fosfato, NaCl e Tween 20) e incubados no *shaker* com 100µL da solução 4a (tampão conjugado e anticorpo anti-h-Fcγ marcado com POD) por 1 hora. Os poços, a seguir, foram lavados por mais cinco vezes com a solução 9a e incubados com o substrato-cromógeno da solução 7a (tampão fosfato/citrato e ABTS® cromógeno) por 1 hora e protegidos da luz. A absorbância foi lida no leitor de ELISA (*Labsystems – Multiskan EX*) entre 405nm a 495nm.

3.11 Descongelamento de PBMC

Os criotubos contendo PBMC (1×10^7) foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho-maria (BM) a 37°C. Após descongelamento parcial das células, essas foram transferidas para um tubo *falcon* de 15mL usando pipeta Pasteur de 1mL estéril. Foram adicionados 10mL de tampão PBS cuidadosamente com pipeta estéril de 10mL estéril e homogeneizados por inversão, centrifugando-se, a seguir, a 1.300rpm por 10 minutos à 22°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o botão de células em 1mL de PBS.

PBS (0,15M/pH7,2)

NaCl	8,0g
KH ₂ PO ₄	0,2g
NA ₂ HPO ₄	1,15g
KCl	0,2g
Água destilada q.s.p.	1000mL.

Autoclavada e identificada com data de preparo. Armazenada a +4°C.

Foram preparadas duas lâminas com dois *blots* cada, de 20µL da suspensão de células, para realização de Imunofluorescência Indireta. Foram fixadas em acetona PA (*Merck*) por 10 minutos e armazenadas em freezer à -20°C.

3.12 Extração de RNA viral de PBMC

Foi utilizado o *QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®)* recomendado para extrair RNA viral do plasma, soro, sangue total, entre outros fluidos biológicos. Adicionaram-se 20µL de Protease (ou Proteinase K) em 200µL da suspensão de PBMC descongelado em PBS. Foram adicionados 200µL de *Buffer AL* e homogeneizados por 15 segundos no vórtex. Posteriormente, foram incubados em BM à 56°C por 10 minutos e centrifugados a um pulso para remover líquido residual contido na tampa do tubo. Adicionaram-se 200µL de etanol 100% e por mais uma vez, foram homogeneizados no vórtex por 15 segundos e centrifugados a um pulso.

A coluna *QIAamp* foi preparada junto ao tubo coletor para adicionar a amostra com centrifugação à 6.000 x g (8.000rpm) por 1 minuto. Adicionaram-se 500µL de *Buffer AW1*, centrifugando à 6.000 x g (8.000rpm) por 1 minuto. Foram adicionados 500µL *Buffer AW2* e centrifugados a *full speed* (20.000 x g ou 14.000rpm) por 3 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e 150µL de *Buffer AE* (ou água destilada) foram adicionados junto a 50µL de *RNase-Free water*. Foram incubadas à TA por 5 minutos e centrifugadas à 6.000 x g (8.000rpm) por 1 minuto. Foram armazenados à -80°C.

3.13 Extração de RNA viral de material parafinado

Foi utilizado o *RNeasy FFPE (QIAGEN®)* que fornece condições para extração de RNA total de amostra parafinada sem a necessidade de incubação *overnight* ou digestão com DNase. Foi adicionado 1mL de xilol na amostra de corte histológico de biópsia hepática parafinada com espessura de 4-5µm, homogeneizada no vórtex por 10 segundos e centrifugada a *full speed* por 2 minutos à 20-25°C. O sobrenadante foi removido por pipetagem e 1mL de etanol 100% foi adicionado ao *pellet*, homogeneizado no vórtex e centrifugado por 2 minutos à 20-25°C. O sobrenadante foi mais uma vez removido por pipetagem e o tubo permaneceu aberto em TA em média por 10 minutos até que todo o resíduo de etanol tivesse evaporado.

O *pellet* foi ressuspendido em 150µL de *Buffer PKD*, 10µL de Proteinase K foram adicionados e homogeneizados no vórtex. A amostra foi incubada em BM à 55°C por 15 minutos e, posteriormente à 80°C por 15 minutos. Foram adicionados 320µL de

Buffer RBC para ajustar as condições de ligação. O lisado foi homogeneizado, transferido para a coluna *gDNA Eliminator* junto a um tubo coletor de 2mL e centrifugado por 30 segundos à 8.000 x *g* (10.000rpm). A coluna foi descartada e o fluido filtrado pela coluna foi armazenado.

Foram adicionados 720µL de etanol 100% ao fluido e homogeneizados por pipetagem (NÃO centrifugar). Transferiram-se 700µL da amostra para a coluna *RNeasy MinElute* junto a um tubo coletor de 2mL e com a tampa fechada, centrifugando por 15 segundos á 8.000 x *g* (10.000rpm) e descartando o fluido nessa etapa. Essa etapa foi repetida por mais uma vez e, posteriormente, adicionaram-se 500µL de *Buffer RPE* à coluna *RNeasy MinElute* centrifugando-se por 15 segundos à 8.000 x *g* (10.000rpm) para lavar a membrana da coluna e descartou-se o fluido repetindo essa etapa por mais uma vez. A coluna de *RNeasy MinElute* foi colocada em um novo tubo coletor de 2mL descartando o tubo coletor anterior junto com o fluido. A tampa da coluna foi aberta centrifugando em *full speed* por 5 minutos e novamente o tubo coletor foi descartado com o fluido. A coluna de *RNeasy MinElute* foi colocada em um novo tubo coletor de 1,5mL adicionando 14-30µL de *RNase-Free water* na membrana. A tampa da coluna foi fechada centrifugando por 1 minuto em *full speed* para eluir o RNA. Armazenou-se à -80°C.

3.14 RT-PCR qualitativo com plasma

A técnica de RT-PCR qualitativo para detecção do GBV-C em plasma foi padronizada por Alves-Sousa, VK do Laboratório de Imunologia I e Virologia – UNIFESP. A padronização iniciou-se após a aquisição de uma bolsa de plasma de um doador de sangue com demais testes sorológicos negativos e teste para GBV-C positivo, sendo gentilmente cedida pelo Prof^o Dr. José Eduardo Levi do Instituto de Medicina Tropical – USP.

Foram escolhidos os *primers* descritos no *Hepatology* 1996;25(3):379-84 (45) que amplificam uma porção da região 5'UTR de 452 pares de bases (57).

Forward: -520 a -499 (21 oligonucleotídeos) – 5' CAC TGG GTG CAA GCC CCA GAA 3'

Reverse 1: 99 a 121 (21 oligonucleotídeos) – 5' CAG GGC GCA ACA GTT TGT GAG 3'

Reverse 2: -89 à -68 (21 oligonucleotídeos) – 5' CGG AGC TGG GTG GCC CCA TGC 3'

A padronização seguiu as seguintes etapas:

1. Extração de RNA da amostra de plasma, utilizando kit de extração de sílica líquida segundo técnica de Boom *et al.*, *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-503 (58);
2. Transcrição reversa para obtenção de DNA complementar (cDNA), utilizando enzima *SuperScript III (Invitrogen)*, conforme procedimento operacional padrão do laboratório. Posteriormente, a reação de transcrição reversa foi realizada com o preparo de dois *mix* diferentes, sendo que no primeiro foram adicionados em suas concentrações finais: *Random primers (Invitrogen)* (150ng), *dNTP mix (Invitrogen)* (1,25mM) e *H₂O Milli-Q*. Foram adicionados 5µL do RNA extraído ao *mix* e incubados por 5 minutos a 65°C no termobloco e, em seguida colocados no gelo por 1 minuto. Adicionou-se o segundo *mix*, preparado com tampão (aproximadamente três vezes concentrado), DTT (0,0002M), *RNAse Out (Invitrogen)* (40U) e a enzima *SuperScript III* (200U). Os tubos foram incubados à 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos;
3. PCR qualitativo utilizando os *primers* com duas reações – *forward* e *reverse 1* e *forward* e *reverse 2*, em duplicatas;
4. Eletroforese do material em gel de agarose e visualização das bandas correspondentes por meio de brometo de etídeo em transluminador para confirmação da amplificação. O material foi fotografado por *Polaroid (Model 545i 4X5 – Film Holder)*.

Algumas tentativas foram realizadas antes de confirmar a amplificação no gel de agarose, havendo a necessidade de alguns ajustes nas concentrações dos reagentes para otimizar a reação.

Ajustes necessários para otimização da reação:

1. Gradiente de temperatura para os primers;
2. Curva de concentração de dNTPs;
3. Curva de concentração de *primers*;
4. Curva de concentração de MgCl₂.

A PCR padronizada inclui os seguintes reagentes em suas concentrações finais: Tampão (concentrado 1 vez), $MgCl_2$ (25mM), dNTP *mix* (0,2mM), *primer forward* (0,5 μ M), *primer reverse* (0,5 μ M) e *Taq Platinum* (1,25U). A ciclagem em termociclador 9700 *Applied Biosystems* ocorreu em um ciclo de 94°C por 7 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

A extração de RNA para RT-PCR qualitativo em PBMC foi realizada com o kit de extração *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* (*QIAGEN®*) seguindo a mesma padronização utilizada com as amostras de plasma. Devido à dificuldade em se obter controles positivos de GBV-C/HGV foi utilizada a bolsa de plasma como controle positivo para a realização do RT-PCR.

3.15 Padronização do *Real Time - PCR* para GBV-C

A técnica de *Real Time - PCR* para quantificação do GBV-C em plasma foi padronizada por Alves-Sousa, VK do Laboratório de Imunologia I e Virologia – UNIFESP. Resumidamente, segue abaixo a padronização:

Reação de Transcrição Reversa:

Para esta reação foram utilizados os seguintes reagentes em suas concentrações finais: tampão 1X concentrado (contendo 4mM de cada dNTP e 6mM de $MgSO_4$), 0,4 μ M de *primer reverse*, 1 μ L de enzima *SuperScript III RT/Platinum Taq mix* (*SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System – Invitrogen*) e q.s.p 10 μ L de Tampão de Eluição. Nesta reação acrescentaram-se 5 μ L do RNA para cada ponto da curva. Seguem duas incubações: uma à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, outra incubação à 50°C por 30 minutos.

Reação de PCR em Tempo Real:

Para esta reação foram utilizados os seguintes reagentes em suas concentrações finais: tampão 1x concentrado (contendo 4mM de cada dNTP e 6mM de $MgSO_4$), $MgCl_2$ (6,5mM), *primer forward* (0,4 μ M), *Probe* (0,1 μ M) (*SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System – Invitrogen*) e q.s.p. 35 μ L de tampão e eluição. Esta solução foi adicionada a reação de transcrição reversa e incubada no

termociclador *iCycler (Bio-Rad)*, onde ocorreu a amplificação do alvo em um ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de (94°C por 20 segundos e 60°C por 40 segundos).

A reação foi realizada em duplicatas para cada ponto da curva e o gráfico de resultado foi obtido pelo software *iCycler iQ Optical System Software Version 3.0a*.

Após realização dos ensaios e obtidos os valores dos controles de cada amostra dos pacientes, estes foram utilizados como valores para o eixo Y e de acordo com eles foram previstos os valores do eixo X, correspondentes à previsão da concentração em log.

Foi utilizado o programa Excel para os cálculos de previsão da carga viral do HGV/GBV-C para os pacientes analisados e cálculos de linearização do ensaio.

3.16 Controle Interno: Análise de expressão do GAPDH

Para manter a confiabilidade dos testes e eficiência da extração de RNA foi utilizado o gene controle GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), cuja expressão foi testada em corte de tecido hepático emblocado em parafina e PBMC.

Os *primers* de GAPDH foram gentilmente cedidos pelo Prof^o Dr. Ismael Cotrim do Laboratório de Ginecologia Molecular – UNIFESP e a padronização realizada por Barbosa AJ e Watanabe A. Seguem abaixo as sequências de *primers* do GAPDH que amplificam a sequência de 120bp:

Seqüência GAPDH <i>Reverse</i>	5'- GAT GGC AAC AAT ATC CAC TTT ACC A -3' (25 bases)
Seqüência GAPDH <i>Forward</i>	5'- TCG GAG TCA ACG GAT TTG G -3' (19 bases)

Para este teste, a extração de RNA do tecido parafinado foi realizada segundo a metodologia do kit *RNeasy FFPE* apropriado para esse tipo de material e, do PBMC e plasma com kit *QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®)*. A ciclagem da RT foi realizada conforme descrição na Quadro 3.

ETAPA 1 da RT	para 1 amostra
<i>Random primer</i>	1µL
dNTP 10mM	1µL
H ₂ O	6µL
Amostra (RNA extraído)	5µL
Total =	13µL
ETAPA 2 da RT	para 1 amostra
Buffer 5x	4µL
DTT	1µL
<i>RNase Out</i>	1µL
<i>SuperScript III</i>	1µL
Total =	7µL

Quadro 3. Ciclagem da RT para Análise de expressão do GAPDH.

O *mix* da Etapa 1 da RT foi distribuído em tubos tipo *ependorf* de 0,2mL e as amostras foram adicionadas em suas respectivas numerações. As amostras foram incubadas à 65°C por 5 minutos no termobloco e, logo em seguida, foi dado o choque térmico em gelo por 1 minuto. Adicionaram-se 7µL do *mix* da Etapa 2 da RT em cada tubo da Etapa 1 seguindo para a ciclagem de 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos. Foram transferidos 10µL do cDNA (RT) de cada tubo de amostra para os respectivos tubos da PCR, cuja descrição do *mix* encontra-se na Quadro 4.

PCR	para 1 amostra
<i>Buffer</i> 10x	5 μ L
MgCl ₂ 25mM	2 μ L
<i>dNTP</i> 20mM	0,6 μ L
<i>Primer sense</i> 20mM	1 μ L
<i>Primer antisense</i> 20mM	1 μ L
<i>TAQ Platinum</i> 5U/ μ L	0,4 μ L
<i>cDNA</i> (cada amostra)	10 μ L
H ₂ O	30 μ L
Total =	50μL

Quadro 4. Ciclagem da PCR para Análise de expressão do GAPDH.

Os tubos para PCR foram incubados à 97°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 10 minutos em 40 ciclos no termociclador 9700 da *Applied Biosystems*. A eletroforese do material amplificado em gel de agarose e a visualização das bandas correspondentes foram observadas por meio de brometo de etídeo no transluminador.

3.17 Silanização

As lâminas limpas foram colocadas em suportes apropriados e mergulhadas nas seguintes soluções:

1 - acetona pura por 1 minuto

2 - acetona pura + silano (*3-aminopropyltriethoxy-silane*) (Sigma) por 2 minutos

(solução a 4% = para uma cuba de 500mL, misturar 20 mL de silano e 480 mL de acetona pura)

3 - mergulhar em acetona pura

4 - mergulhar em água destilada

5 - mergulhar em acetona pura

6 - mergulhar em água destilada

7 - secar em estufa

3.18 Pré-tratamento dos cortes de biópsia hepática

Os cortes histológicos de espécimes de biópsia hepática seccionados em micrótomo convencional com espessura de 3µm foram aderidos às lâminas silanizadas e inicialmente colocadas em estufa à 60°C por 15-20 minutos. As lâminas foram desparafinadas com xilol (*Merck*) por 30 minutos e hidratadas com etanol absoluto (*Merck*) em três lavagens de 5 minutos e duas lavagens de 3 minutos com água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 em forno microondas (10 minutos em potência alta, 3 minutos em potência cinco e 2 minutos em potência três) e, posteriormente, as lâminas em solução foram resfriadas em TA por 10-15 minutos. Após resfriamento foram lavadas em água destilada por três vezes seguindo para a etapa de digestão enzimática com pepsina (*DakoCytomation*) à 37°C por 10 segundos.

As lâminas foram lavadas com água destilada em três lavagens de 3 minutos e, em seguida, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (*Merck*) a 10% em quatro lavagens de 5 minutos. Foram lavadas duas vezes em tampão PBS pH 7,4 por 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas em câmara escura por 15 minutos com bloqueador de proteínas (*DakoCytomation*) seguidas de uma lavagem de 3 minutos em PBS. Foram incubadas por 30 minutos com bloqueador de Avidina (*DakoCytomation*) sem a necessidade de lavagem em PBS, apenas deixou-se escorrer o excesso de reagente e logo em seguida foram incubadas por 30 minutos com bloqueador de Biotina (*DakoCytomation*) e posterior lavagem em PBS. As lâminas pré-tratadas foram utilizadas nas técnicas de RT-PCR *in situ*, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Imuno-histoquímica (IHQ).

Tampão de lavagem:

PBS

NaCl 45g

Na₂HPO₄ 6,83g

Na₂H₂PO₄ 1,21g

Adicionar em 500mL de água destilada.

Tampão citrato:

9mL de solução A

41mL de solução B

Para 500mL de água destilada

→ Solução A: ácido cítrico 0,1M (C₆H₈O₇ . H₂O)

10,50g para 500mL

→ Solução B: citrato de sódio 0,1M (C₆H₅Na₃O₇ . 2H₂O)

14,7g para 500mL

3.19 Análise de *primers* para a técnica de RT-PCR *in situ*

Como o genoma do GBV-C é altamente homólogo ao do HCV, a RT-PCR *in situ* foi o sistema de escolha por evitar uma possível hibridização cruzada com o RNA do HCV. Uma outra razão por se adotar esta metodologia foi a sensibilidade da RT-PCR *in situ* ser maior do que na hibridização *in situ* convencional; além disso, já foi relatado que a carga viral do GBV-C é baixa, o que dificulta a detecção (4, 59, 60).

Inicialmente, foram analisadas quais as seqüências de *primers* a serem utilizadas na técnica de RT-PCR *in situ*; no entanto, aplicaram-se à metodologia seqüências pouco extensas que amplificam a região com 64bp, conforme descritas no artigo do grupo francês, *Journal of Medical Virology* 2004;73(4):596-600 (61) confirmadas no *Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*. O alinhamento foi realizado com a substituição das bases degeneradas para confirmar a presença da região conservada 5' UTR do GBV-C.

Seqüência HGV1*	5'- /5Bio/ AAG GTG GTG GAT GGG TGA TG -3' (20 oligonucleotídeos)
Seqüência HGV2*	5'- /5Bio/ AGT GGC TAC CAR GRT GAC CGG -3' (21 oligonucleotídeos) Base degenerada → R = A ou G

* Região 5' Biotinilada

A escolha dos primers de sequências pequenas entre 20-21 oligonucleotídeos que amplificam a região de 64bp foi devida á enorme degradação de RNA. Os *primers* foram testados para verificar a eficiência e provar a especificidade com amostras positivas para o vírus da Hepatite G. No Quadro 5 encontra-se a descrição da ciclagem da RT-PCR padronizada por Alves-Sousa, VK.

ETAPA 1 da RT	para 1 amostra
<i>Random primer</i>	1µL
<i>dNTP 10mM</i>	1µL
H ₂ O	6µL
Amostra (RNA extraído)	5µL
Total =	13µL
ETAPA 2 da RT	para 1 amostra
<i>Buffer 5x</i>	4µL
<i>DTT</i>	1µL
<i>RNase Out</i>	1µL
<i>SuperScript III</i>	1µL
Total =	7µL

Quadro 5. Ciclagem da RT para análise de *primers* da RT-PCR *in situ*.

O *mix* da Etapa 1 da RT foi distribuído em tubos tipo *ependorf* de 0,2mL e as amostras foram adicionadas em suas respectivas numerações. As amostras foram

incubadas a 65°C por 5 minutos no termobloco e, logo em seguida foi dado o choque térmico em gelo por 1 minuto. Adicionou-se 7µL do *mix* da Etapa 2 da RT em cada tubo da Etapa 1 seguindo para a ciclagem de 25°C por 5 minutos, 5°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos (Quadro 5). Foram transferidos 10µL do cDNA (RT) de cada tubo de amostra para os respectivos tubos da PCR, cuja descrição do *mix* encontra-se na Quadro 6.

PCR	para 1 amostra
<i>Buffer</i> 10x	5µL
MgCl ₂ 25mM	2,5µL
<i>dNTP</i> 20mM	0,5µL
<i>Primer sense</i> 20mM	0,25µL
<i>Primer antisense</i> 20mM	0,25µL
<i>TAQ Platinum</i> 5U/µL	0,25µL
<i>cDNA</i> (cada amostra)	10µL
H ₂ O	31,25µL
Total =	50µL

Quadro 6. Ciclagem da PCR para análise de *primers* da RT-PCR *in situ*.

Os tubos para PCR foram incubados à 97°C por 7 minutos, 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos e 72°C por 5 minutos em 35 ciclos no termociclador 9700 da *Applied Biosystems*. A eletroforese do material amplificado em gel de agarose e a visualização das bandas correspondentes foram observadas por brometo de etídeo no transluminador.

3.20 RT-PCR *in situ*

Para a realização do RT-PCR *in situ* foi utilizado o *QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)* por fornecer um formato altamente eficiente e específico de RT-PCR. O kit contém componentes otimizados que permitem a transcrição reversa e amplificação por PCR (Quadro 7).

Master mix		Ciclagem - 30 ciclos
<i>RNase-free water</i>	26,0 μ L	50°C por 30 minutos
<i>Buffer 5x</i>	10,0 μ L	95°C por 15 minutos
<i>Primers 0,6μM cada</i>	10,0 μ L	denaturação: 94°C por 1 minuto
<i>Enzyme mix</i>	2,0 μ L	anelamento: 52°C por 1 minuto
<i>dNTP mix 10mM</i>	2,0 μ L	extensão: 72°C por 1 minuto
Volume total	50,0μL	final a 4°C

Quadro 7. Ciclagem do RT-PCR *in situ*.

Uma alíquota de 50,0 μ L do *Master mix* foi pipetada sobre as lâminas de tecido hepático posteriormente vedadas por um disco *AmpliCover*. As lâminas foram colocadas no aparelho *Perkin Elmer Genamp In Situ PCR System 1000* ilustrado nas Figuras 6(a) e (b) e, adequadas conforme a ciclagem demonstrada no quadro acima.

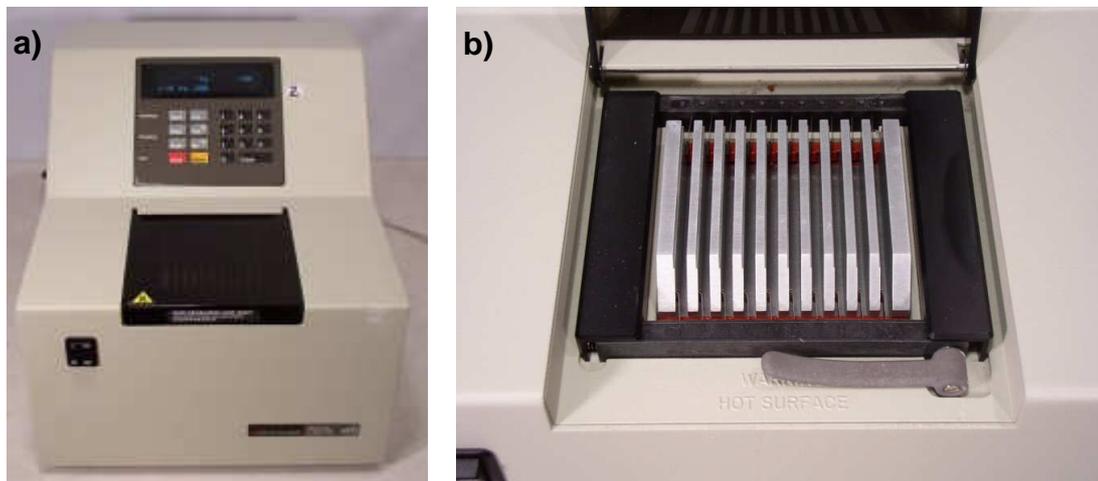


Figura 6. Aparelho para RT-PCR *in situ*. *Perkin Elmer Genamp In Situ PCR System 1000* (a) e (b).

Após amplificação, os discos *AmpliCover* foram removidos cuidadosamente e as lâminas colocadas em tampão PBS.

3.21 Revelação RT-PCR *in situ*

Após serem retiradas do aparelho de RT-PCR *in situ* e serem colocadas em PBS, as lâminas foram incubadas em BM com solução estrigente (*DakoCytomation*) a 45-47°C por 30 minutos. Posteriormente, utilizamos o Sistema de Amplificação do Sinal Catalisado (CSA) (*DakoCytomation*), Peroxidase (Sistema CSA, HRP) que é um procedimento sensível e que incorpora um método de amplificação de sinal baseado na deposição de um composto fenólico biotinilado pela peroxidase catalisada, seguido de uma reação secundária com estreptavidina-peroxidase. As lâminas foram incubadas por 15 minutos na sequência com *Biotinylated Link*, Complexo Estraptavidina – Biotina, Reagente de Amplificação e Estraptavidina – Peroxidase com duas lavagens intermediárias com PBS entre cada um dos reagentes. Foram adicionados 50µL de DAB (diaminobenzidina) sobre os cortes de biópsia por 1 minuto, logo após, foram colocadas em uma cuba contendo Hematoxilina-Eosina para contra-coloração. Os cortes em lâminas foram desidratados em etanol absoluto (*Merck*) duas vezes por 3 minutos e o clareamento em xilol duas vezes por 3 minutos. Utilizou-se Entellan (*Merck*) para montagem das lâminas e leitura em Microscópio óptico.

3.22 Imunofluorescência Indireta *in house*

Após separação, descongelamento e fixação de PBMC nas lâminas, estas foram deixadas em TA por 20 minutos. O bloqueio foi realizado com solução 3% BSA (*Bovine serum albumin*) por 30 minutos. Após retirar o excesso de solução de bloqueio, foi adicionado o anticorpo primário *Mouse Monoclonal [425] to Hepatitis G Virus (ab24216) (ABCAM)* com especificidade para o antígeno E2 do envelope do GBV-C em uma diluição de 1:10, 1:50 e 1:100 em tampão PBS - 1% albumina (BSA - *Bovine serum albumin*).

Além dos pacientes HIV-HCV positivos e negativos no plasma para GBV-C RNA e E2, aplicamos a metodologia de IFI em uma amostra de PBMC de um paciente HIV soropositivo não co-infectado pelo HCV conhecidamente negativo para GBV-C RNA e E2 no plasma apenas para descartar a possibilidade de reação cruzada.

Bloqueio: 3% BSA → 3g de albumina para 100mL de água destilada.

Tampão de diluição de anticorpo: PBS 1x

Na ₂ HPO ₄	8,15g
KH ₂ PO ₄	2,45g
NaCl	4,5g
Água destilada	1000mL

→Para cada 100mL de PBS adicionar 1% (1g) de albumina.

Tampão de lavagem: PBS 1x

Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2g
NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Água destilada	1000mL

Após incubação em estufa à 37°C por 30 minutos, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS) em três banhos de 5 minutos cada. O anticorpo secundário – *Goat Polyclonal to Mouse IgG – H&L – Fluorescein isothiocyanate (FITC)* (ab6785) (ABCAM) – foi adicionado em uma diluição de 1:500, 1:1000 e 1:4000 e as lâminas foram incubadas por mais 30 minutos à 37°C. A lavagem procedeu-se da mesma maneira e, posteriormente, os cortes foram contra-corados com 10µL Azul de Evans por 5 minutos, DAPI por 5 minutos e PI (1µM) (*Invitrogen*) com *Antifade (Vysis)* por 5 minutos; utilizou-se *Glicergel (DakoCytomation)* para montagem das lâminas.

As lâminas foram visualizadas em Microscopia de Fluorescência com fluorescência de coloração verde (*FITC*). As instruções adotadas nesta técnica foram obtidas segundo as recomendações da *ABCAM* e feita a adaptação do protocolo descrito por *Halasz et al* (34).

3.23 Imuno-histoquímica

Aplicamos a metodologia de IHQ em amostras de PBMC e biópsia hepática de pacientes HIV-HCV co-infectados positivos e negativos no plasma para GBV-C RNA e E2.

Após o pré-tratamento anteriormente descrito, foi adicionado o anticorpo primário *Mouse Monoclonal [425] to Hepatitis G Virus (ab24216) (ABCAM)* com especificidade para o antígeno E2 do envelope do GBV-C em uma diluição de 1:10, 1:50 e 1:100 em tampão PBS - 1% albumina (BSA - *Bovine serum albumin*). Após incubação overnight, utilizamos o sistema LSAB + System-HRP (*DakoCytomation*).

3.24 Inferência estatística

Os resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram expressos através da análise descritiva com média e desvio padrão. Para a análise comparativa dos resultados foi utilizado o teste não-paramétrico *U* de Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *SPSS*, versão 13.0. Adotou-se o *p* valor de 0,05 (5%) como nível de significância estatística. Os resultados de biópsia hepática foram laudados pela Prof^a Dra. Valéria P. Lanzoni e as imagens de Imunofluorescência foram gentilmente fotografadas pelo Ricardo Bertolla utilizando o Microscópio Olympus BX51 equipado com contraste de interferência diferencial (DIC) e módulo de epifluorescência com régua de filtros para iodeto de propídeo (PI) e fluoresceína isotiocianato (*FITC*) e com câmera refrigerada Olympus DP71 de 12,5 MPixels. Imagens tratadas em ImagePro Plus 6.1.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil geral da coorte

Foram incluídos 20 pacientes com indicação de biópsia hepática, todos HIV-1 soropositivos e co-infectados pelo HCV. Tinham média de idade de 43,0 (6,2) anos, 55% (11/20) eram do gênero masculino e 40% (8/20) tinham exposição parenteral, sendo essa uma característica da coorte (Tabela 1), o que reflete o uso de drogas injetáveis e/ou transfusão de sangue antes de 1992. Os desvios-padrão serão expressos em parênteses.

N = 20			
Variável		N	%
Gênero	Masculino	11	55
	Feminino	9	45
Exposição ao HIV	Sexual	8	30
	Parenteral	8	40
	Não-identificado	4	30
Doença definidora de AIDS	Sim	6	30
	Não	14	70

Tabela 1. Perfil geral da amostra quanto ao gênero, forma de exposição ao HIV e antecedente de doença definidora de AIDS.

A média geral da coorte referente ao tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV foi de 8,2 (3,8) anos. Do total de pacientes, 80% (16/20) estavam sob uso de TARV (terapia antirretroviral) e 85% (17/20) apresentaram níveis indetectáveis de RNA do HIV pela metodologia de bDNA. As contagens de linfócitos T CD4 e CD8 apresentaram-se relativamente altas, com média geral de 522,8 (246,2) céls/mm³ e 912,1 (506,6) céls/mm³ (Tabela 2), respectivamente.

N = 20					
Variável	Média	Desvio padrão	Mediana	Máximo	Mínimo
Tempo HIV (meses)	8,20	3,84	7,0	15	4
CV HIV log¹⁰	0,59	1,43	0	4	0
CD4⁺ céls/mm³	522,8	246,2	463,0	1280	258
CD8⁺ céls/mm³	912,1	506,6	820,0	2507	121

Tabela 2. Perfil geral da amostra quanto ao tempo de diagnóstico de infecção pelo HIV, carga viral do HIV, contagem de linfócitos T CD4 e CD8.

Os resultados quantitativos da carga viral de HCV em log¹⁰ dos 20 pacientes foram resumidos na Tabela 3. O valor médio da carga viral do HCV da coorte foi de 4,56 (1,64) em log¹⁰. Dos 20 pacientes HIV-HCV analisados, dois apresentaram níveis indetectáveis da carga viral do HCV (<200UI/mL) pela metodologia de RT-PCR quantitativo em Tempo Real PCR (*Real time PCR*) – *TaqMan*.

1	5,32	11	5,52
2	0	12	5,1
3	5,26	13	3,75
4	5,52	14	5,66
5	5,91	15	4,82
6	4,28	16	4,56
7	4,84	17	4,9
8	5,77	18	4,68
9	5,35	19	0
10	5,07	20	4,87

Quadro 8. Carga viral do HCV em log¹⁰ dos 20 pacientes.

A genotipagem foi solicitada para todos os pacientes, sendo em sua maioria portadores do genótipo 1a, conforme ilustrado na Gráfico 1. Dos 20 pacientes, 20% (4/20) tiveram o genótipo não-identificado.

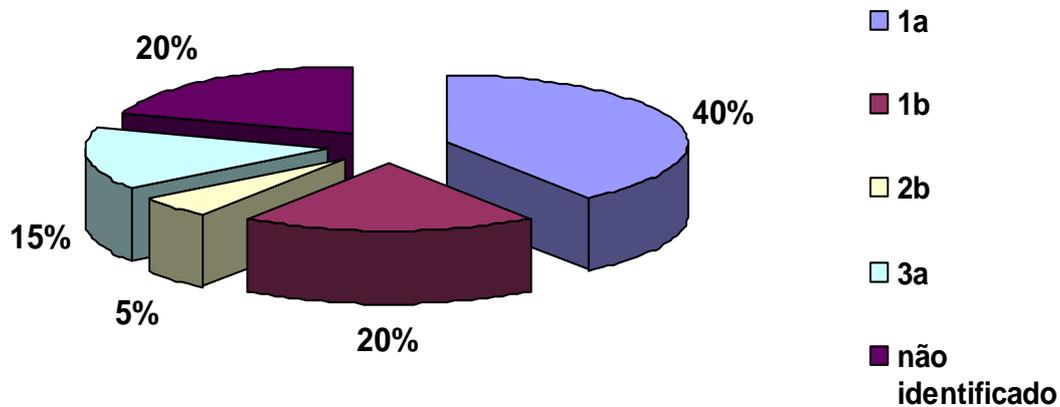


Gráfico 1. Distribuição dos genótipos do vírus da Hepatite C encontrados na coorte.

Para o rastreamento de hepatites e avaliação de uma possível lesão hepatocítica, foi avaliado o nível de AST, assim como a determinação da atividade sérica da ALT e GGT (Tabela 4), úteis na avaliação de hepatopatias segundo os princípios do AU640™ (*Chemistry Immuno Analyzer - OLYMPUS®*). O consumo de álcool foi declarado por 25% (5/20) dos pacientes; 40% (8/20) afirmaram não consumir, 15% (3/20) são ex-etilistas e 20% (4/20) não houve resposta declarada.

Segue abaixo a análise descritiva da coorte referente aos três marcadores bioquímicos:

N = 20					
Variável	Média	Desvio padrão	Mediana	Máximo	Mínimo
AST (até 32U/L)*	48,05	32,5	39,5	139	18
ALT (até 31U/L)*	63,3	55,0	48,5	220	12
GGT (1 a 24U/L)*	104,8	94,2	78,0	413	21

*Valores de referência do Laboratório Central – Hospital São Paulo/UNIFESP

Tabela 3. Perfil bioquímico da coorte.

4.2 Análise histopatológica da coorte

Todas as biópsias foram laudadas pela Prof^a Dr. Valéria P. Lanzoni do Departamento de Anatomia Patológica – UNIFESP conforme a classificação da Sociedade Brasileira de Patologia. Os achados anatomopatológicos da coorte estão representados no Tabela 5.

Fígado reacional	20% (4/20)
Hepatite Crônica	
- Hepatite sem atividade de interface	20% (4/20)
- Hepatite de interface discreta	30% (6/20)
- Hepatite de interface moderada	10% (2/20)
Esteatose	5% (1/20)
Esteato-hepatite	5% (1/20)
Dentro das normalidades	5% (1/20)
Material exíguo para avaliação histológica	5% (1/20)

Quadro 9. Características histopatológicas da coorte.

Os pacientes com diagnóstico de fígado reacional representaram 20% (4/20) da coorte e apresentaram alterações tidas como mínimas ou marginais (Gráfico 2a). Vinte por cento (4/20) tinham hepatite crônica sem atividade de interface e apresentavam estadiamento entre 0 e 1, Infiltrado inflamatório portal (IIP) entre 2 e 3, atividade periportal (APP) 0 e atividade parenquimatosa (AP) entre 0 e 2 (Gráfico 2b). Trinta por cento (6/20) tinham hepatite crônica com discreta atividade de interface e apresentavam E entre 0 e 2, IIP 2, APP 2 e AP entre 1 e 2 (Gráfico 2c). Dez por cento (2/20) tinham hepatite crônica com moderada atividade de interface com estadiamento 1, IIP entre 2 e 3, APP 3 e AP entre 2 e 3 (Gráfico 2d).

Esteatose macro e microvesicular estiveram presente em 5% (1/20) das biópsias, da mesma forma que a esteato-hepatite em 5% (1/20). Uma das biópsias estava representada por tecido hepático dentro dos limites da normalidade e em uma o material era pouco representativo para análise histológica.

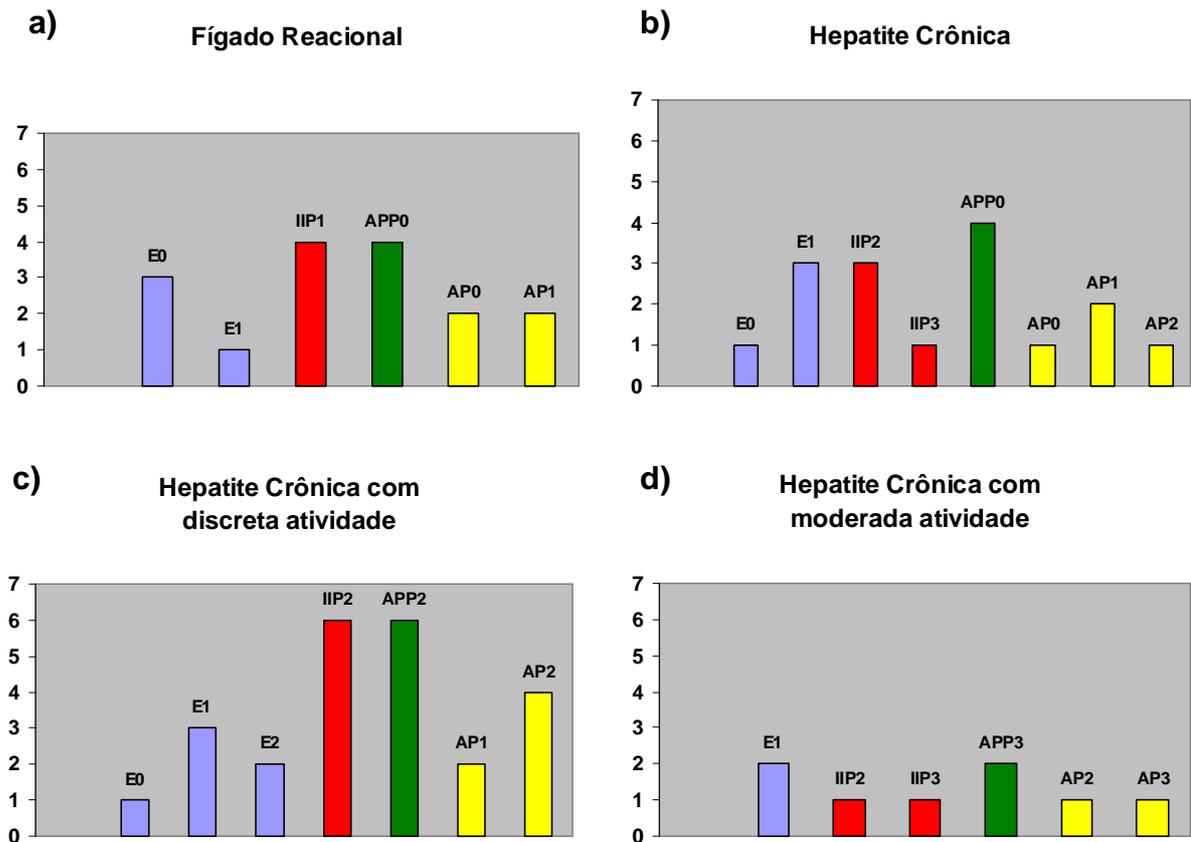


Gráfico 2. Biópsia hepática. (a) Fígado Reacional. (b) Hepatite Crônica sem atividade de interface. (c) Hepatite Crônica com discreta atividade de interface. (d) Hepatite Crônica com moderada atividade de interface.

4.3 Testes histopatológicos e com PBMC

4.3.1 RT-PCR *in situ*

Uma alíquota da bolsa de plasma foi testada em duplicata pela metodologia de RT-PCR qualitativo padronizado pela Sousa, VKA. Como demonstrado na Figura 7, os *primers* apresentaram boa atividade e realmente amplificaram a uma região de 64bp, o que tornava mais segura a possível positividade nos testes sequenciais.

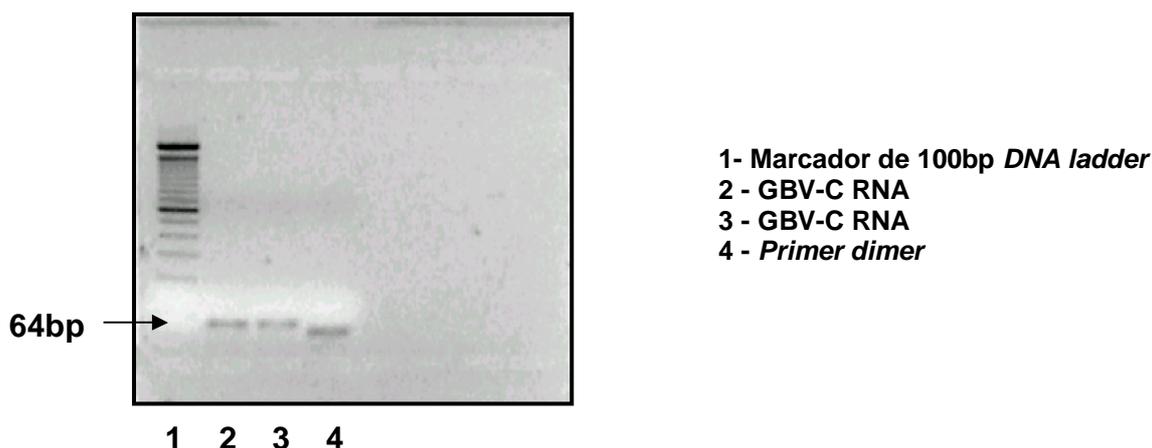


Figura 7. Padronização para Controle Positivo do RT-PCR *in situ*.

Foram realizados inúmeros testes para detecção do GBV-C no tecido hepático, porém os resultados foram inconclusivos. Em alguns testes observou-se imunocoloração citoplasmática, em outros a imunocoloração foi nuclear, tanto em amostras oriundas de pacientes sabidamente positivos no plasma, quanto nos negativos. Portanto, esta metodologia não foi capaz de detectar a presença de GBV-C no tecido.

Outros testes foram realizados com a biópsia hepática de um paciente com testes positivos para RT-PCR qualitativo utilizando Bloqueadores de Proteínas (*DakoCytomation*) e de Biotina-Avidina (*Biogen*), mas não houve resultados diferentes dos citados acima.

O RNA de uma amostra de biópsia hepática parafinada foi extraído de um paciente conhecidamente co-infectado pelo HIV-HCV utilizando o Kit *RNeasy FFPE* – *QIAGEN*, que integra purificação rápida e efetiva eliminação de contaminação com DNA de tecidos parafinados e preparações histológicas, segundo suas especificações. A eluição final da extração foi quantificada quanto à presença do vírus da Hepatite C, que por sua vez, é hepatotrópico, utilizando a metodologia de Real Time - PCR – TaqMan (<200UI/mL).

4.3.2 Controle: Análise de expressão do GAPDH

O RNA total foi extraído do corte de tecido hepático emblocado em parafina e PBMC de pacientes conhecidamente positivos para GBV-C testados em plasma. Sabe-se que o gene constitutivo - GAPDH - apresenta ampla expressão na maioria dos tecidos e foi utilizado como controle positivo de RNA celular. A dúvida frente aos experimentos realizados era se a fixação em formol implicaria apenas na preservação de RNA e também de genes normalmente encontrados em mamíferos. O resultado da RT-PCR comprovou que a extração de RNA e o cDNA foram eficientes e demonstrou que o RNA analisado (GAPDH) estava presente no fígado e PBMC e os *primers* amplificaram a uma região de 120bp.

Como demonstrado na Figura 8 a amplificação representada pela banda 3 foi “fracamente positiva”, o que sugere maior degradação de RNA o que pode influenciar na detecção do RNA do GBV-C em tecido hepático emblocado em parafina, além do fato de possuir carga viral baixa (59); diferente da banda 4 com RNA extraído de PBMC.

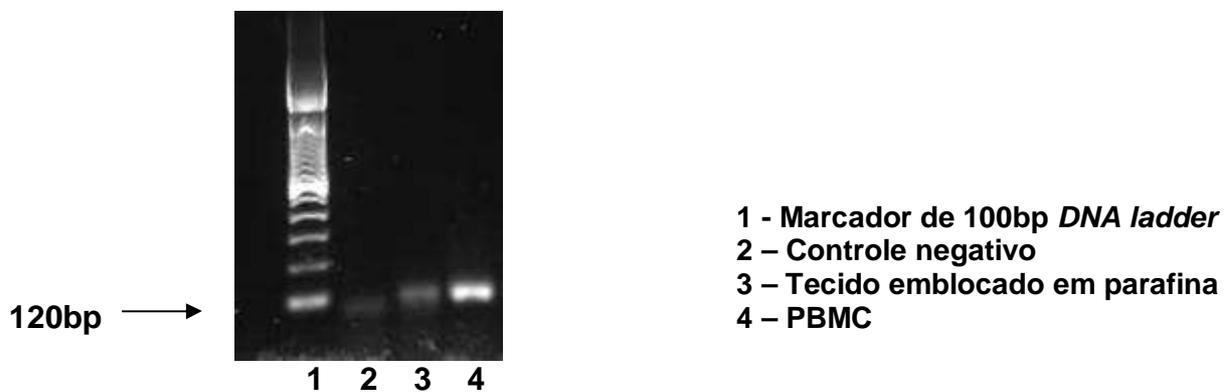


Figura 8. Padronização para Controle Interno com GAPDH.

4.3.3 RT-PCR qualitativo em PBMC

A técnica de RT-PCR qualitativo utilizando amostras de PBMC foi realizada conforme padronização de Alves-Sousa VK com algumas adaptações, sendo o plasma

o único controle positivo disponível, gentilmente fornecido pelo Prof^o Dr. José Eduardo Levi do Instituto de Medicina Tropical – USP.

O RNA foi extraído do PBMC de pacientes positivos e negativos para GBV-C no plasma utilizando o *QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®)*. Infelizmente, não obtivemos resultados tão satisfatórios, uma vez que o controle positivo (plasma) para GBV-C não foi amplificado e, mesmo com a presença de bandas inespecíficas, os *primers* amplificaram a 452bp conforme a Figura 9, o que coloca o PBMC como um possível sítio de replicação do GBV-C. Devido à manipulação com outro material biológico (PBMC), ao invés do plasma, seria necessária a padronização do RT-PCR qualitativo para confirmar tal amplificação utilizando PBMC sabidamente positivo para GBV-C como controle. As bandas não se encontram bem dispostas devido ao uso do reagente *Gel Red (Invitrogen)*, em substituição ao brometo de etídeo.

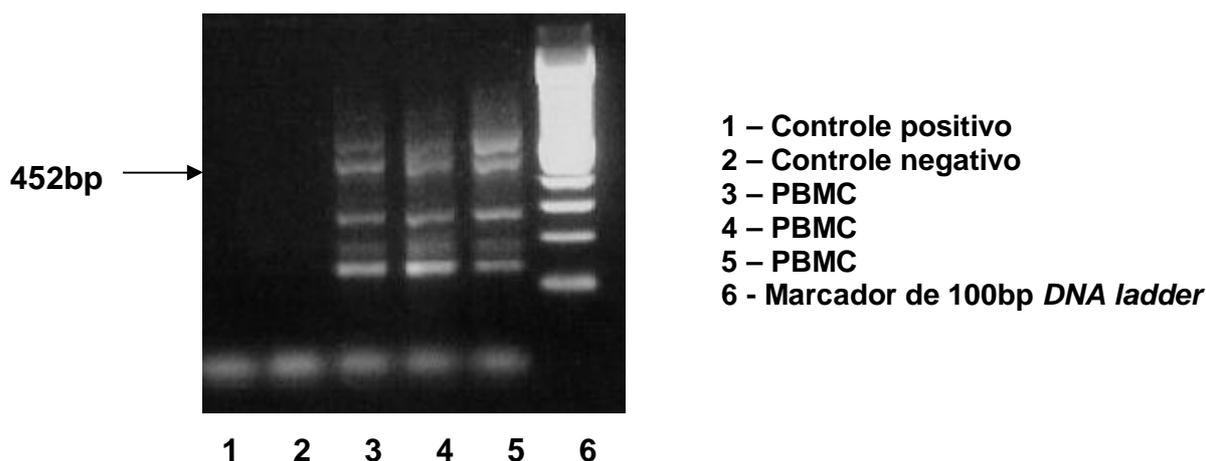


Figura 9. RT-PCR qualitativo em PBMC.

4.3.4 Imunofluorescência Indireta *in house* e Imuno-histoquímica

As diluições de 1/10 para o anticorpo primário – *Mouse Monoclonal [425] to Hepatitis G Virus (ab24216)* - e de 1/4000 para o anticorpo secundário – *Goat Polyclonal to Mouse IgG – H&L (FITC) (ab6785)* – foram as concentrações mais adequadas na padronização da Imunofluorescência Indireta *in house*.

A detecção do anticorpo primário específico para a proteína E2 do GBV-C corado com FITC foi discordante nos diferentes grupos pré-estabelecidos para a

padronização da técnica. Para fase inicial de padronização, realizamos o teste nos grupos HIV-HCV-GBV-C RNA, HIV-HCV-GBV-C E2, HIV-HCV e HIV. Todas as lâminas contendo células (PBMC) de cada um dos pacientes dos respectivos grupos apresentaram sinais de positividade. Na Imuno-histoquímica também obtivemos resultados inconclusivos como na Imunofluorescência Indireta.

4.4 Marcadores de infecção pregressa e atual pelo GBV-C

Dos 20 pacientes HIV-HCV co-infectados incluídos neste estudo com indicação para biópsia hepática, 70% (14/20) foram negativos quanto à presença de marcadores do GBV-C e 30% (6/20) possuíam algum marcador de infecção (Gráfico 3). Destes, 15% (3/20) apresentavam positividade ao teste de ELISA para determinação qualitativa de anticorpos da proteína E2 do GBV-C (HIV-HCV-GBV-C E2). Os demais 15% (3/20) foram positivos quanto à presença de RNA do GBV-C (grupo HIV-HCV-GBV-C RNA) em plasma pela metodologia de RT-PCR qualitativo *in house*.

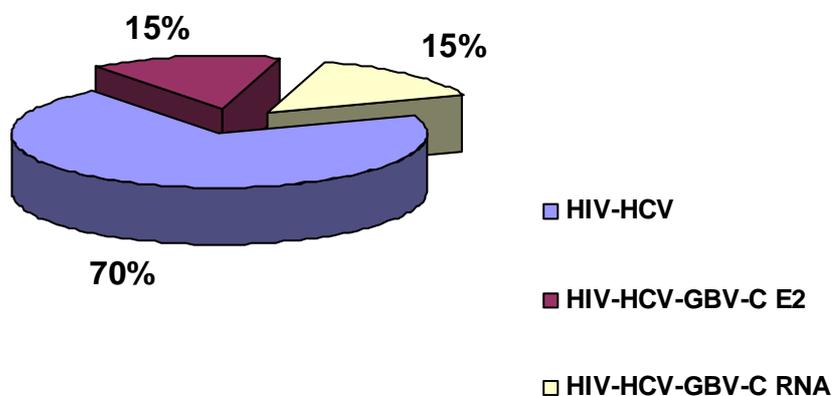


Gráfico 3. Distribuição dos marcadores do GBV-C na coorte.

4.5 Comparação entre grupos com variáveis histológicas

A análise histológica da coorte foi subdividida em grupos de acordo com a presença ou ausência de marcadores GBV-C. Segue abaixo (Tabela 6) os scores de cada grupo quanto ao E, APP e AP.

Características Histopatológicas	HIV-HCV N=10	HIV-HCV- GBV-C RNA N=3	HIV-HCV- GBV-C E2 N=3
Estadiamento			
0	4	0	1
1	5	2	2
2	1	1	0
3	0	0	0
Atividade peri-portal			
0	6	1	1
1	0	0	0
2	2	2	2
3	2	0	0
Atividade parenquimatosa			
0	2	0	1
1	3	3	0
2	4	0	2
3	1	0	0

Tabela 4. Estadiamento e atividade necro-inflamatória nas biópsias com diagnósticos de Hepatite crônica e Fígado reacional de pacientes co-infectados pelo HIV-HCV comparados aos que apresentam positividade para o GBV-C RNA/E2.

O grupo HIV-HCV-GBV-C RNA é o único em relação aos outros que apresentou carga viral do HIV indetectável e não apresentou qualquer observação que demonstrasse aumento de células T CD4 e CD8. Talvez, na tripla infecção com o HIV e HCV, o GBV-C se expresse de outra maneira pela possível competição com o HIV e pela representação familiar com o HCV.

4.6 Comparação entre os grupos com ou sem marcadores do GBV-C

Foi realizada a comparação entre os 20 pacientes HIV-HCV co-infectados biopsiados, utilizando o teste não-paramétrico *Mann-Whitney*, para observar se há diferença significativa entre ter a infecção pelo GBV-C (pregressa ou atual) e nunca ter entrado em contato com o vírus.

Considerando o valor de p de 0,05 (5%) como nível de significância, houve diferença estatística entre os grupos HIV-HCV-GBV-C E2 de 559,3 (137,9) céls/mm³ versus HIV-HCV-GBV-C RNA de 327,0 (61,0) céls/mm³ quanto ao CD4 com $p=0,050$. Houve também tendência estatística entre os grupos HIV-HCV de 556,93 (273,3)

céls/mm³ versus HIV-HCV-GBV-C RNA de 327,0 (61,0) céls/mm³ quanto ao CD4 com $p=0,059$ e a CV do HCV de $4,81\log^{10}$ versus $3,18\log^{10}$ respectivamente, com $p=0,089$. Os grupos com valores zero e sem valor p são os que não apresentaram carga viral e não houve comparação. Os dados estatísticos de cada grupo estão disponíveis nas Tabelas 7, 8 e 9.

Variáveis	HIV-HCV	HIV-HCV	P
	n=14	GBV-C E2 n=3	
CV HIV \log^{10}	0,57 (1,45)	1,27 (2,19)	0,449
CV HCV \log^{10}	4,81 (1,50)	4,76 (0,17)	0,166
CV GBV-C \log^{10}	0	0	-
CD4 ⁺ céls/mm ³	556,9 (273,3)	559,3 (137,9)	0,529
CD8 ⁺ céls/mm ³	953,2 (582,3)	928,3 (288,9)	0,801
AST (até 32U/L)*	46,1(28,3)	40,0 (14,8)	1,0
ALT (até 31U/L)*	55,5 (45,7)	62,7 (43,9)	0,613
GGT (1 a 24U/L)*	102,6 (66,6)	56,3 (16,0)	0,231

*Valores de referência do Laboratório Central – Hospital São Paulo/UNIFESP
Tabela 5. Comparação entre os grupos HIV-HCV e HIV-HCV-GBV-C E2.

Variáveis	HIV-HCV	HIV-HCV	P
	n=3	GBV-C RNA n=3	
CV HIV \log^{10}	0,57 (1,45)	0	-
CV HCV \log^{10}	4,81 (1,50)	3,18 (2,75)	0,089
CV GBV-C \log^{10}	0	4,06 (0,47)	-
CD4 ⁺ céls/mm ³	556,9 (273,3)	327,0 (61,0)	0,059
CD8 ⁺ céls/mm ³	953,2 (582,3)	704,0 (270,0)	0,313
AST (até 32U/L)*	46,1 (28,3)	65,3 (63,8)	0,850
ALT (até 31U/L)*	55,5 (45,7)	100,3 (103,7)	0,613
GGT (1 a 24U/L)*	102,6 (66,6)	163,0 (216,7)	0,614

*Valores de referência do Laboratório Central – Hospital São Paulo/UNIFESP
Tabela 9. Comparação entre os grupos HIV-HCV e HIV-HCV-GBV-C RNA.

Variáveis	HIV-HCV GBV-C E2 n=3	HIV-HCV GBV-C RNA n=3	p
CV HIV log ¹⁰	1,27 (2,19)	0	-
CV HCV log ¹⁰	4,76 (0,17)	3,18 (2,75)	0,513
CV GBV-C log ¹⁰	0	4,06 (0,47)	-
CD4 ⁺ céls/mm ³	559,3 (137,9)	327,0 (61,0)	0,050
CD8 ⁺ céls/mm ³	928,3 (288,9)	704,0 (270,0)	0,275
AST (até 32U/L)*	40,0 (14,8)	65,3 (63,8)	0,827
ALT (até 31U/L)*	62,7 (43,9)	100,3 (103,7)	0,827
GGT (1 a 24U/L)*	56,3 (16,0)	163,0 (216,7)	0,827

*Valores de referência do Laboratório Central – Hospital São Paulo/UNIFESP
Tabela 6. Comparação entre os grupos HIV-HCV-GBV-C E2 e RNA.

5 DISCUSSÃO

O estudo em questão apresentou um número de pacientes relativamente reduzido o que pode ter influenciado na significância dos resultados. Os fatores determinantes para tal deficiência podem ter sido o critério de inclusão, campo de coleta e o período da última biópsia, ou seja, o critério desenhado no Projeto restringia a inclusão a pacientes HIV soropositivos co-infectados apenas pelo HCV, com idade entre 18 a 70 anos, uma vez que os pacientes com idade mais elevada e com maior tempo de infecção pelo HCV apresentam lesão histológica muito avançada e que poderiam influenciar na análise.

Outro determinante citado é o fato da coleta se restringir apenas ao Centro Ambulatorial da Disciplina de Infectologia – UNIFESP. Inicialmente, partindo de informações disponíveis do Ambulatório, fez-se a estimativa de que haveria cerca de 300 a 400 pacientes co-infectados pelo HIV-HCV. Isso deveria gerar uma demanda por biópsias da ordem de 30 a 40, na experiência descrita informalmente pelos colegas do Ambulatório. Isso não se revelou dessa forma, em parte porque havia muitos registros duplicados, em parte porque houve descentralização do atendimento e, finalmente, porque o número de biópsias que pode ser realizado nas condições reais, com limitações de leitos é pequeno e precisa ser distribuído entre pacientes co-infectados pelo vírus da hepatite B ou com outras co-morbidades.

Talvez a inclusão de outros Centros de referência aumentasse o *n* de pacientes e teríamos uma análise mais satisfatória. Além disso, alguns dos pacientes passíveis de inclusão no Projeto vinculando HIV soropositivos co-infectados pelo HCV já tinham sido biopsiados anteriormente e, por não possuírem indicação clínica para realização de nova biópsia, acabaram não sendo incluídos, fazendo então com que conseguíssemos um total de 20 pacientes.

O GBV-C é frequentemente encontrado em seres humanos e, aproximadamente 5% dos doadores de sangue apresenta replicação ativa (GBV-C RNA) do vírus. Assumindo que este vírus seja apatogênico, as triagens sorológicas não são mais realizadas nos Bancos de sangue. Devido à similaridade nas vias de transmissão, a co-infecção do GBV-C com o HIV é extremamente comum. A co-infecção HIV-GBV-C ocorre entre 14-45% em homens homossexuais e usuários de drogas injetáveis (62, 63).

Os dois marcadores para a infecção do GBV-C são representados pela viremia, determinada pelo método de RT-PCR e pela presença de anticorpos, identificados por meio da técnica de ELISA. Em média, 30-65% dos pacientes HIV soropositivos têm anticorpos E2 do GBV-C, o que indica contato anterior com o vírus e, na maioria dos casos há um *clearance* da viremia. Embora seja rara a presença simultânea do GBV-C RNA e E2, é possível a detecção dos dois marcadores como um estado de transição (64).

Além do sugestivo efeito benéfico do GBV-C em pacientes HIV soropositivos, alguns estudos demonstraram o mesmo efeito em pacientes com infecção pelo GBV-C e HIV soropositivos co-infectados pelo vírus Hepatite C, em sua forma crônica. Alta prevalência de associação entre HCV e GBV-C pode ser, assim como o HIV, decorrente do fato de serem transmitidos pelas mesmas vias (65)-(66).

Neste estudo, 55% (11/20) dos pacientes HIV soropositivos co-infectados pelo HCV incluídos na coorte são do gênero masculino com idade média de 43,0 (6,2) anos e, 40% (8/20) destes tinham exposição parenteral, o que reflete o uso de drogas injetáveis e/ou transfusão de sangue antes de 1992. Dos 20 pacientes HIV-HCV co-infectados, apenas 30% possuíam algum marcador de infecção pelo GBV-C sendo 15% (3/20) com positividade para o teste de anticorpos (ELISA) que determina a reatividade contra a proteína E2 do GBV-C e, os demais 15% dos pacientes apresentaram viremia pelo GBV-C (RNA).

O HIV e o HCV são ambos vírus RNA e conduzem à infecção subclínica crônica, apresentam genomas altamente polimórficos como consequência de altos níveis de mutações (67). A co-infecção HIV-HCV induz a um pior prognóstico, dificultando a resposta imunológica do hospedeiro, essa debilitação conduz à evolução da infecção pelo HCV e rápido curso da infecção reduzindo o comprometimento hepático de trinta para sete anos (68, 69).

O valor médio da carga viral do HCV de 18 pacientes incluídos na coorte foi de 4,56 (1,64) em \log^{10} e, apenas dois apresentaram níveis indetectáveis (<200UI/mL). Dos vinte pacientes, 40% (8/20) apresentam genótipo 1a, com característica de maior causador de lesão hepática enquanto que o genótipo 3a, presente em 15% (3/20) dos pacientes, é um dos fatores que induz o desenvolvimento de esteatose com Hepatite C.

No estudo de Strauss *et al.* a prevalência de co-infecção HCV-GBV-C foi de 15,2% sendo que, a maior parte dos pacientes, apresentava-se com lesão hepática discreta. Não se encontraram diferenças estatísticas entre os grupos (com e sem

marcadores do GBV-C) e, apesar de menor grau de inflamação em todas as áreas analisadas nos casos de co-infecção HCV-GBV-C, o GBV-C não foi um fator indutor de surgimento de lesão hepática (70).

Os pacientes HIV-HCV quando analisados histologicamente apresentaram estadiamento entre 0 e 2, APP entre 0 e 3 e AP entre 0 e 3. Dos vinte pacientes pertencentes à coorte, 15% (3/20) apresentaram viremia para GBV-C com estadiamento entre 1 e 2, APP entre 0 e 2 e AP 1. Mesmo em uma análise simples dos dados, sem diferenças estatísticas entre os grupos e com n reduzido, pôde-se analisar que, mesmo com *scores* não tão elevados, os pacientes com viremia pelo GBV-C (RNA) apresentam menor grau de inflamação em resposta ao HCV. Além disso, o grupo HIV-HCV-GBV-C RNA apresentou média de carga viral do HCV de 3,18 (2,75) \log^{10} , sendo a menor encontrada quando comparada com os outros grupos.

Um outro dado encontrado foi a tendência estatística a níveis de CD4 mais elevados em pacientes HIV-HCV quando comparados com o grupo de pacientes HIV-HCV-GBV-C RNA com p valor de 0,059. Schwarze-Zander *et al.*, demonstraram a influência do GBV-C (RNA ou E2) em 111 pacientes HIV-HCV co-infectados e observaram que o genótipo 2 do GBV-C pode estar associado com o aumento de CD4 neste grupo de pacientes (HIV-HCV-GBV-C) (71). Sendo assim, cabe ressaltar que estudos futuros com uma casuística maior e identificação de outros fatores como o genótipo do GBV-C devem ser conduzidos para focar mais detalhadamente essa associação.

Alguns autores demonstraram a presença do GBV-C no tecido hepático (6, 18, 31) e, além disso o genoma do GBV-C apresenta alto grau de homologia em relação do HCV. Para evitar reação cruzada com o HCV RNA, foi adotada a técnica de RT-PCR *in situ* neste estudo por ser o método mais sensível e, da forma como foram desenhados os *primers*, mais específico do que a Hibridização *in situ*, levou-se em consideração que a carga viral do GBV-C é baixa, limitando sua detecção (4, 59).

Foram utilizados *primers* da região conservada 5' UTR do GBV-C, mas os resultados não foram os esperados, mesmo após várias tentativas, com adaptações na técnica de RT-PCR *in situ*. Esta perda da sensibilidade poderia estar relacionada à falta de preservação do RNA em decorrência da utilização de formol não tamponado para a fixação do espécime de biópsia ou ao próprio processamento do tecido e inclusão em parafina.

Para se testar tal intercorrência, extraímos o RNA de tecido hepático emblocado em parafina de um paciente conhecidamente positivo para HCV quantificado segundo a metodologia de *Real Time – PCR - TaqMan* (<200UI/mL) não sendo possível a quantificação do vírus nesse material. O GBV-C em biópsias emblocadas em parafina poderia, com mais justificativa, não fornecer resultados conclusivos.

Para reforçar a idéia de que o procedimento pré-analítico da biópsia pode ter contribuído para a falta de detecção do GBV-C no tecido hepático no material parafinado foi realizada a análise da expressão do gene constitutivo (GAPDH) como controle interno. Observou-se que a amplificação do *primer* do GAPDH em material parafinado se deu de forma “fracamente positiva” (Figura 8), diferentemente do esperado, sugerindo possível interferência da fixação e processamento histológico na reação .

De fato, a integridade do RNA em tecido emblocado em parafina foi extremamente reduzida e, como resultado disso, foi difícil a extração de RNA intacto suficiente para análise mesmo utilizando o kit *RNeasy FFPE* (QIAGEN®) que fornece condições para extração de RNA total de amostra parafinada sem a necessidade de incubação *overnight* ou digestão com DNase.

Na Imunofluorescência Indireta, obtivemos resultados discordantes, uma vez que as lâminas contendo células (PBMC) de pacientes HIV-HCV e, negativos para GBV-C RNA/E2 no plasma, bem como as lâminas de pacientes apenas HIV soropositivos apresentaram falsa positividade nos resultados. Tentou-se a detecção do GBV-C pela metodologia de Imuno-histoquímica, porém com resultados inconclusivos. Deve-se ressaltar que o anticorpo que adquirimos não era o mais recomendado para tal metodologia sendo que a maioria das Empresas fabricantes descontinuou sua produção considerando o fato de que o vírus é não-patogênico, não se realizando mais a triagem de sua presença, tornando-se cada vez mais difícil a obtenção de reagentes de identificação do mesmo.

Embora o número de casos estudados seja pequeno, analisando as possibilidades da não detecção do GBV-C no tecido hepático, podemos supor que esse vírus não seja hepatotrópico ou sua carga viral seja extremamente pequena no tecido (59), tornando difícil sua identificação. Novamente, estudos posteriores com coortes mais representativas deveriam ser realizados, avaliando pacientes HCV, HIV soropositivos mono e co-infectados quanto à presença de GBV-C RNA e anti-GBV-C E2, principalmente isentos de terapêutica antirretroviral.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia de RT-PCR *in situ* foi reproduzida para detectar o GBV-C em tecido hepático, porém os resultados foram inconclusivos.
- A metodologia de Imunofluorescência Indireta foi reproduzida para identificar o GBV-C em PBMC apresentando resultados discordantes.
- A infecção pelo GBV-C foi considerada freqüente (30%) na população estudada, sendo que 15% estavam ativamente infectados pelo GBV-C e, os outros 15% tinham evidência sorológica desta infecção no passado.
- Não foi possível estabelecer correlações entre níveis de cargas virais de HIV e GBV-C, provavelmente devido à baixa ocorrência de positividade para HIV RNA nesta população particular.
- Apesar da pequena casuística incluída, observou-se que pacientes com replicação ativa (RNA) pelo GBV-C apresentaram menor grau de lesão histológica e menor carga viral do HCV quando comparados aos pacientes sem infecção ativa, embora essa diferença não atingisse significância estatística.

7 ANEXOS

ANEXO I. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa “Importância Clínica e Impactos Imunológico e Viroológico da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV”.

O vírus da hepatite G foi descoberto em 1995 e acredita-se que não cause doenças. Porém, recentemente alguns pesquisadores descobriram que nas pessoas com infecção pelo HIV, o vírus da hepatite G poderia atrasar a evolução para Aids.

Logo, os objetivos desta pesquisa são:

1. Estimar quantos pacientes tem hepatite G entre os pacientes com infecção pelo HIV e co-infecção pelo HIV e pelo vírus da hepatite C atendidos na Unidade Ambulatorial da DIPA (CCDI) do Hospital São Paulo.
2. Estudar a relação da hepatite G com a imunidade, com a carga viral do HIV, com o estado do fígado e com as características do vírus da hepatite C nas pessoas que tenham também esta infecção.

Caso você participe, será entrevistado (a) para conhecermos seus hábitos de vida e seu histórico médico. A entrevista é individual, com privacidade e sigilo das informações.

Será necessário colher sangue para pesquisarmos o vírus da hepatite G, a carga viral do HIV, a contagem de CD4 e de exame para sabermos se o fígado está inflamado (ALT). Também faremos exame de triagem para hepatite B. A coleta de sangue será feita por punção de veia do antebraço, o que pode causar um pouco de dor, ficar roxo (hematoma) no local ou até causar tontura passageira. No total serão precisos 100mL de sangue, o que corresponde a aproximadamente 10 colheres de sopa de sangue.

Se você tem hepatite C, será necessário colher sangue adicional para exames que vão estudar o vírus da hepatite C. Será necessário mais 20mL de sangue, o que corresponde a aproximadamente 2 colheres de sopa de sangue. Caso os resultados destes exames mostrem que você é um (a) candidato (a) potencial ao tratamento da hepatite C, será necessário fazer uma biópsia do fígado. Este exame consiste em retirar um pequeno pedaço do fígado por punção com uma agulha especial, com auxílio de ultrassom e anestesia local. Pode haver dor durante ou depois do exame e pode acontecer sangramento no fígado que, se for grande, pode levar à necessidade de operação (isto acontece em cerca de 1% das biópsias). Outra complicação possível é a agulha atingir outros órgãos como o pulmão, a vesícula biliar, o intestino ou rim. Se isto acontecer pode ser necessário operar também. Por causa destes riscos você ficará em observação por pelo menos 6h após a biópsia. Caso você já tenha feito biópsia do fígado a um ano da data de hoje, usaremos os resultados desta biópsia na pesquisa.

Em caso de dúvida você pode procurar o investigador principal, que é o Profº Dr. Celso F. H. Granato, na Rua Loefgreen 1588 ou no tel. 55735081. Você também pode procurar o

Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP: Rua Botucatu, 572, 1º andar/cj 14, tel.: 11 5571-1062. Fax: 11 5539-7162. E-mail: cepunifesp@epm.br

Sua participação não é obrigatória e se você não quiser participar não haverá nenhum prejuízo no seu acompanhamento e na sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Caso decida participar, está garantido que o (a) Sr. (a) poderá desistir a qualquer momento, sem motivo ou aviso prévio, também sem prejuízo no seu acompanhamento.

Os dados referentes ao (à) Sr. (a) serão sigilosos e privados, sendo que o (a) Sr. (a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

Não haverá nenhum gasto e você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será paga pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os dados e o material coletado serão utilizados somente para esta pesquisa.

Após ter sido esclarecido (a) sobre a pesquisa, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido (a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Importância Clínica e Impactos Imunológico e Viroológico da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV".

Eu discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome Legível e assinatura do
Pesquisador que obteve o TCLE

Assinatura do Voluntário

São Paulo, _____ de _____ de 200__ .

ANEXO II. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de outubro de 2005.
CEP 1296/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) CELSO FRANCISCO H GRANATO

Co-Investigadores: Graziela de Almeida Lanzara, Viviane Kelly Alves, Giovana Lótici Baggio, Aline de Jesus Barbosa
Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Importância clínica e impactos imunológicos e virológicos da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV"**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco maior do que médio, desconforto intenso, envolvendo coleta de sangue e biópsia hepática.

OBJETIVOS: Estabelecer metodologias para identificação do estado infeccioso de pacientes infectados pelo HIV-1, com relação ao GBV-C/HGV e o HCv. Avaliar o impacto da co-infecção pelos vírus GBV-C/HGV, HCV e HIV-1 em um mesmo paciente, em relação a combinações de co-infecções distintas, em seus aspectos clínicos, bioquímicos, imunológicos, virológicos e histo-patológicos.

RESUMO: Envolvem agentes patogênicos. O estudo será desenvolvido na Unidade Ambulatorial da DIPA/UNIFESP, com colaboração do laboratório de Patologia e de Ginecologia Molecular da UNIFESP. A amostra será constituída de 100 pacientes com infecção pelo HIV e 100 pacientes com co-infecção HIV-HCV entre 18 e 70 anos. Será realizada uma entrevista e coleta de sangue para pesquisa de GBV-C/HGV RNA no plasma, pesquisa de anticorpos anti-E2, contagem de linfócitos T CD4+, população celulares T, níveis séricos de ALT e bioquímica geral. Os pacientes com anti-HCV positivo deverão colher sangue também para pesquisa de HCV RNA e determinação do genótipo do HCV através da análise da região genômica codificadora da proteína do envoltório E1, da proteína core e da proteína não estrutural NS5B. Os participantes com potencial indicação de tratamento anti-HCV serão submetidos à biópsia hepática percutânea guiada por ultra sonografia.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, multidisciplinar, analisando aspectos clínicos, imunológicos e virológicos da co-infecção HIV/HCV/GBV-C-HGV.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos, envolvendo laboratórios especializados com domínio das técnicas empregadas.

TCLE: Adequado, de acordo com a resolução 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R\$ 67 823 + US\$ 17 342,00.

CRONOGRAMA: 18 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado/doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 9/10/2006 e 4/10/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1º andar - conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

ANEXO III. RESULTADO DO TESTE DE ELISA



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Disciplina Infectologia

Departamento de Medicina

Laboratório de Virologia e Imunologia I

SOROLOGIA HGV/GBV-C

Paciente: _____

RG hospitalar: _____

Data: _____

Resultado: _____

Método: ELISA – pesquisa de anticorpos contra a proteína E2 do envelope viral.

Interpretação: A positividade para anticorpos anti-E2 indica infecção progressa e eliminação do vírus.

Responsáveis Técnicos

Giovana L. Zappia

Aline J. Barbosa

**ANEXO IV. COLETA DE DADOS PACIENTES COM
INDICAÇÃO A BIÓPSIA**



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Departamento de Medicina

Disciplina de Infectologia
Laboratório de Imunologia e Virologia

PROTOCOLO DE PESQUISA

Pacientes com indicação a biópsia hepática Projeto GBV-C

RH-HSP: _____
 Data da Biópsia Hepática: ____/____/____ Número da Biópsia: _____
 Nome do paciente: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____
 Idade: _____ Sexo: () M ()
 Nacionalidade: _____

Exposição: () Sexual () Parenteral () Ambos () Não Identificado

Medicação:

Uso de ARV: () S () N
 Início de ARV há: _____
 Esquema ARV atual: _____

Exames Complementares:

AST:	HIV RNA:	log:
ALT:	HCV RNA Quantitativo:	log:
GGT:	Genótipo HCV:	
CD4:	ELISA GBV-C:	
CD8:	RT-PCR GBV-C em plasma:	
	RT-PCR GBV-C em PBMC:	

Anatomopatológico:

Diagnóstico: _____
 Estadiamento: _____
 Infiltrado inflamatório portal: _____
 Atividade peri-portal: _____
 Atividade parenquimatosa: _____
 Marcadores etiológicos: _____

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deinhardt F, Holmes AW, Capps RB, Popper H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med* 1967;125(4):673-88.
2. Deinhardt F, Peterson D, Cross G, Wolfe L, Holmes AW. Hepatitis in marmosets. *Am J Med Sci* 1975;270(1):73-80.
3. Simons JN, Pilot-Matias TJ, Leary TP, Dawson GJ, Desai SM, Schlauder GG, et al. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(8):3401-5.
4. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995;1(6):564-9.
5. Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Dawson GJ, Erker JC, et al. Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *J Virol* 1995;69(9):5621-30.
6. Linnen J, Wages J, Jr., Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996;271(5248):505-8.
7. Zuckerman AJ. The new GB hepatitis viruses. *Lancet* 1995;345(8963):1453-4.
8. Berzsenyi MD, Bowden DS, Roberts SK. GB virus C: insights into co-infection. *J Clin Virol* 2005;33(4):257-66.
9. Stapleton JT, Williams CF, Xiang J. GB virus type C: a beneficial infection? *J Clin Microbiol* 2004;42(9):3915-9.
10. Theodore D, Lemon SM. GB virus C, hepatitis G virus, or human orphan flavivirus? *Hepatology* 1997;25(5):1285-6.
11. Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, Pilot-Matias TJ, Erker JC, Chalmers ML, 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* 1996;48(1):60-7.
12. Stapleton JT. GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis* 2003;23(2):137-48.
13. Polgreen PM, Xiang J, Chang Q, Stapleton JT. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microbes Infect* 2003;5(13):1255-61.
14. George SL, Varmaz D. What you need to know about GB virus C. *Curr Gastroenterol Rep* 2005;7(1):54-62.
15. Simmonds P. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 4):693-712.
16. Simons JN, Desai SM, Mushahwar IK. The GB viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:341-75.

17. Xiang J, Wunschmann S, Schmidt W, Shao J, Stapleton JT. Full-length GB virus C (Hepatitis G virus) RNA transcripts are infectious in primary CD4-positive T cells. *J Virol* 2000;74(19):9125-33.
18. Simons JN, Desai SM, Schultz DE, Lemon SM, Mushahwar IK. Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J Virol* 1996;70(9):6126-35.
19. Okamoto H, Nakao H, Inoue T, Fukuda M, Kishimoto J, Iizuka H, et al. The entire nucleotide sequences of two GB virus C/hepatitis G virus isolates of distinct genotypes from Japan. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 4):737-45.
20. Xiang J, Klinzman D, McLinden J, Schmidt WN, LaBrecque DR, Gish R, et al. Characterization of hepatitis G virus (GB-C virus) particles: evidence for a nucleocapsid and expression of sequences upstream of the E1 protein. *J Virol* 1998;72(4):2738-44.
21. Kaiser T, Tillmann HL. GB virus C infection: is there a clinical relevance for patients infected with the human immunodeficiency virus? *AIDS Rev* 2005;7(1):3-12.
22. Smith DB, Cuceanu N, Davidson F, Jarvis LM, Mokili JL, Hamid S, et al. Discrimination of hepatitis G virus/GBV-C geographical variants by analysis of the 5' non-coding region. *J Gen Virol* 1997;78 (Pt 7):1533-42.
23. Muerhoff AS, Simons JN, Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. Identification of conserved nucleotide sequences within the GB virus C 5'-untranslated region: design of PCR primers for detection of viral RNA. *J Virol Methods* 1996;62(1):55-62.
24. Smith DB, Basaras M, Frost S, Haydon D, Cuceanu N, Prescott L, et al. Phylogenetic analysis of GBV-C/hepatitis G virus. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 3):769-80.
25. Nishiya AS, Ribeiro-dos-Santos G, Bassit L, Focaccia R, Chamone DF, Sabino EC. Genotype distribution of the GB virus C in citizens of Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45(4):213-6.
26. Levi JE, Contri DG, Lima LP, Takaoka DT, Garrini RH, Santos W, et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003;45(2):75-8.
27. Bralet MP, Roudot-Thoraval F, Pawlotsky JM, Bastie A, Tran Van Nhieu J, Duval J, et al. Histopathologic impact of GB virus C infection on chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997;112(1):188-92.
28. Alter HJ, Nakatsuji Y, Melpolder J, Wages J, Wesley R, Shih JW, et al. The incidence of transfusion-associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *N Engl J Med* 1997;336(11):747-54.
29. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J Virol* 1997;71(10):7804-6.
30. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *J Virol* 1998;72(4):3072-5.

31. Kobayashi M, Tanaka E, Nakayama J, Furuwatari C, Katsuyama T, Kawasaki S, et al. Detection of GB virus-C/hepatitis G virus genome in peripheral blood mononuclear cells and liver tissue. *J Med Virol* 1999;57(2):114-21.
32. 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. *J Virol* 1999;73(5):4052-61.
33. Seipp S, Scheidel M, Hofmann WJ, 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* 1999;30(4):570-9.
34. Halasz R, Sallberg M, Lundholm S, Andersson G, Lager B, Glaumann H, et al. The GB virus C/hepatitis G virus replicates in hepatocytes without causing liver disease in healthy blood donors. *J Infect Dis* 2000;182(6):1756-60.
35. Fan X, Xu Y, Solomon H, Ramrakhiani S, Neuschwander-Tetri BA, Di Bisceglie AM. Is hepatitis G/GB virus-C virus hepatotropic? Detection of hepatitis G/GB virus-C viral RNA in liver and serum. *J Med Virol* 1999;58(2):160-4.
36. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L, Petit JC, Lerable J, Thauvin M, et al. Carriage of GB virus C/hepatitis G virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic, and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J Infect Dis* 1999;179(4):783-9.
37. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Nascimento CM, Bassit L, Chamone DF, 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* 2002;21(6):438-43.
38. Moaven LD, Hyland CA, Young IF, Bowden DS, McCaw R, Mison L, et al. Prevalence of hepatitis G virus in Queensland blood donors. *Med J Aust* 1996;165(7):369-71.
39. Lampe E, Saback FL, Viazov S, Roggendorf M, Niel C. Age-specific prevalence and genetic diversity of GBV-C/hepatitis G virus in Brazil. *J Med Virol* 1998;56(1):39-43.
40. Bassit L, Kleter B, Ribeiro-dos-Santos G, Maertens G, Sabino E, Chamone D, et al. Hepatitis G virus: prevalence and sequence analysis in blood donors of Sao Paulo, Brazil. *Vox Sang* 1998;74(2):83-7.
41. Pinho JR, Zanotto PM, Ferreira JL, Sumita LM, Carrilho FJ, da Silva LC, et al. High prevalence of GB virus C in Brazil and molecular evidence for intrafamilial transmission. *J Clin Microbiol* 1999;37(5):1634-7.
42. Feucht HH, Zollner B, Polywka S, Knodler B, Schroter M, Nolte H, et al. Prevalence of hepatitis G viremia among healthy subjects, individuals with liver disease, and persons at risk for parenteral transmission. *J Clin Microbiol* 1997;35(3):767-8.
43. Frey SE, Homan SM, Sokol-Anderson M, Cayco MT, Cortorreal P, Musial CE, et al. Evidence for probable sexual transmission of the hepatitis g virus. *Clin Infect Dis* 2002;34(8):1033-8.
44. Seifried C, Weber M, Bialleck H, Seifried E, Schrezenmeier H, Roth WK. High prevalence of GBV-C/HGV among relatives of GBV-C/HGV-positive blood donors in blood recipients and in patients with aplastic anemia. *Transfusion* 2004;44(2):268-74.

45. Muerhoff AS, Simons JN, Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Pilot-Matias TJ, et al. Sequence heterogeneity within the 5'-terminal region of the hepatitis GB virus C genome and evidence for genotypes. *J Hepatol* 1996;25(3):379-84.
46. Lo SY, Ku CW, Ma HC, Li YH, Yu JH, Lin HH, et al. Detection of serologic responses to GB virus C/hepatitis G virus infection. *Int J Infect Dis* 2002;6(3):223-7.
47. Madejon A, Fogeda M, Bartolome J, Pardo M, Gonzalez C, Cotonat T, et al. GB virus C RNA in serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B, C, and D. *Gastroenterology* 1997;113(2):573-8.
48. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;17(3):209-13.
49. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2001;345(10):715-24.
50. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, 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* 2003;139(1):26-30.
51. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2001;345(10):707-14.
52. Nattermann J, Nischalke HD, Kupfer B, Rockstroh J, Hess L, Sauerbruch T, et al. Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *Aids* 2003;17(10):1457-62.
53. Cormier EG, Tsamis F, Kajumo F, Durso RJ, Gardner JP, Dragic T. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(19):7270-4.
54. Ferraz MLG, Schiavon JN, AEB S. *Guia de Hepatologia*. Barueri (SP); 2007.
55. Gayotto LCC & Comitê SBP / SBH. *Visãohistórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas*. Projeto do Clube de Patologia Hepática da Sociedade Brasileira de Patologia aprovado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia. *GED* 2000;19(3):137-40.
56. Willems M, Moshage H, Nevens F, Fevery J, Yap SH. Plasma collected from heparinized blood is not suitable for HCV-RNA detection by conventional RT-PCR assay. *J Virol Methods* 1993;42(1):127-30.
57. Yirrell DL, Wright E, Shafer LA, Campbell E, Van der Paal L, Kaleebu P, et al. Association between active GB virus-C (hepatitis G) infection and HIV-1 disease in Uganda. *Int J STD AIDS* 2007;18(4):244-9.
58. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-503.

59. Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, Collins M, Hassoba HM, et al. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: evidence that hepatitis G virus is not hepatotropic. *Hepatology* 1998;27(3):877-80.
60. Ohbayashi H, Tanaka Y, Ohoka S, Kusano F, Goto M, Marumo F, et al. Identification of hepatitis G virus (GB virus C) in the liver using in situ polymerase chain reaction. *Liver* 2000;20(5):421-2.
61. Castelain S, Francois C, Bonte D, Baron A, Horle B, Morel V, et al. Epidemiological and quantitative study of GBV-C infection in french polytransfused children. *J Med Virol* 2004;73(4):596-600.
62. Lau DT, Miller KD, Detmer J, Kolberg J, Herpin B, Metcalf JA, et al. Hepatitis G virus and human immunodeficiency virus coinfection: response to interferon-alpha therapy. *J Infect Dis* 1999;180(4):1334-7.
63. Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, et al. Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;23(1):89-94.
64. Thomas DL, Vlahov D, Alter HJ, Hunt JC, 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* 1998;177(3):539-42.
65. Yeo AE, Matsumoto A, Hisada M, Shih JW, Alter HJ, Goedert JJ. Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann Intern Med* 2000;132(12):959-63.
66. Berzsenyi M, Bowden S, Watson K, et al. Program and abstracts of the 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; October 27-31, 2006; Boston, Massachusetts. Abstract 251
67. Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998;351(9099):351-5.
68. Rodriguez-Rosado R, Perez-Olmeda M, Garcia-Samaniego J, Soriano V. Management of hepatitis C in HIV-infected persons. *Antiviral Res* 2001;52(2):189-98.
69. Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World J Gastroenterol* 2002;8(4):577-9.
70. Strauss E, da Costa Gayotto LC, Fay F, Fay O, Fernandes HS, Fischer Chamone Dde A. Liver histology in co-infection of hepatitis C virus (HCV) and hepatitis G virus (HGV). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44(2):67-70.
71. Schwarze-Zander C, Blackard JT, Zheng H, Addo MM, Lin W, Robbins GK, et al. GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/HIV-coinfected patients receiving HCV treatment: importance of the GBV-C genotype. *J Infect Dis* 2006;194(4):410-9.

ABSTRACT

Introduction: GBV-C is a flavivirus closely related to the hepatitis C virus. Differing from HCV, GBV-C it does not seem to be hepatotropic nor causes acute or chronic hepatitis. Because of the similar routes of transmission, HIV-GBV-C co-infection is extremely common; besides, studies demonstrated that GBV-C viremia has a beneficial effect upon HIV disease progression and mortality. **Purpose:** The aim of this study was to identify the compartments infected by the GBV-C in HIV seropositive patients co-infected with HCV and to correlate these infection markers with laboratorial parameters and histological findings in the triple infection. **Methods:** HIV-HCV co-infected patients undergoing to liver biopsy at the Hospital São Paulo were included in the study from May 2006 to May 2007. Demographic data was collected at the inclusion. Plasma samples were tested for antibodies to E2 of GBV-C by ELISA and for GBV-C RNA detection by real time PCR. Blood samples were collected to evaluate CD4 and CD8 T-cell counts, HIV, HCV and GBV-C viral loads. Biopsy specimens were stained using hematoxilin-eosin and Masson's trichrome. Analysis of the staging, peri-portal and parenchymatous activities were adopted according to the semiquantitation criterion recommended in the National Consensus for Classification of Chronic Hepatitis. RT-PCR *in situ* and Indirect Immunofluorescence (IFI) techniques were developed *in house* in order to identify possible GBV-C infected compartments. **Results:** A total of 20 HIV-HCV co-infected patients with the mean age of 43.0 (6.2), 55% (11/20) were male, 40% (8/20) were parenterally exposed. 30% (6/20) were positive to one of the GBV-C markers, of them, 15% (3/20) were E2 positive and 15% (3/20) were positive to GBV-C RNA, indicating active viral replication. Detection of GBV-C RNA by RT-PCR *in situ* was compromised by the pre-analytic process of samples whereas the IFI *in house* was difficult to interpret because of the inespecificity of the monoclonal antibody used. HIV and GBV-C viral load correlation was not observed in this study, probably as a consequence of the reduced number of patients included. **Conclusions:** Triple infected patients presented lower inflammation degree, lower hepatic-histological commitment and lower HCV viral load, when compared with HIV-HCV co-infected patients GBV-C no viremic.

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](#)