

**ANA CAROLINA DE OLIVEIRA SANTOS**

**Determinação do RNA-VHC no sêmen de pacientes cronicamente infectados  
pelo vírus da Hepatite C**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Norma de Paula Cavalheiro.

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ANA CAROLINA DE OLIVEIRA SANTOS**

**Determinação do RNA-VHC no sêmen de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite C.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias  
Orientadora: Dra. Norma de Paula Cavalheiro.

São Paulo  
2009

## **DEDICATÓRIA**

---

---

**A meus pais Lis e Célio,  
Vocês são responsáveis por tudo que sou!  
Obrigada por todos os ensinamentos de vida!  
Amo vocês mais que tudo!**

**Ao Abel,  
Meu porto-seguro.  
Meu amigo.  
Meu companheiro.  
Obrigada por tudo... Amo você!**

## **AGRADECIMENTOS**

---

---

- Aos meus orientadores, Prof. Dr. Antonio Alci Barone e Dra. Norma de Paula Cavalheiro, por confiar e investir em mim;
  
- Às eternas hepatotas: Danielli, Magali e Suzana, por toda companhia e amizade... várias estrelinhas para vocês;
  
- Ao Carlos e Fernanda, por toda a ajuda no LIM-47;
  
- Ao Ambulatório de Hepatites do HC-FMUSP e a todos os médicos deste serviço que encaminharam seus pacientes para este serviço;
  
- A Célia Luiza de Lima Rodrigues, pela mãozinha extra no PCR;
  
- Ao Dr. José Eduardo Levi, por abrir as portas de seu laboratório nos ajudando no aprimoramento da técnica de PCR em tempo-real;
  
- A meus irmãos, Rodrigo e Rafael, minha cunhada Luciana e meu sobrinho Lucca, por fazerem parte da minha vida;
  
- A Hilda Marques, pela força nas correções gramaticais;
  
- A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste projeto.

## SUMÁRIO

---

---

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Sumário               |  |
| Lista de Abreviaturas |  |
| Lista de Figuras      |  |
| Lista de Tabelas      |  |
| Resumo                |  |
| Summary               |  |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| Introdução.....           | 01 |
| Justificativa .....       | 15 |
| Objetivo .....            | 17 |
| Casuística e Métodos..... | 19 |
| Resultados.....           | 33 |
| Discussão .....           | 39 |
| Conclusão.....            | 46 |
| Anexos.....               | 48 |
| Referências.....          | 54 |

**LISTAS**

---

---

|       |  |
|-------|--|
| CDC   | Centro de Controle de Doenças          |
| cDNA  | ácido desoxirribonucléico complementar |
| DNA   | ácido desoxirribonucléico              |
| DST   | doença sexualmente transmissível       |
| HIV   | vírus da imunodeficiência humana       |
| HNANB | vírus da hepatite não-A, não-B         |
| HVR   | região hiper variável                  |
| NCR   | região não codificadora                |
| ORF   | “open reading frame”                   |
| PCR   | reação em cadeia pela polimerase       |
| RNA   | ácido ribonucléico                     |
| RT    | transcriptase reversa                  |
| VHA   | vírus da hepatite A                    |
| VHB   | vírus da hepatite B                    |
| VHC   | vírus da hepatite C                    |
| U.D.  | usuário de drogas                      |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Esquema do vírus da Hepatite C.....   | 3  |
| Figura 2 | Estrutura do genoma do VHC.....   | 4  |
| Figura 3 | Árvore filogenética representando os tipos de 1 a 6 do VHC e seus subtipos.....                               | 9  |
| Figura 4 | Organograma dos pacientes selecionados.....   | 21 |
| Figura 5 | Fracionamento celular das amostras de sêmen através do processo de gradiente descontínuo de concentração..... | 24 |
| Figura 6 | Passo-a-passo da diluição seriada.....  | 25 |
| Figura 7 | Fitas de nitrocelulose em diagnóstico de genotipagem..  | 31 |

---

|          |   |
|----------|---|
| Tabela 1 | Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC.....7   |
| Tabela 2 | Distribuição geográfica dos genótipos do VHC.....8  |
| Tabela 3 | Ciclos de temperatura e tempo da reação pelo método Amplicor Roche, teste qualitativo.....29  |
| Tabela 4 | Ciclos de temperatura e tempo da reação de PCR Real-time.....33   |
| Tabela 5 | Distribuição dos 27 pacientes quanto a fatores de risco para aquisição do VHC.....38  |
| Tabela 6 | Distribuição dos 27 pacientes quanto aos subtipos do VHC 1a, 1b, 1a/1b, 2b e 3 <sup>a</sup> .....38   |
| Tabela 7 | Resultados obtidos pela revelação através do método Amplicor Roche®, teste qualitativo das amostras de sêmen processadas com o gradiente descontínuo de concentração.....39 |

Tabela 8                      Comparação entre as técnicas de PCR convencional e Real-time nas amostras de soro, sêmen total, sêmen 1:2, sêmen 1:4 e sêmen 1:8 processadas através da diluição seriada.....40

Tabela 9                      Comparação entre as técnicas de PCR convencional e Real-time nas amostras de plasma total, plasma 1:2, plasma 1:4 e plasma 1:8 processadas através da diluição seriada.....41

**RESUMO**

---

---

---

Santos, ACO. **Determinação do RNA-VHC no sêmen de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite C (dissertação)**. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 60p.

**Introdução:** A hepatite C é um grande problema de saúde pública e sua prevalência global está estimada em torno de 3%. O risco de transmissão do VHC via fluído seminal é muito discutida tanto na área de reprodução assistida como em estudos sobre o fator de risco da hepatite C ser ou não uma DST. Foram investigados e analisados 23 pacientes sabidamente infectados pelo VHC. **Objetivos:** 1. Estabelecer uma técnica para detectar a ausência ou presença do vírus da Hepatite C no sêmen de pacientes infectados; 2. Comparar técnicas de manuseio das amostras de sêmen, procurando diminuir a quantidade de inibidores presentes nas amostras; 3. Comparar técnicas de PCR e detecção do vírus da Hepatite C nas amostras de sêmen, procurando aumentar a sensibilidade dos testes. **Métodos:** Na primeira fase do estudo foram recrutados 20 pacientes (13 preencheram os critérios de inclusão). Amostras de sêmen e soro foram coletadas. As amostras de sêmen foram processadas com o auxílio do Percoll 90% e 45%. Foi analisada a presença do HCV-RNA em soro pelo método Amplicor Roche, teste qualitativo. Se positivas, as amostras de sangue foram genotipadas e as amostras de sêmen foram extraídas, pelo mesmo método, e a PCR executada. Na segunda fase do estudo 23 pacientes foram selecionados, sendo alguns reconvocados da primeira fase (20 preencheram os critérios de inclusão). Amostras de sêmen e soro foram coletadas. As amostras de sêmen foram processadas através de diluições seriadas. Foi analisada a presença do HCV-RNA em soro e sêmen pelo método Amplicor Roche, teste qualitativo e por PCR em Tempo-real. Os dados epidemiológicos e os genótipos foram analisados, assim como os resultados da detecção do soro. Sêmen e frações realizadas pelas 2 (duas) técnicas de processamento estabelecidas foram comparados e analisados. **Resultados:** Dos 23 pacientes selecionados, a média de idade foi de 40,7 anos, com mediana de 45 anos. O tempo médio de descoberta da infecção pelo VHC foi de 7,15 anos. Dez pacientes (37,1%) não possuíam epidemiologia aparente, oito pacientes (29,6%) adquiriram a infecção pelo VHC através da utilização de drogas injetáveis e/ou inalatórias; seis (22,2%) por transfusão sanguínea; dois (7,4%) apresentaram histórico de transfusão sanguínea e uso de drogas e um (3,7%) relatou ser profissional da saúde. O genótipo 3a foi encontrado em 40,7% dos pacientes, seguido pelo 1a com 26%, 1b com 14,8%, 2b em 11,1% e 1a/1b em 7,4%. Das amostras processadas pelo Percoll, 86,5% apresentaram resultados inibidos, enquanto que nas amostras processadas pela diluição seriada e amplificadas através do PCR convencional, apenas 25,62% das amostras apresentou inibição, 65% não foram detectadas e 9,38% das amostras apresentou positividade. Nas amostras processadas pela diluição seriada na PCR em Tempo-real, 95% das amostras não foram detectadas e somente 5% apresentou positividade. **Conclusão:** Na tentativa de

driblar os inibidores presentes nas amostras de sêmen, o procedimento de diluições seriadas mostrou maior eficácia quando comparado com o processamento através do gradiente descontínuo de concentração. Contudo, a grande quantidade de não detectados mostrou que a carga viral pode ter sido “diluída”, gerando a necessidade da utilização de técnicas mais sensíveis. Não foi observada diferença significativa entre os resultados da PCR convencional e Tempo-real. Porém o aumento na quantidade dos resultados negativos pode ser conseqüência da ausência de um controle interno nas reações da PCR em Tempo-real.

**Descritores:** Vírus da Hepatite C/diagnóstico, HCV, Reação em Cadeia pela Polimerase, Hepatite C/virologia.

## SUMMARY

---

---

---

Santos, ACO. Santos, ACO. **Determinations of the RNA-HCV in semen from chronically patients infected by the Hepatitis C vírus (dissertation)**. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 60p.

**Introduction:** Hepatitis C vírus is a huge problem for public health, and its global prevalence is estimated around 3%. Its transmission by seminal fluid is still in discussion in several fields, such as assisted reproduction and in studies about risk factors, whether the hepatitis C virus is an STD (sexually transmitted disease) or not. Twenty-three patients were investigated. **Objectives:** 1. Establish a technique to detect the presence or absence of the HCV in semen from chronically infected patients; 2. Compare semen samples handling techniques, in order to decrease the amount of inhibitors on the samples; 3. Compare different PCR and detection techniques for the HCV in semen samples, in order to increase the sensibility of the test. **Methods:** On the first phase 20 patients were selected (13 filled the inclusion criterion). Semen and serum samples were collected. The semen samples were processed with the help of Percoll® 90% and 45%. The presence of the RNA-HCV were analyzed in serum with Amplicor Roche method, qualitative test. When positive, the serum samples were genotyped and the semen samples were extracted, by the same method, and the PCR was done. On the second phase 23 patients were selected, some of them were old patients from the first phase (20 filled the inclusion criterion). Semen and serum samples were collected. The semen samples were processed through a dilution series. The presence of HCV-RNA was analysed by Amplicor Roche, qualitative test and by PCR in Real-time. The epidemiological data and genotypes were analysed. **Resultados:** From the 23 patients selected the mean age was 40,7 years, mean 45 years. The mean time of Discovery was 7,15 years. Ten patients (37,1%) didn't present any apparent epidemiology, eight patients (29,6%) contracted HCV through injection and inhalatory drug use; six patients (22,2%) through blood transfusion; two patients (7,4%) had history of drug use and blood transfusion and one patient (3,7%) who was a health professional. Genotype 3a was found in 40,7% of the patients, followed by 1a with 26% of the patients, 1b with 14,8%, 2b with 11,1% e 1a/1b in 7,4% of the patients. The samples processed with Percoll, 86,5% presented inhibited results. Whereas on the samples that were processed with dilution series and amplified on the conventional PCR only 25,62% presented inhibited results, 65% were undetected and 9,38% were positive. On the samples processed with dilution series on the Real-time PCR 95% were undetected and only 5% were positive. **Conclusion:** On the attempt of decreasing the amount of inhibitors found on the semen samples, the procedure of dilution series showed us more efficient results when compared to the Percoll procedure. However, the great amount of undetected showed that the viral load might have being “diluted”, leading us to the necessity of a more sensitive technique. There was no significant difference between the results of

the conventional PCR and the Real-time. These increase on the undetected results may be a consequence of the absence of a internal control on the PCR reactions.

**Descriptors:** Hepatitis C Virus/diagnostic, HCV, Polimerase Chain Reaction, Hepatitis C/virology.

## INTRODUÇÃO

---

---

Após o desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção do vírus das Hepatites A (VHA) e B (VHB) em 1974, o papel desses agentes foi estudado em casos de Hepatites associadas a transfusões sanguíneas. Ao ser evidenciado que cerca de 90% desses casos não estavam associados a nenhum destes agentes, foi criado o termo Hepatite não-A, não-B (HNANB).<sup>1</sup>

Apesar de ter sido, inicialmente, considerada uma doença leve, estudos sobre os casos de HNANB levaram à conclusão de que a infecção tinha altas chances de evoluir para a cronicidade, podendo até levar a casos de cirrose e carcinoma hepático. Ao ser associado com doenças hepáticas crônicas, estudos para a identificação do agente causador foram iniciados, porém as técnicas disponíveis para a detecção do VHA e do VHB não apresentaram resultados satisfatórios.<sup>2</sup>

Em 1989, um terceiro vírus foi identificado e denominado como vírus da Hepatite C (VHC). Essa identificação foi feita a partir de um clone do VHC no fígado de chimpanzés infectados pelo HNANB. Desde então, testes cada vez mais sensíveis e específicos vêm sendo descritos por pesquisadores do mundo todo.<sup>3</sup>

A Hepatite C é uma infecção lenta e, geralmente, assintomática. Pelo menos 80% dos pacientes diagnosticados evoluem para cronicidade; 20% a 50% podem progredir para a cirrose e 1% a 2% para o carcinoma hepatocelular, após um período de 10 a 20 anos.<sup>4</sup>

## **VIROLOGIA**

O VHC está classificado na família flaviviridae, gênero Hepacivírus. É um pequeno vírus envelopado, com diâmetro em torno de 55 a 65nm. Possui genoma de RNA fita simples, de polaridade positiva, com cerca de 9.400 nucleotídeos. Compreendendo quase todo o genoma e codificando uma poliproteína de tamanho aproximado entre 3.010 e 3.011 aminoácidos, encontramos a ORF (open reading frame), que é a única longa fase de leitura aberta do genoma viral. Esses aminoácidos estão subdivididos em nove proteínas, respectivamente: proteína do capsídeo ou core (C) e duas glicoproteínas do envelope viral "E1" e "E2/NS1" (figura 1), que compreendem o domínio estrutural do genoma e NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b, que são domínios não estruturais (figura 2).<sup>5,6</sup>

Outra característica importante do VHC é a presença de regiões não traduzidas ou não codificantes de proteínas (NCR - non coding region) nas extremidades 3' e 5' do genoma viral. Acredita-se que estas estruturas apresentem importante papel no processo de replicação viral, pois apresentam a menor diversidade entre os diferentes isolados virais.<sup>7,8</sup>

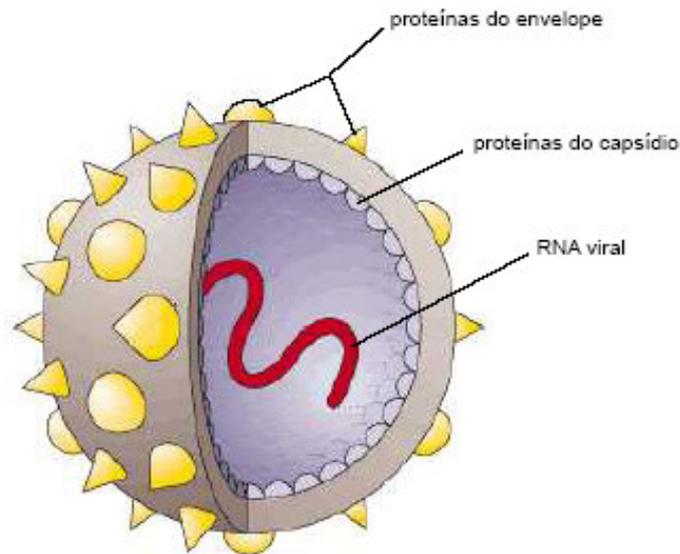


Figura 1 – Esquema do vírus da Hepatite C

### **Regiões não codificadoras do VHC (5'NCR e 3'NCR)**

#### **5' NCR**

A região 5'NCR é altamente conservada dentre os diferentes tipos virais do VHC, mostrando uma similaridade de mais de 90%, mostrando sua importância funcional na tradução e na replicação viral. É geralmente a região eleita para a seleção de primers na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Desempenha um papel fundamental para a replicação viral, pois possui o IRES, que é um sítio interno para ribossomos, indispensável na tradução dos RNA mensageiros.<sup>7</sup>

#### **3'NCR**

A região 3'NCR possui uma fita poli-U de comprimento variável, com papel crítico no início da replicação viral. Nessa região os tipos virais semelhantes apresentam uma diversidade de aproximadamente 10%, enquanto tipos virais diferentes apresentam uma diversidade de cerca de 80%. Acredita-se que as variações nessa seqüência possam estar relacionadas com a patogenicidade e a sensibilidade do VHC ao interferon.<sup>8,9</sup>

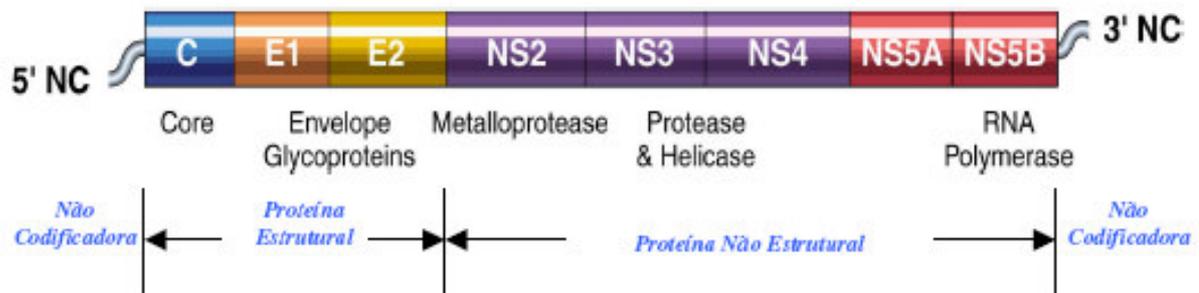


Figura 2 – Estrutura do genoma do VHC

### Regiões estruturais do genoma do VHC (Core, E1, E2/NS1)

#### Core (C)

É uma proteína localizada na extremidade amino da poliproteína, é considerada a proteína do capsídeo viral. É altamente conservada entre os genótipos do VHC. É liberada da poliproteína nascente por uma protease celular, formando a p21 e seu produto de clivagem, p19, que são encontradas no retículo endoplasmático da célula infectada. Também forma a proteína p16, que fica localizada no núcleo do hepatócito. Sua função ainda não é clara, mas acredita-se que ela deve alterar o metabolismo celular e participar no desenvolvimento da persistência viral, pois consegue suprimir genes celulares e interferir com outros vírus, como o VHB e o HIV.<sup>6,10</sup>

É a região alvo da seqüência de primers tipo-específicos da técnica de genotipagem descrita por Okamoto e cols., e também da técnica de sorotipagem (Chiron RIBA VHC serotyping strip diagram), que utiliza fitas de nitrocelulose com peptídeos sintéticos da fração do Core e NS4 como antígenos.<sup>11</sup>

#### Envelope (E1, E2/NS2)

O envelope viral apresenta duas principais proteínas: E1 (gp35) e E2 (gp70). Essas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático. Durante a replicação viral ocorrem complexas interações protéicas: E1 se associa com o core<sup>10,21</sup>, E2 com NS2<sup>22</sup>, E1 e E2, formando complexos estáveis, e por pontes dissulfeto. Elas foram bastante estudadas quanto à sua variabilidade e atualmente são os principais componentes das vacinas em desenvolvimento.<sup>6</sup>

A região 2 do envelope (E2) inclui em sua extremidade amino uma região de 34 aminoácidos que apresenta maior variabilidade dentro do VHC, conhecida como região hipervariável 1 (HVR1)<sup>12</sup>. A HVR1 é provavelmente resultante de uma alta variação nucleotídea em resposta à pressão imune do hospedeiro e parece desempenhar papel fundamental na determinação do curso evolutivo da infecção.<sup>6</sup>

Existe também uma outra região hipervariável, a HVR2, que apesar de já ter sido descrita, não teve, ainda, sua importância confirmada.<sup>6</sup>

A E2 parece participar do processo de penetração do VHC nos linfócitos e hepatócitos, por conter um sítio de ligação para CD81, que é uma proteína de membrana encontrada nessas células.<sup>13</sup>

Outra função associada à proteína E2 é a de mediar os efeitos antivirais do VHC, por ter a capacidade de interagir com a PKR (proteína quinase RNA-dependente). A PKR apresenta uma sequência nucleotídica variável, conforme o padrão de sensibilidade ou resistência ao tratamento com interferon.<sup>14</sup>

E a região 1 do envelope (E1) tem sido apresentada como uma proteína glicosilada, sendo também proposta como um possível antígeno a ser utilizado em várias terapêuticas para hepatite C.<sup>14</sup>

### **Proteínas não-estruturais do genoma do VHC (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b)**

As proteínas não-estruturais provavelmente estão envolvidas no processo de replicação do VHC, assim como os outros membros da família flaviviridae.<sup>15,16</sup>

#### **NS2**

Está intimamente associada com as proteínas estruturais. Sua única função conhecida é a de mediar sua própria clivagem em cis da proteína NS3, ou seja, a clivagem que ocorre apenas dentro da mesma molécula da poliproteína que catalisa a reação. Acredita-se que a NS2 possa ser uma metaloprotease, pois é estimulada por zinco e inibida por EDTA.<sup>6,17</sup>

#### **NS3**

Foi a primeira região a ser identificada, sendo atualmente a mais estudada. É uma proteína multifuncional com atividade de protease e helicase, sugerida por suas seqüências modificadas. Foi clonada a partir do tipo 1b do VHC isolado na Europa e parece apresentar baixa reatividade aos tipos 2 e 3 do VHC.<sup>15,18</sup>

Pode estar envolvida em outros aspectos da infecção pelo VHC. Já foi demonstrada sua capacidade de interagir com a proteína quinase A, participando de mecanismos patogênicos do VHC, principalmente com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.<sup>6,17</sup>

#### **NS4**

Compreende duas proteínas: NS4a e NS4b. A NS4a atua como co-fator de NS3, como visto anteriormente, e também tem participação na hiperfosforilação de NS5a. A função do NS4b ainda é desconhecida.<sup>6,17</sup>

A região NS4 apresenta uma grande variabilidade genotípica, justificando seu uso em testes sorológicos (Murex-Abbott VHC serotyping 1-6 assay e Chiron RIBA VHC serotyping strip diagram) para determinação dos tipos de VHC.<sup>18-20</sup>

## **NS5**

Também compreende duas proteínas: NS5a e NS5b, que são liberadas pela ação conjunta de NS3 e NS4. Acredita-se que tanto a NS5a como a NS5b fazem parte de um complexo de replicação ligado à membrana, por possuírem sinais para localização nuclear.<sup>6,18</sup>

Alguns estudos associam a suscetibilidade do VHC ao interferon com a da proteína NS5a, isso porque em sua extremidade carboxila está localizada a ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region), que é uma região determinante de sensibilidade ao Interferon.<sup>6,17</sup>

Outra característica importante em relação ao interferon é a interação direta que ocorre entre o NS5a e a PKR, que é a proteína quinase, responsável pelo efeito antiviral do interferon.<sup>18</sup>

A NS5a também parece estar relacionada com o processo de persistência da infecção, cirrose e carcinogênese, graças à sua capacidade de ativar promotores celulares.<sup>19</sup>

Também não devemos esquecer que a NS5a apresenta uma atividade RNA-polimerase RNA-dependente, sendo necessária durante a replicação do genoma do VHC.<sup>5,15</sup>

## **REPLICAÇÃO**

Estudos mostram que existe uma grande dificuldade para se estudar os mecanismos de replicação do VHC, pois o único modelo animal disponível para estudos com VHC são os chimpanzés.<sup>21</sup>

Acredita-se que inúmeros tipos celulares, incluindo os hepatócitos e linfócitos, tenham participação na replicação do VHC, onde a grande maioria das informações disponíveis sobre replicação são derivadas de observações feitas em humanos infectados.<sup>22,23</sup>

Através de técnicas de imunohistoquímica e hibridização in situ alguns estudos mostraram que o fígado é o sítio da replicação viral, tendo a presença do vírus no citoplasma dos hepatócitos.<sup>3,12,24</sup>

Em 1997, Fang sugeriu que o VHC, por ser bem parecido geneticamente com outros vírus da família flaviviridae, sua replicação também seja similar, começando com a entrada do vírion do VHC na célula hospedeira com o auxílio de receptores específicos localizados na superfície do hepatócito. Ao acoplar nos receptores, o vírion consegue entrar no citoplasma da célula por endocitose. Depois de estar dentro da célula, o vírus perde seu envelope, expondo seu genoma e começando todo o processo de replicação.<sup>12</sup>

A replicação do VHC não envolve mecanismos de reparo, assim como a replicação de todos os vírus RNA, acarretando uma heterogeneidade considerável em sua estrutura molecular, que ocorre

como resultado de pequenos erros de incorporação de nucleotídeos. Essa diversidade genética desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da infecção viral, permitindo a seleção de variantes mais resistentes, sob a pressão da resposta imunológica do hospedeiro. A média de mutação no genoma do VHC em um único indivíduo infectado tem sido estimada entre 1 e  $2 \times 10^{-3}$  trocas nt/sítio/ano, sendo encontrado um alto nível de variação na extremidade 3' do genoma.<sup>25,26</sup>

Após o sequenciamento completo do genoma do VHC por Choo em 1991, inúmeras seqüências isoladas do VHC foram obtidas pelo mundo inteiro, dando origem a diversos tipos distintos de VHC. A partir daí cada pesquisador desenvolvia e usava a classificação que desejava, causando uma confusão na literatura, como mostrado na tabela 1. Foi criado então um sistema único de classificação durante a 2ª Conferência Internacional do VHC, onde os tipos virais do VHC deveriam ser classificados em genótipos e subtipos.<sup>27-31</sup>

Tabela 1 – Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC

| *Genótipo | Cha et al. <sup>28</sup> | Okamoto et al. <sup>29</sup> | Enomoto et al. <sup>30</sup> | Simmonds <sup>31</sup> |
|-----------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|
| 1a        | I                        | I                            | K-PT                         | 1a                     |
| 1b        | II                       | II                           | K-1                          | 1b                     |
| 1c        | nc                       | nc                           | nc                           | nc                     |
| 2a        | III                      | III                          | K-2a                         | 2a                     |
| 2b        | III                      | IV                           | K-2b                         | 2b                     |
| 2c        | III                      | nc                           | nc                           | nc                     |
| 3a        | IV                       | V                            | nc                           | 3                      |
| 3b        | IV                       | VI                           | nc                           | Nc                     |
| 4a **     | nc                       | nc                           | nc                           | 4                      |
| 5a        | V                        | nc                           | nc                           | nc                     |
| 6a        | nc                       | nc                           | nc                           | nc                     |

\* Proposta de nomenclatura unificada das seqüências do VHC (em comparação com os esquemas preexistentes: Cha, Okamoto, Enomoto e Simmonds). Esta classificação está baseada na análise filogenética da região NS5 e outras codificadoras. As seqüências não classificadas originalmente pelos autores estão indicadas como "nc".

\*\* Tipo 4a foi um nome proposto para os genótipos encontrados no Egito e Oriente Médio, com base nas seqüências das regiões do core e NS5. Existem semelhanças com outras variantes do tipo 4 encontradas na África Central, que estão sendo investigadas a partir de outras regiões do genoma do VHC.<sup>15,31</sup>

## GENÓTIPOS

A classificação escolhida e adotada desde 1994 separava os tipos virais em seis genótipos (1, 2, 3, 4, 5 e 6), apresentando 2 ou 3 subtipos (a, b, c) cada genótipo, de acordo com a similaridade genômica entre eles. A heterogeneidade presente entre os genótipos é encontrada com maior intensidade no envoltório viral.<sup>21</sup> Os genótipos são considerados como importantes marcadores epidemiológicos e de distribuição geográfica, podendo traçar o curso da infecção em uma dada população, pois a variação geográfica na prevalência dos vários genótipos é considerável, como vemos na tabela 2.<sup>26,31</sup>

Tabela 2 - Distribuição geográfica dos genótipos do VHC

| Área            | Tipo    |
|-----------------|---------|
| Brasil          | 1, 3, 2 |
| Europa          | 1, 2, 3 |
| Austrália       | 1, 2, 3 |
| EUA             | 1, 2, 3 |
| Extremo Oriente | 1, 2    |
| Oriente Médio   | 4       |
| África do Norte | 4       |
| África do Sul   | 4, 5    |
| Sudeste da Ásia | 6       |

Entre os genótipos pode haver diferentes prognósticos da doença, onde o tipo 1 prevalente em 40% a 80% da população mundial de infectados pelo VHC, parece representar o tipo viral mais agressivo, de prognóstico menos favorável e pior respondedor à terapia com Interferon, quando comparado com os tipos 2 e 3.<sup>32,33</sup>

Alguns genótipos - como 1a, 1b, 2a e 2b - possuem distribuição em todo o mundo, enquanto que os genótipos 5a e 6a são encontrados em regiões geográficas específicas.

Novas variantes foram citadas no Vietnã, Tailândia, Burma e Indonésia, sendo originalmente classificadas como genótipos 7, 8, 9, 10 e 11. Porém análises mostraram que os grupos 7, 8, 9 e 11 deveriam ser classificados no genótipo 6a e o tipo 10 agrupado dentro do tipo 3a. Na figura 3 temos a árvore filogenética do VHC, com todos seus tipos e subtipos representados.<sup>25,34</sup>

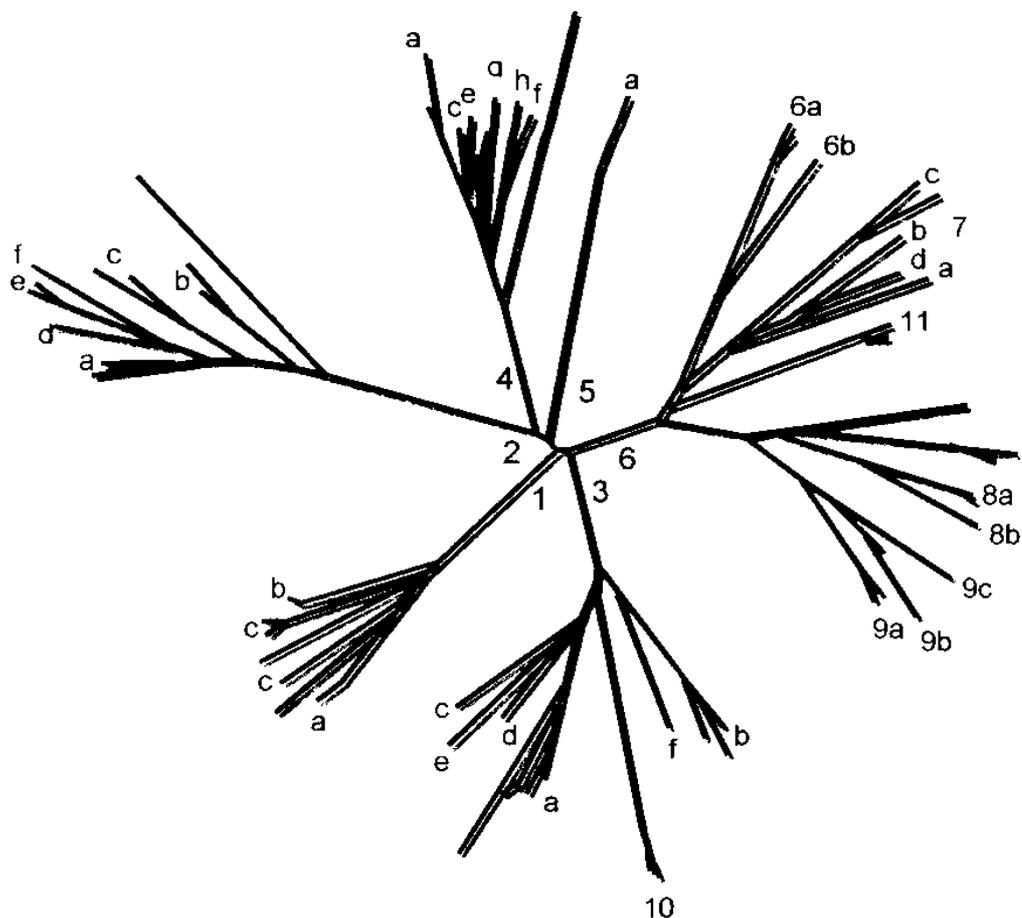


Figura 3 – Árvore filogenética representando os tipos de 1 a 6 do VHC e seus subtipos  
 Na figura acima temos os genótipos representados pelos ramos maiores, seguido pelos subtipos mostrados nos ramos menores.<sup>35</sup>

## QUASIESPÉCIES

O termo quasiespécies representa a heterogeneidade do VHC ocorrida em um mesmo hospedeiro durante o curso da infecção. Durante o tratamento podem ocorrer algumas mutações, dando origem a quasiespécies do indivíduo com infecção e permitindo, em muitos casos, que o VHC escape dos efeitos antivirais da medicação, levando-nos à conclusão de que, quanto menor a heterogeneidade do vírus, melhor a resposta que será obtida pelo paciente. Sua diversidade parece estar relacionada com a pressão imunológica, estabelecendo a infecção crônica no hospedeiro e talvez influenciando os resultados da terapia com interferon.<sup>32,34,36</sup>

## EPIDEMIOLOGIA

No início da década de 1970 foram realizados testes sorológicos direcionados à investigação dos vírus da Hepatite A (VHA) e B (VHB) nos inúmeros casos de hepatite pós-transfusional que possuíam suas causas etiológicas desconhecidas.<sup>1</sup>

Os resultados desses testes revelaram que 25% dos casos eram relacionados ao VHB, porém os casos remanescentes possuíam etiologia desconhecida, sendo considerados como hepatite não-A, não-B (HNANB).<sup>1</sup>

Os sintomas da HNANB nem sempre estavam presentes logo após os episódios de transfusão de sangue. Após acompanhamento foram observadas alterações das taxas de ALT e progressão para cirrose em alguns casos, gerando um maior interesse em estudar o agente causador dessa nova doença.<sup>1</sup>

No final dos anos 80 o genoma do agente causador da HNANB foi sequenciado pela Chiron Corporation, sendo então classificado como vírus da Hepatite C (VHC).<sup>3</sup>

A partir de sua identificação, inúmeros estudos foram iniciados e, em 1989, Choo e cols. desenvolveram um teste de detecção para o VHC pelo método ELISA, tornando possível o melhor conhecimento da situação epidemiológica do vírus.<sup>3</sup>

Os conhecimentos epidemiológicos sobre a infecção pelo VHC continuam em evolução, para futura elucidação completa da transmissão biológica do vírus.

Atualmente a infecção pelo vírus da Hepatite C é um grande problema de saúde pública e sua prevalência global está estimada em torno de 3% (variando de 0,1 a 5% em diferentes países). Existem cerca de 175 milhões de portadores crônicos de VHC em todo o mundo, dos quais cerca de 2 milhões estão nos EUA e 5 milhões na Europa Ocidental.<sup>32</sup>

A prevalência do VHC continua bastante elevada por causa de infecções crônicas contraídas antes da década de 1990 e pelo aumento no número de usuários de drogas ilícitas.<sup>37</sup>

Os indivíduos com idade entre 30 e 49 anos apresentam os maiores índices de prevalência da infecção pelo VHC nos EUA e Austrália, ao passo que no Brasil a infecção é mais frequente em jovens adultos (10 a 30 anos). Já em países menos desenvolvidos, a infecção ocorre em todas as faixas etárias, em decorrência da exposição a múltiplos fatores de risco.<sup>38</sup>

Não há um padrão étnico-racial, a infecção é predominante em jovens adultos, com leve prevalência no sexo masculino. O tempo de incubação médio é de seis a sete semanas, apresentando uma taxa de letalidade estimada, em suas formas crônicas, em cerca de 3%. Co-infecções com hepatite B e HIV são frequentes devido às formas comuns de contágio.<sup>37,38</sup>

A prevalência mundial da infecção pelo VHC no ano de 1998 em doadores de sangue variava de 0,04% a 26%; o Brasil encontrava-se no grupo com altas prevalências (1,6% a 3,5%), junto com Rússia e Oriente Médio.<sup>39</sup>

Anteriormente a causa mais comum da hepatite C foi a transfusão sanguínea, devido à capacidade que o vírus tem de permanecer no hospedeiro durante muitos anos sem apresentar

nenhuma manifestação clínica, porém mantendo viremia e, antes do desenvolvimento de técnicas de detecção, não havia triagem nos doadores. Testes sorológicos de triagem direcionados à investigação dos vírus das hepatites A (VHA) e B (VHB) realizados na primeira metade da década de 1970 revelaram que 75% dos casos de hepatite associados às transfusões sanguíneas foram considerados como hepatite C, na época ainda conhecida como hepatite não-A não-B, sendo os 25% dos casos remanescentes, relacionados ao VHB. A partir de 1990, a seleção dos doadores de sangue foi estabelecida com a ajuda de técnicas capazes de identificar a presença de anticorpos contra o VHC.<sup>21,40,41</sup>

Ao longo dos últimos anos houve uma redução gradual dos casos de Hepatite C pós-transfusional graças à aplicação de medidas mais restritivas na seleção dos doadores, como a introdução de testes sorológicos mais sensíveis e a utilização do NAT para a triagem das amostras de sangue recebidas. Atualmente o Brasil está estimado como um país com baixa endemicidade.<sup>37</sup>

No entanto, essa rota de transmissão continua sendo responsável por muitas contaminações prévias, especialmente em indivíduos que adquiriram a infecção antes do desenvolvimento dos testes de diagnósticos. Atualmente o maior meio de transmissão é o uso de drogas injetáveis.<sup>40,42-44</sup>

A infecção pelo vírus da Hepatite C se dá predominantemente através do contato com sangue e derivados contaminados, podendo ocorrer também devido ao uso de drogas ilícitas endovenosas, tatuagem, transplante de órgãos, acupuntura, compartilhado de canudo para uso de drogas inalatórias, acidentes com pérfuro-cortantes envolvendo profissionais da área da saúde e tratamentos médicos e odontológicos.<sup>37,45-47</sup>

Outro grupo com taxas de prevalência altas são os dependentes de sangue ou produtos de sangue humano, tais como hemofílicos. A prevalência de VHC entre os hemofílicos está intimamente relacionada com a quantidade e o tipo de produto transfundido. Antigamente acreditava-se que todos os hemofílicos expostos a sangue que não haviam sido previamente triados pelos testes imunológicos, iriam eventualmente contrair o VHC, contudo, atualmente, devido ao controle mais rigoroso da infecção em centros de diálise a taxa de prevalência nessa população é de 30%, variando geograficamente.<sup>40,48</sup>

Se levarmos o VHB e o HIV como exemplo, poderíamos sugerir que o VHC é uma Doença Sexualmente Transmissível (DST) e que pode ser transmitida pelo contato sexual? Qual seria o risco disso acontecer? Depende da população estudada? Comportamentos de risco podem alterar o potencial de contaminação?<sup>49-50</sup>

O risco de transmissão do VHC via fluido seminal é muito discutido, tanto na área de reprodução assistida como em estudos sobre o fator de risco da hepatite C ser ou não uma DST. O tipo de relacionamento sexual pode estar relacionado ao risco de transmissão sexual do VHC, pois aparentemente casais monogâmicos tendem a apresentar taxas de transmissão menores, quando comparados a um grupo de pessoas com múltiplos parceiros.<sup>50-52</sup>

O primeiro estudo que discute a transmissão sexual foi publicado por Alter em 1989. Nesse trabalho foi evidenciado como fator de risco múltiplos parceiros sexuais.<sup>51</sup>

A variação das porcentagens apresentadas sugere que a transmissão sexual apresenta riscos mínimos ou mesmo inexistentes, tendo porcentagens entre 0% a 3%, como mencionados na grande maioria dos trabalhos.<sup>53-55</sup>

Bodsworth e Cols, em 1996, ao analisar uma corte de 1.038 homossexuais masculinos encontraram 7,6% de positividade para o anti-VHC e sugeriram que a supressão imunológica causada pelo HIV pode ter sido um facilitador para a aquisição da infecção. Em 2001, Filippini afirmou que o risco de transmissão sexual é maior em pacientes co-infectados pelo HIV.<sup>50,56</sup>

A discussão da co-infecção pelo HIV permaneceu em um artigo de revisão publicado por Bonacini e cols. em 2000, que apresentou duas versões opostas: a primeira afirmava que parceiros sexuais de pacientes portadores de co-infecção HIV/VHC apresentam risco maior de contrair o VHC quando comparados com parceiros de sorologia negativa para HIV e positiva apenas para o VHC. A segunda versão afirmava que o risco de transmissão sexual do VHC em pacientes co-infectados não se altera ou é muito baixa.<sup>53</sup>

Outro grupo que deve ser levado em consideração são os pacientes que não pertencem a grupos de riscos, mas são portadores do VHC. Qual seria o risco de seus parceiros sexuais serem infectados por via sexual? Este é um grupo que deve ser considerado e avaliado cuidadosamente.<sup>49,53</sup>

Em média 30% a 40% dos pacientes infectados pelo VHC não possuem fonte identificada de aquisição do vírus. Essa população gera grande curiosidade, pois provavelmente a transmissão sexual, assim como outras formas de contato humano podem ter um papel significativo. Estudos realizados na Austrália demonstraram que os fatores de risco relacionados com transmissão sexual apresentaram índices menores que 2% e outro grupo australiano mencionou que a soropositividade entre parceiros sexuais foi maior que entre outros contactantes não sexuais.<sup>50,57-58</sup>

Um estudo realizado em 1994 por Soto e cols. avaliou 423 parceiros heterossexuais e sugeriu que a infecção pelo VHC pode ser transmitida sexualmente, mas com pouca eficiência, sendo que as taxas de transmissão podem ser aumentadas em casos de co-infecção. Em 1997, Tanaka e cols. observaram que esposas com parceiros VHC positivos apresentavam risco duas vezes maior quando comparados às esposas cujos parceiros não apresentavam infecção pelo VHC. Apesar da transmissão sexual do VHC não estar estabelecida, tal fato não deve ser negligenciado.<sup>52,59</sup>

Talvez o tempo de convivência possa justificar a transmissão sexual do VHC, porém esse fato também se tornou outro tema polêmico que deve ser ressaltado.

Rooney e Gilson publicaram uma estimativa de risco associado à infecção pelo VHC 3,7 vezes maior em mulheres com parceiros VHC positivo. Nesse trabalho também foi evidenciado que a transmissão intrafamiliar é importante e fica mais evidente quando somado ao contato familiar e o

comportamento sexual, o compartilhar de utensílios pessoais como lâmina de barbear, escova de dente, cortador de unha e alicate de manicure.<sup>57</sup>

Porém em 1997 Capelli e cols. publicaram um artigo baseado em uma doadora de repetição anual que apresentou positividade para PCR-VHC entre duas doações consecutivas, sendo constatado que a convivência com parceiro sexual portador crônico do VHC era o único fator de risco.<sup>58</sup>

A transmissão intrafamiliar, através do compartilhamento de materiais como alicate de manicure, lâmina de barbear e até mesmo escova de dente com indivíduos infectados pelo VHC, também já foi demonstrada anteriormente.<sup>60-61</sup>

Quando mencionamos sexo promíscuo, parceiro usuário de droga, DST associada, sexo pago e convívio de longa duração (>10 anos) com parceiro VHC positivo as taxas de transmissão do VHC se tornam significativamente mais altas, segundo Hershov e cols. em 1998.<sup>62</sup>

Uma série de pontos deve ser levada em consideração quando se fala em transmissão sexual do VHC, entre eles o número de parceiros.

Existem poucos relatos sobre transmissão sexual do VHC no Brasil, entre eles temos o de Mesquita e cols. em 1997, que realizaram um trabalho com uma população brasileira de prostitutas e seus clientes. Todos os fatores de risco associados com a transmissão da hepatite C foram analisados e por fim concluído que a transmissão sexual tem um papel importante na epidemiologia do VHC, principalmente quando o comportamento sexual promíscuo entra em cena.<sup>63</sup>

Outro trabalho brasileiro foi publicado em 2001 por Tengan e cols., onde 154 doadores de sangue que apresentaram reação sorológica para o VHC foram avaliados juntamente com seus parceiros sexuais. Foi evidenciado que 11,76% dos parceiros apresentaram-se infectados pelo VHC, sugerindo que a alta prevalência da infecção poderia ser atribuída, pelo menos em parte, à transmissão sexual.<sup>64</sup>

Outro item que deve ser observado é com relação à presença do VHC nas secreções, sêmen, saliva e sangue menstrual, e qual a relação com a transmissão sexual. Com o isolamento do VHC em sêmen e secreção vaginal, tem sido discutido qual o sentido mais provável de veiculação da infecção, de homem para mulher ou de mulher para homem, e até o momento as evidências sugerem que haja um potencial maior de transmissão no sentido homem para mulher. Certamente, traumas na mucosa durante o intercurso sexual e altos níveis de viremia aumentam os riscos de transmissão.<sup>65-68</sup>

Fabris e Cols., em 1999, estudaram a presença do VHC em saliva e seu risco de transmissão foi avaliado. Concluiu-se que a presença do vírus na saliva é considerável, porém não suficiente para a transmissão do VHC.<sup>69</sup>

A presença do VHC no sangue menstrual de 10 mulheres foi estudada em 1994 por Silverman e cols. e todas as amostras apresentaram positividade, sugerindo que este mecanismo possa ser uma rota de transmissão sexual mulher-homem da infecção pelo VHC.<sup>70</sup>

Em 2002 Cassuto e cols. publicaram um trabalho onde o sêmen de 35 homens foi avaliado e concluíram que existem dificuldades de se transpor os inibidores presentes no manuseio destas amostras durante a PCR-VHC, pois somente 5 homens apresentaram positividade. Foi observado pelo autor que os resultados podem ser falso-negativos.<sup>71</sup>

Essa grande dúvida se dá graças à contradição entre pesquisadores que conseguiram detectar o VHC no sêmen e pesquisadores que não obtiveram resultados satisfatórios.

Acredita-se que a dificuldade de isolar o vírus em fluídos corpóreos, principalmente em sêmen, devido à presença de inibidores e a falta de técnicas e protocolos padronizados utilizados na extração de RNA, reação de transcrição reversa e amplificação pela polimerase (RT-PCR), sejam os principais motivos que originam essa dúvida







Após o desenvolvimento de testes sorológicos para a detecção do vírus das Hepatites A (VHA) e B (VHB) em 1974, o papel desses agentes foi estudado em casos de Hepatites associadas a transfusões sanguíneas. Ao ser evidenciado que cerca de 90% desses casos não estavam associados a nenhum destes agentes, foi criado o termo Hepatite não-A, não-B (HNANB).<sup>1</sup>

Apesar de ter sido, inicialmente, considerada uma doença leve, estudos sobre os casos de HNANB levaram à conclusão de que a infecção tinha altas chances de evoluir para a cronicidade, podendo até levar a casos de cirrose e carcinoma hepático. Ao ser associado com doenças hepáticas crônicas, estudos para a identificação do agente causador foram iniciados, porém as técnicas disponíveis para a detecção do VHA e do VHB não apresentaram resultados satisfatórios.<sup>2</sup>

Em 1989, um terceiro vírus foi identificado e denominado como vírus da Hepatite C (VHC). Essa identificação foi feita a partir de um clone do VHC no fígado de chimpanzés infectados pelo

HNANB. Desde então, testes cada vez mais sensíveis e específicos vêm sendo descritos por pesquisadores do mundo todo.<sup>3</sup>

A Hepatite C é uma infecção lenta e, geralmente, assintomática. Pelo menos 80% dos pacientes diagnosticados evoluem para cronicidade; 20% a 50% podem progredir para a cirrose e 1% a 2% para o carcinoma hepatocelular, após um período de 10 a 20 anos.<sup>4</sup>

## VIROLOGIA

O VHC está classificado na família flaviviridae, gênero Hepacivírus. É um pequeno vírus envelopado, com diâmetro em torno de 55 a 65nm. Possui genoma de RNA fita simples, de polaridade positiva, com cerca de 9.400 nucleotídeos. Compreendendo quase todo o genoma e codificando uma poliproteína de tamanho aproximado entre 3.010 e 3.011 aminoácidos, encontramos a ORF (open reading frame), que é a única longa fase de leitura aberta do genoma viral. Esses aminoácidos estão subdivididos em nove proteínas, respectivamente: proteína do capsídeo ou core (C) e duas glicoproteínas do envelope viral "E1" e "E2/NS1" (figura 1), que compreendem o domínio estrutural do genoma e NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b, que são domínios não estruturais (figura 2).<sup>5,6</sup>

**RESUMO**

Outra característica importante do VHC é a presença de regiões não traduzidas ou não codificantes de proteínas (NCR - non coding region) nas extremidades 3' e 5' do genoma viral. Acredita-se que estas estruturas apresentem importante papel no processo de replicação viral, pois apresentam a menor diversidade entre os diferentes isolados virais.<sup>7,8</sup>

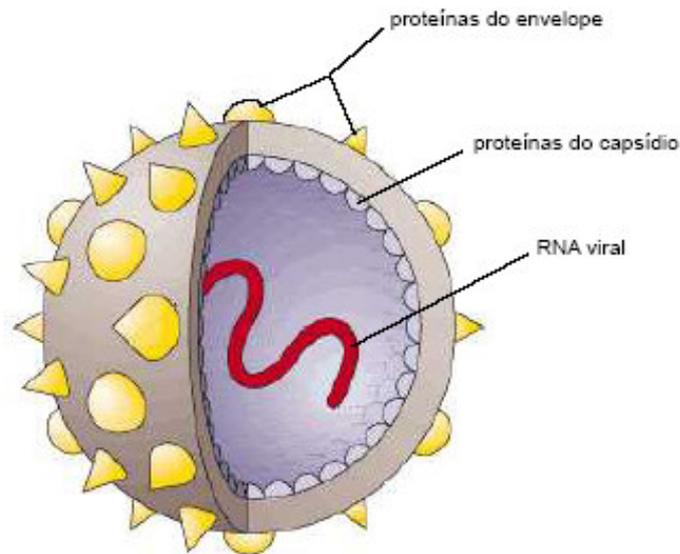


Figura 1 – Esquema do vírus da Hepatite C

### **Regiões não codificadoras do VHC (5'NCR e 3'NCR)**

#### **5' NCR**

A região 5'NCR é altamente conservada dentre os diferentes tipos virais do VHC, mostrando uma similaridade de mais de 90%, mostrando sua importância funcional na tradução e na replicação viral. É geralmente a região eleita para a seleção de primers na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Desempenha um papel fundamental para a replicação viral, pois possui o IRES, que é um sítio interno para ribossomos, indispensável na tradução dos RNA mensageiros.<sup>7</sup>

#### **3'NCR**

A região 3'NCR possui uma fita poli-U de comprimento variável, com papel crítico no início da replicação viral. Nessa região os tipos virais semelhantes apresentam uma diversidade de aproximadamente 10%, enquanto tipos virais diferentes apresentam uma diversidade de cerca de 80%. Acredita-se que as variações nessa seqüência possam estar relacionadas com a patogenicidade e a sensibilidade do VHC ao interferon.<sup>8,9</sup>

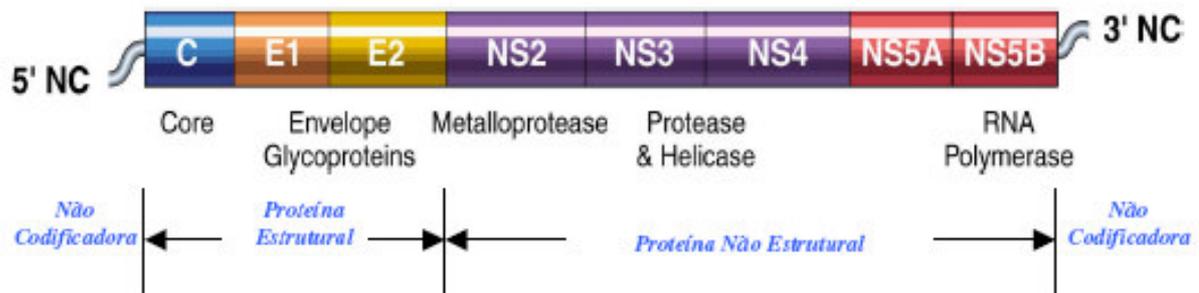


Figura 2 – Estrutura do genoma do VHC

### Regiões estruturais do genoma do VHC (Core, E1, E2/NS1)

#### Core (C)

É uma proteína localizada na extremidade amino da poliproteína, é considerada a proteína do capsídeo viral. É altamente conservada entre os genótipos do VHC. É liberada da poliproteína nascente por uma protease celular, formando a p21 e seu produto de clivagem, p19, que são encontradas no retículo endoplasmático da célula infectada. Também forma a proteína p16, que fica localizada no núcleo do hepatócito. Sua função ainda não é clara, mas acredita-se que ela deve alterar o metabolismo celular e participar no desenvolvimento da persistência viral, pois consegue suprimir genes celulares e interferir com outros vírus, como o VHB e o HIV.<sup>6,10</sup>

É a região alvo da seqüência de primers tipo-específicos da técnica de genotipagem descrita por Okamoto e cols., e também da técnica de sorotipagem (Chiron RIBA VHC serotyping strip diagram), que utiliza fitas de nitrocelulose com peptídeos sintéticos da fração do Core e NS4 como antígenos.<sup>11</sup>

#### Envelope (E1, E2/NS2)

O envelope viral apresenta duas principais proteínas: E1 (gp35) e E2 (gp70). Essas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático. Durante a replicação viral ocorrem complexas interações protéicas: E1 se associa com o core<sup>10,21</sup>, E2 com NS2<sup>22</sup>, E1 e E2, formando complexos estáveis, e por pontes dissulfeto. Elas foram bastante estudadas quanto à sua variabilidade e atualmente são os principais componentes das vacinas em desenvolvimento.<sup>6</sup>

A região 2 do envelope (E2) inclui em sua extremidade amino uma região de 34 aminoácidos que apresenta maior variabilidade dentro do VHC, conhecida como região hipervariável 1 (HVR1)<sup>12</sup>. A HVR1 é provavelmente resultante de uma alta variação nucleotídea em resposta à pressão imune do hospedeiro e parece desempenhar papel fundamental na determinação do curso evolutivo da infecção.<sup>6</sup>

Existe também uma outra região hipervariável, a HVR2, que apesar de já ter sido descrita, não teve, ainda, sua importância confirmada.<sup>6</sup>

A E2 parece participar do processo de penetração do VHC nos linfócitos e hepatócitos, por conter um sítio de ligação para CD81, que é uma proteína de membrana encontrada nessas células.<sup>13</sup>

Outra função associada à proteína E2 é a de mediar os efeitos antivirais do VHC, por ter a capacidade de interagir com a PKR (proteína quinase RNA-dependente). A PKR apresenta uma sequência nucleotídica variável, conforme o padrão de sensibilidade ou resistência ao tratamento com interferon.<sup>14</sup>

E a região 1 do envelope (E1) tem sido apresentada como uma proteína glicosilada, sendo também proposta como um possível antígeno a ser utilizado em várias terapêuticas para hepatite C.<sup>14</sup>

### **Proteínas não-estruturais do genoma do VHC (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b)**

As proteínas não-estruturais provavelmente estão envolvidas no processo de replicação do VHC, assim como os outros membros da família flaviviridae.<sup>15,16</sup>

#### **NS2**

Está intimamente associada com as proteínas estruturais. Sua única função conhecida é a de mediar sua própria clivagem em cis da proteína NS3, ou seja, a clivagem que ocorre apenas dentro da mesma molécula da poliproteína que catalisa a reação. Acredita-se que a NS2 possa ser uma metaloprotease, pois é estimulada por zinco e inibida por EDTA.<sup>6,17</sup>

#### **NS3**

Foi a primeira região a ser identificada, sendo atualmente a mais estudada. É uma proteína multifuncional com atividade de protease e helicase, sugerida por suas seqüências modificadas. Foi clonada a partir do tipo 1b do VHC isolado na Europa e parece apresentar baixa reatividade aos tipos 2 e 3 do VHC.<sup>15,18</sup>

Pode estar envolvida em outros aspectos da infecção pelo VHC. Já foi demonstrada sua capacidade de interagir com a proteína quinase A, participando de mecanismos patogênicos do VHC, principalmente com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.<sup>6,17</sup>

#### **NS4**

Compreende duas proteínas: NS4a e NS4b. A NS4a atua como co-fator de NS3, como visto anteriormente, e também tem participação na hiperfosforilação de NS5a. A função do NS4b ainda é desconhecida.<sup>6,17</sup>

A região NS4 apresenta uma grande variabilidade genotípica, justificando seu uso em testes sorológicos (Murex-Abbott VHC serotyping 1-6 assay e Chiron RIBA VHC serotyping strip diagram) para determinação dos tipos de VHC.<sup>18-20</sup>

## **NS5**

Também compreende duas proteínas: NS5a e NS5b, que são liberadas pela ação conjunta de NS3 e NS4. Acredita-se que tanto a NS5a como a NS5b fazem parte de um complexo de replicação ligado à membrana, por possuírem sinais para localização nuclear.<sup>6,18</sup>

Alguns estudos associam a suscetibilidade do VHC ao interferon com a da proteína NS5a, isso porque em sua extremidade carboxila está localizada a ISDR (Interferon Sensitivity Determining Region), que é uma região determinante de sensibilidade ao Interferon.<sup>6,17</sup>

Outra característica importante em relação ao interferon é a interação direta que ocorre entre o NS5a e a PKR, que é a proteína quinase, responsável pelo efeito antiviral do interferon.<sup>18</sup>

A NS5a também parece estar relacionada com o processo de persistência da infecção, cirrose e carcinogênese, graças à sua capacidade de ativar promotores celulares.<sup>19</sup>

Também não devemos esquecer que a NS5a apresenta uma atividade RNA-polimerase RNA-dependente, sendo necessária durante a replicação do genoma do VHC.<sup>5,15</sup>

## **REPLICAÇÃO**

Estudos mostram que existe uma grande dificuldade para se estudar os mecanismos de replicação do VHC, pois o único modelo animal disponível para estudos com VHC são os chimpanzés.<sup>21</sup>

Acredita-se que inúmeros tipos celulares, incluindo os hepatócitos e linfócitos, tenham participação na replicação do VHC, onde a grande maioria das informações disponíveis sobre replicação são derivadas de observações feitas em humanos infectados.<sup>22,23</sup>

Através de técnicas de imunohistoquímica e hibridização in situ alguns estudos mostraram que o fígado é o sítio da replicação viral, tendo a presença do vírus no citoplasma dos hepatócitos.<sup>3,12,24</sup>

Em 1997, Fang sugeriu que o VHC, por ser bem parecido geneticamente com outros vírus da família flaviviridae, sua replicação também seja similar, começando com a entrada do vírion do VHC na célula hospedeira com o auxílio de receptores específicos localizados na superfície do hepatócito. Ao acoplar nos receptores, o vírion consegue entrar no citoplasma da célula por endocitose. Depois de estar dentro da célula, o vírus perde seu envelope, expondo seu genoma e começando todo o processo de replicação.<sup>12</sup>

A replicação do VHC não envolve mecanismos de reparo, assim como a replicação de todos os vírus RNA, acarretando uma heterogeneidade considerável em sua estrutura molecular, que ocorre

como resultado de pequenos erros de incorporação de nucleotídeos. Essa diversidade genética desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da infecção viral, permitindo a seleção de variantes mais resistentes, sob a pressão da resposta imunológica do hospedeiro. A média de mutação no genoma do VHC em um único indivíduo infectado tem sido estimada entre 1 e  $2 \times 10^{-3}$  trocas nt/sítio/ano, sendo encontrado um alto nível de variação na extremidade 3' do genoma.<sup>25,26</sup>

Após o sequenciamento completo do genoma do VHC por Choo em 1991, inúmeras seqüências isoladas do VHC foram obtidas pelo mundo inteiro, dando origem a diversos tipos distintos de VHC. A partir daí cada pesquisador desenvolvia e usava a classificação que desejava, causando uma confusão na literatura, como mostrado na tabela 1. Foi criado então um sistema único de classificação durante a 2ª Conferência Internacional do VHC, onde os tipos virais do VHC deveriam ser classificados em genótipos e subtipos.<sup>27-31</sup>

Tabela 1 – Comparação das diferentes classificações para os genótipos do VHC

| *Genótipo | Cha et al.28 | Okamoto et al.29 | Enomoto et al.30 | Simmonds 31 |
|-----------|--------------|------------------|------------------|-------------|
| 1a        | I            | I                | K-PT             | 1a          |
| 1b        | II           | II               | K-1              | 1b          |
| 1c        | nc           | nc               | nc               | nc          |
| 2a        | III          | III              | K-2a             | 2a          |
| 2b        | III          | IV               | K-2b             | 2b          |
| 2c        | III          | nc               | nc               | nc          |
| 3a        | IV           | V                | nc               | 3           |
| 3b        | IV           | VI               | nc               | Nc          |
| 4a **     | nc           | nc               | nc               | 4           |
| 5a        | V            | nc               | nc               | nc          |
| 6a        | nc           | nc               | nc               | nc          |

\* Proposta de nomenclatura unificada das seqüências do VHC (em comparação com os esquemas preexistentes: Cha, Okamoto, Enomoto e Simmonds). Esta classificação está baseada na análise filogenética da região NS5 e outras codificadoras. As seqüências não classificadas originalmente pelos autores estão indicadas como "nc".

\*\* Tipo 4a foi um nome proposto para os genótipos encontrados no Egito e Oriente Médio, com base nas seqüências das regiões do core e NS5. Existem semelhanças com outras variantes do tipo 4 encontradas na África Central, que estão sendo investigadas a partir de outras regiões do genoma do VHC.<sup>15,31</sup>

## GENÓTIPOS

A classificação escolhida e adotada desde 1994 separava os tipos virais em seis genótipos (1, 2, 3, 4, 5 e 6), apresentando 2 ou 3 subtipos (a, b, c) cada genótipo, de acordo com a similaridade genômica entre eles. A heterogeneidade presente entre os genótipos é encontrada com maior intensidade no envoltório viral.<sup>21</sup> Os genótipos são considerados como importantes marcadores epidemiológicos e de distribuição geográfica, podendo traçar o curso da infecção em uma dada população, pois a variação geográfica na prevalência dos vários genótipos é considerável, como vemos na tabela 2.<sup>26,31</sup>

Tabela 2 - Distribuição geográfica dos genótipos do VHC

| Área            | Tipo    |
|-----------------|---------|
| Brasil          | 1, 3, 2 |
| Europa          | 1, 2, 3 |
| Austrália       | 1, 2, 3 |
| EUA             | 1, 2, 3 |
| Extremo Oriente | 1, 2    |
| Oriente Médio   | 4       |
| África do Norte | 4       |
| África do Sul   | 4, 5    |
| Sudeste da Ásia | 6       |

Entre os genótipos pode haver diferentes prognósticos da doença, onde o tipo 1 prevalente em 40% a 80% da população mundial de infectados pelo VHC, parece representar o tipo viral mais agressivo, de prognóstico menos favorável e pior respondedor à terapia com Interferon, quando comparado com os tipos 2 e 3.<sup>32,33</sup>

Alguns genótipos - como 1a, 1b, 2a e 2b - possuem distribuição em todo o mundo, enquanto que os genótipos 5a e 6a são encontrados em regiões geográficas específicas.

Novas variantes foram citadas no Vietnã, Tailândia, Burma e Indonésia, sendo originalmente classificadas como genótipos 7, 8, 9, 10 e 11. Porém análises mostraram que os grupos 7, 8, 9 e 11 deveriam ser classificados no genótipo 6a e o tipo 10 agrupado dentro do tipo 3a. Na figura 3 temos a árvore filogenética do VHC, com todos seus tipos e subtipos representados.<sup>25,34</sup>

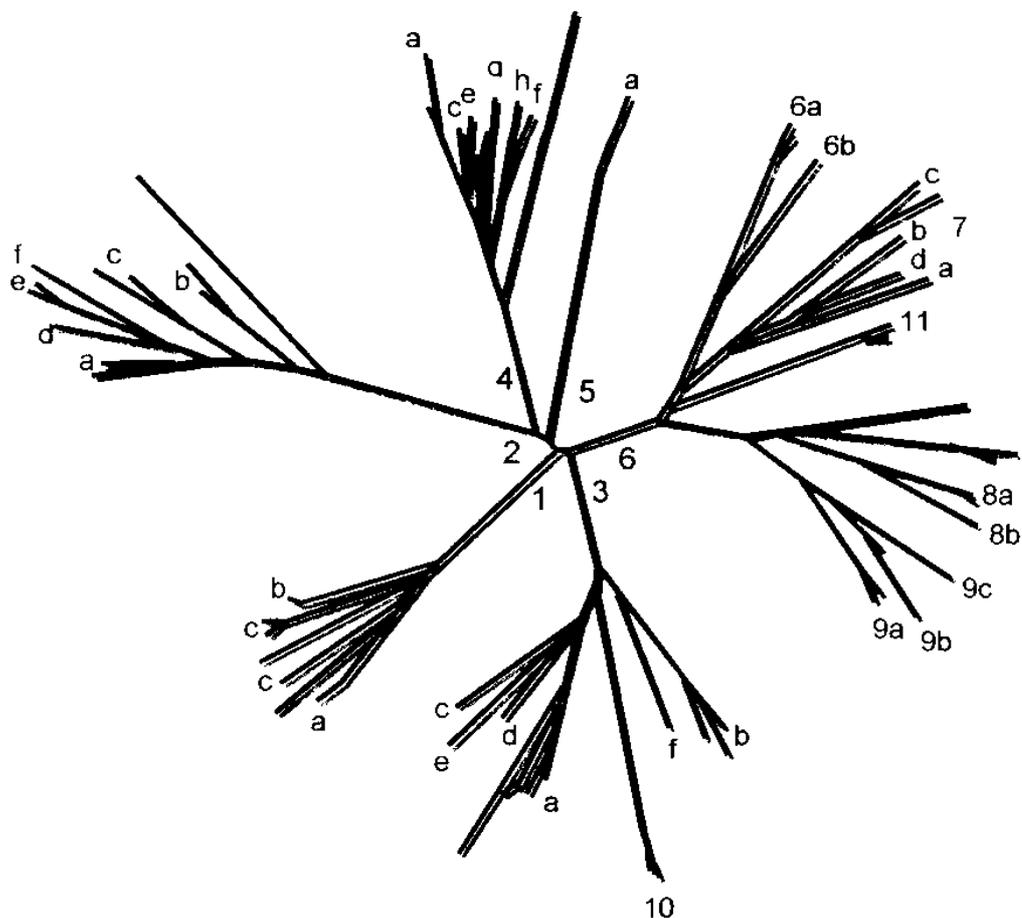


Figura 3 – Árvore filogenética representando os tipos de 1 a 6 do VHC e seus subtipos. Na figura acima temos os genótipos representados pelos ramos maiores, seguido pelos subtipos mostrados nos ramos menores.<sup>35</sup>

## QUASIESPÉCIES

O termo quasiespécies representa a heterogeneidade do VHC ocorrida em um mesmo hospedeiro durante o curso da infecção. Durante o tratamento podem ocorrer algumas mutações, dando origem a quasiespécies do indivíduo com infecção e permitindo, em muitos casos, que o VHC escape dos efeitos antivirais da medicação, levando-nos à conclusão de que, quanto menor a heterogeneidade do vírus, melhor a resposta que será obtida pelo paciente. Sua diversidade parece estar relacionada com a pressão imunológica, estabelecendo a infecção crônica no hospedeiro e talvez influenciando os resultados da terapia com interferon.<sup>32,34,36</sup>

## EPIDEMIOLOGIA

No início da década de 1970 foram realizados testes sorológicos direcionados à investigação dos vírus da Hepatite A (VHA) e B (VHB) nos inúmeros casos de hepatite pós-transfusional que possuíam suas causas etiológicas desconhecidas.<sup>1</sup>

Os resultados desses testes revelaram que 25% dos casos eram relacionados ao VHB, porém os casos remanescentes possuíam etiologia desconhecida, sendo considerados como hepatite não-A, não-B (HNANB).<sup>1</sup>

Os sintomas da HNANB nem sempre estavam presentes logo após os episódios de transfusão de sangue. Após acompanhamento foram observadas alterações das taxas de ALT e progressão para cirrose em alguns casos, gerando um maior interesse em estudar o agente causador dessa nova doença.<sup>1</sup>

No final dos anos 80 o genoma do agente causador da HNANB foi sequenciado pela Chiron Corporation, sendo então classificado como vírus da Hepatite C (VHC).<sup>3</sup>

A partir de sua identificação, inúmeros estudos foram iniciados e, em 1989, Choo e cols. desenvolveram um teste de detecção para o VHC pelo método ELISA, tornando possível o melhor conhecimento da situação epidemiológica do vírus.<sup>3</sup>

Os conhecimentos epidemiológicos sobre a infecção pelo VHC continuam em evolução, para futura elucidação completa da transmissão biológica do vírus.

Atualmente a infecção pelo vírus da Hepatite C é um grande problema de saúde pública e sua prevalência global está estimada em torno de 3% (variando de 0,1 a 5% em diferentes países). Existem cerca de 175 milhões de portadores crônicos de VHC em todo o mundo, dos quais cerca de 2 milhões estão nos EUA e 5 milhões na Europa Ocidental.<sup>32</sup>

A prevalência do VHC continua bastante elevada por causa de infecções crônicas contraídas antes da década de 1990 e pelo aumento no número de usuários de drogas ilícitas.<sup>37</sup>

Os indivíduos com idade entre 30 e 49 anos apresentam os maiores índices de prevalência da infecção pelo VHC nos EUA e Austrália, ao passo que no Brasil a infecção é mais frequente em jovens adultos (10 a 30 anos). Já em países menos desenvolvidos, a infecção ocorre em todas as faixas etárias, em decorrência da exposição a múltiplos fatores de risco.<sup>38</sup>

Não há um padrão étnico-racial, a infecção é predominante em jovens adultos, com leve prevalência no sexo masculino. O tempo de incubação médio é de seis a sete semanas, apresentando uma taxa de letalidade estimada, em suas formas crônicas, em cerca de 3%. Co-infecções com hepatite B e HIV são frequentes devido às formas comuns de contágio.<sup>37,38</sup>

A prevalência mundial da infecção pelo VHC no ano de 1998 em doadores de sangue variava de 0,04% a 26%; o Brasil encontrava-se no grupo com altas prevalências (1,6% a 3,5%), junto com Rússia e Oriente Médio.<sup>39</sup>

Anteriormente a causa mais comum da hepatite C foi a transfusão sanguínea, devido à capacidade que o vírus tem de permanecer no hospedeiro durante muitos anos sem apresentar

nenhuma manifestação clínica, porém mantendo viremia e, antes do desenvolvimento de técnicas de detecção, não havia triagem nos doadores. Testes sorológicos de triagem direcionados à investigação dos vírus das hepatites A (VHA) e B (VHB) realizados na primeira metade da década de 1970 revelaram que 75% dos casos de hepatite associados às transfusões sanguíneas foram considerados como hepatite C, na época ainda conhecida como hepatite não-A não-B, sendo os 25% dos casos remanescentes, relacionados ao VHB. A partir de 1990, a seleção dos doadores de sangue foi estabelecida com a ajuda de técnicas capazes de identificar a presença de anticorpos contra o VHC.<sup>21,40,41</sup>

Ao longo dos últimos anos houve uma redução gradual dos casos de Hepatite C pós-transfusional graças à aplicação de medidas mais restritivas na seleção dos doadores, como a introdução de testes sorológicos mais sensíveis e a utilização do NAT para a triagem das amostras de sangue recebidas. Atualmente o Brasil está estimado como um país com baixa endemicidade.<sup>37</sup>

No entanto, essa rota de transmissão continua sendo responsável por muitas contaminações prévias, especialmente em indivíduos que adquiriram a infecção antes do desenvolvimento dos testes de diagnósticos. Atualmente o maior meio de transmissão é o uso de drogas injetáveis.<sup>40,42-44</sup>

A infecção pelo vírus da Hepatite C se dá predominantemente através do contato com sangue e derivados contaminados, podendo ocorrer também devido ao uso de drogas ilícitas endovenosas, tatuagem, transplante de órgãos, acupuntura, compartilhado de canudo para uso de drogas inalatórias, acidentes com pérfuro-cortantes envolvendo profissionais da área da saúde e tratamentos médicos e odontológicos.<sup>37,45-47</sup>

Outro grupo com taxas de prevalência altas são os dependentes de sangue ou produtos de sangue humano, tais como hemofílicos. A prevalência de VHC entre os hemofílicos está intimamente relacionada com a quantidade e o tipo de produto transfundido. Antigamente acreditava-se que todos os hemofílicos expostos a sangue que não haviam sido previamente triados pelos testes imunológicos, iriam eventualmente contrair o VHC, contudo, atualmente, devido ao controle mais rigoroso da infecção em centros de diálise a taxa de prevalência nessa população é de 30%, variando geograficamente.<sup>40,48</sup>

Se levarmos o VHB e o HIV como exemplo, poderíamos sugerir que o VHC é uma Doença Sexualmente Transmissível (DST) e que pode ser transmitida pelo contato sexual? Qual seria o risco disso acontecer? Depende da população estudada? Comportamentos de risco podem alterar o potencial de contaminação?<sup>49-50</sup>

O risco de transmissão do VHC via fluido seminal é muito discutido, tanto na área de reprodução assistida como em estudos sobre o fator de risco da hepatite C ser ou não uma DST. O tipo de relacionamento sexual pode estar relacionado ao risco de transmissão sexual do VHC, pois aparentemente casais monogâmicos tendem a apresentar taxas de transmissão menores, quando comparados a um grupo de pessoas com múltiplos parceiros.<sup>50-52</sup>

O primeiro estudo que discute a transmissão sexual foi publicado por Alter em 1989. Nesse trabalho foi evidenciado como fator de risco múltiplos parceiros sexuais.<sup>51</sup>

A variação das porcentagens apresentadas sugere que a transmissão sexual apresenta riscos mínimos ou mesmo inexistentes, tendo porcentagens entre 0% a 3%, como mencionados na grande maioria dos trabalhos.<sup>53-55</sup>

Bodsworth e Cols, em 1996, ao analisar uma corte de 1.038 homossexuais masculinos encontraram 7,6% de positividade para o anti-VHC e sugeriram que a supressão imunológica causada pelo HIV pode ter sido um facilitador para a aquisição da infecção. Em 2001, Filippini afirmou que o risco de transmissão sexual é maior em pacientes co-infectados pelo HIV.<sup>50,56</sup>

A discussão da co-infecção pelo HIV permaneceu em um artigo de revisão publicado por Bonacini e cols. em 2000, que apresentou duas versões opostas: a primeira afirmava que parceiros sexuais de pacientes portadores de co-infecção HIV/VHC apresentam risco maior de contrair o VHC quando comparados com parceiros de sorologia negativa para HIV e positiva apenas para o VHC. A segunda versão afirmava que o risco de transmissão sexual do VHC em pacientes co-infectados não se altera ou é muito baixa.<sup>53</sup>

Outro grupo que deve ser levado em consideração são os pacientes que não pertencem a grupos de riscos, mas são portadores do VHC. Qual seria o risco de seus parceiros sexuais serem infectados por via sexual? Este é um grupo que deve ser considerado e avaliado cuidadosamente.<sup>49,53</sup>

Em média 30% a 40% dos pacientes infectados pelo VHC não possuem fonte identificada de aquisição do vírus. Essa população gera grande curiosidade, pois provavelmente a transmissão sexual, assim como outras formas de contato humano podem ter um papel significativo. Estudos realizados na Austrália demonstraram que os fatores de risco relacionados com transmissão sexual apresentaram índices menores que 2% e outro grupo australiano mencionou que a soropositividade entre parceiros sexuais foi maior que entre outros contactantes não sexuais.<sup>50,57-58</sup>

Um estudo realizado em 1994 por Soto e cols. avaliou 423 parceiros heterossexuais e sugeriu que a infecção pelo VHC pode ser transmitida sexualmente, mas com pouca eficiência, sendo que as taxas de transmissão podem ser aumentadas em casos de co-infecção. Em 1997, Tanaka e cols. observaram que esposas com parceiros VHC positivos apresentavam risco duas vezes maior quando comparados às esposas cujos parceiros não apresentavam infecção pelo VHC. Apesar da transmissão sexual do VHC não estar estabelecida, tal fato não deve ser negligenciado.<sup>52,59</sup>

Talvez o tempo de convivência possa justificar a transmissão sexual do VHC, porém esse fato também se tornou outro tema polêmico que deve ser ressaltado.

Rooney e Gilson publicaram uma estimativa de risco associado à infecção pelo VHC 3,7 vezes maior em mulheres com parceiros VHC positivo. Nesse trabalho também foi evidenciado que a transmissão intrafamiliar é importante e fica mais evidente quando somado ao contato familiar e o

comportamento sexual, o compartilhar de utensílios pessoais como lâmina de barbear, escova de dente, cortador de unha e alicate de manicure.<sup>57</sup>

Porém em 1997 Capelli e cols. publicaram um artigo baseado em uma doadora de repetição anual que apresentou positividade para PCR-VHC entre duas doações consecutivas, sendo constatado que a convivência com parceiro sexual portador crônico do VHC era o único fator de risco.<sup>58</sup>

A transmissão intrafamiliar, através do compartilhamento de materiais como alicate de manicure, lâmina de barbear e até mesmo escova de dente com indivíduos infectados pelo VHC, também já foi demonstrada anteriormente.<sup>60-61</sup>

Quando mencionamos sexo promíscuo, parceiro usuário de droga, DST associada, sexo pago e convívio de longa duração (>10 anos) com parceiro VHC positivo as taxas de transmissão do VHC se tornam significativamente mais altas, segundo Hershov e cols. em 1998.<sup>62</sup>

Uma série de pontos deve ser levada em consideração quando se fala em transmissão sexual do VHC, entre eles o número de parceiros.

Existem poucos relatos sobre transmissão sexual do VHC no Brasil, entre eles temos o de Mesquita e cols. em 1997, que realizaram um trabalho com uma população brasileira de prostitutas e seus clientes. Todos os fatores de risco associados com a transmissão da hepatite C foram analisados e por fim concluído que a transmissão sexual tem um papel importante na epidemiologia do VHC, principalmente quando o comportamento sexual promíscuo entra em cena.<sup>63</sup>

Outro trabalho brasileiro foi publicado em 2001 por Tengan e cols., onde 154 doadores de sangue que apresentaram reação sorológica para o VHC foram avaliados juntamente com seus parceiros sexuais. Foi evidenciado que 11,76% dos parceiros apresentaram-se infectados pelo VHC, sugerindo que a alta prevalência da infecção poderia ser atribuída, pelo menos em parte, à transmissão sexual.<sup>64</sup>

Outro item que deve ser observado é com relação à presença do VHC nas secreções, sêmen, saliva e sangue menstrual, e qual a relação com a transmissão sexual. Com o isolamento do VHC em sêmen e secreção vaginal, tem sido discutido qual o sentido mais provável de veiculação da infecção, de homem para mulher ou de mulher para homem, e até o momento as evidências sugerem que haja um potencial maior de transmissão no sentido homem para mulher. Certamente, traumas na mucosa durante o intercurso sexual e altos níveis de viremia aumentam os riscos de transmissão.<sup>65-68</sup>

Fabris e Cols., em 1999, estudaram a presença do VHC em saliva e seu risco de transmissão foi avaliado. Concluiu-se que a presença do vírus na saliva é considerável, porém não suficiente para a transmissão do VHC.<sup>69</sup>

A presença do VHC no sangue menstrual de 10 mulheres foi estudada em 1994 por Silverman e cols. e todas as amostras apresentaram positividade, sugerindo que este mecanismo possa ser uma rota de transmissão sexual mulher-homem da infecção pelo VHC.<sup>70</sup>

Em 2002 Cassuto e cols. publicaram um trabalho onde o sêmen de 35 homens foi avaliado e concluíram que existem dificuldades de se transpor os inibidores presentes no manuseio destas amostras durante a PCR-VHC, pois somente 5 homens apresentaram positividade. Foi observado pelo autor que os resultados podem ser falso-negativos.<sup>71</sup>

Essa grande dúvida se dá graças à contradição entre pesquisadores que conseguiram detectar o VHC no sêmen e pesquisadores que não obtiveram resultados satisfatórios.

Acredita-se que a dificuldade de isolar o vírus em fluídos corpóreos, principalmente em sêmen, devido à presença de inibidores e a falta de técnicas e protocolos padronizados utilizados na extração de RNA, reação de transcrição reversa e amplificação pela polimerase (RT-PCR), sejam os principais motivos que originam essa dúvida.<sup>71,72</sup>

**JUSTIFICATIVA**

---

---

O desafio da análise de amostras de sêmen para detecção de partículas do VHC se justifica pela falha de conhecimentos quanto á epidemiologia e fatores de risco para aquisição da doença que é desconhecido para uma parcela de 40% dos pacientes portadores do vírus.

## **OBJETIVOS**

---

---

1. Estabelecer uma técnica para detectar a ausência ou presença do vírus da Hepatite C no sêmen de pacientes infectados;
2. Comparar técnicas de manuseio das amostras de sêmen, procurando diminuir a quantidade de inibidores presentes nas amostras;
3. Comparar técnicas de PCR e detecção do vírus da Hepatite C nas amostras de sêmen, procurando aumentar a sensibilidade dos testes.



## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

---

## 1. SELEÇÃO DE PACIENTES

No período compreendido entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2007, pacientes do sexo masculino com diagnóstico clínico e laboratorial para infecção pelo VHC foram recrutados no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas do HC-FMUSP, conforme ilustrado na figura 4.

Atualmente o ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas, que iniciou suas atividades em 1987, possui cerca de 4.000 pacientes registrados. Aproximadamente 800 pacientes encontram-se em tratamento ou atendimento contínuo. Este serviço é referência para o encaminhamento de pacientes com diagnóstico de hepatite viral.

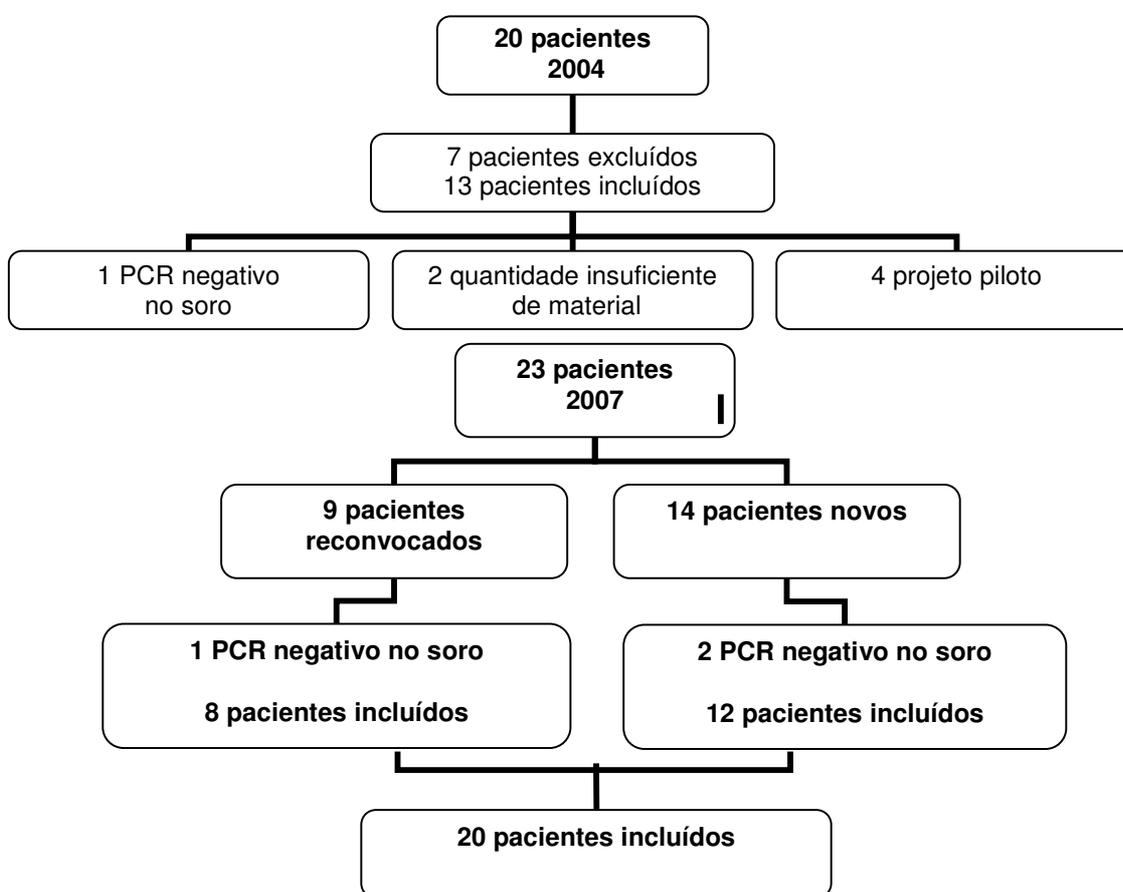


Figura 4: Organograma dos pacientes selecionados.

### 1.1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foi critério de inclusão a presença do RNA-HCV pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) no soro dos pacientes.

Foram excluídos pacientes que apresentaram co-infecção pelo HIV e/ou pelo HBV, pacientes vasectomizados e pacientes que se encontravam em tratamento para a infecção pelo HCV e PCR negativa.

## **2. ESTUDO REALIZADO**

### **2.1. Aspectos éticos do projeto**

O projeto contou com a colaboração de médicos infectologistas e pesquisadores do Laboratório de Hepatites (LIM 47) da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas do HC-FMUSP.

Os pacientes foram entrevistados e informados do teor deste projeto. Se estivessem de acordo, participariam mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (CEP-HCFM/USP).

### **2.2. Entrevistas**

Após terem concordado em participar como voluntários do projeto de pesquisa e terem assinado o Termo de Consentimento, os pacientes foram entrevistados individualmente, utilizando-se um questionário padronizado (ANEXO II) sobre os fatores de risco, forma de aquisição e utilização pregressa ou atual de medicamentos para tratamento do VHC.

### **2.3. Coleta de sangue**

O sangue dos pacientes foi coletado por punção venosa a vácuo, após 8 a 12 horas de jejum, com uso de tubo seco de 10mL, dessas amostras foram separados os soros, em prazo máximo de 4 horas após a coleta, por centrifugação a 6.200g por 10 minutos, aliquotados e conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### **2.4. Coleta de sêmen**

As amostras de sêmen foram obtidas após um período de abstinência sexual de no mínimo 3 (três) dias, através de masturbação. As amostras foram mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  até seu processamento em até 4 horas.

As coletas de soro e sêmen foram realizadas no mesmo dia, para que tivéssemos a garantia da positividade sérica do paciente.

#### **2.4.1 Processo de separação do sêmen**

As amostras de sêmen foram processadas de duas formas diferentes. Para testarmos a eficiência do método contra os inibidores presentes na amostra, foi realizada a separação das

alíquotas do sêmen com o auxílio de um gradiente descontínuo de concentração, e através de diluições seriadas, conforme descrito abaixo.

#### 2.4.1.1 Primeiro processamento: Gradiente descontínuo de concentração

As amostras para este teste foram coletadas no período de Janeiro a Dezembro de 2004 (n=13).

Com o auxílio do Percoll® 90% e 45% (gradiente descontínuo de concentração), 500µL das amostras foram centrifugados durante 30 minutos a 6200g e foram obtidas três fases: plasma seminal, leucócitos e espermatozóides (figura 4). As fases foram separadas em tubos diferentes e congeladas a -70°C até o uso. Antes da manipulação, foram separadas alíquotas de 200µl do sêmen total, para futuramente após termos o processamento dessas quatro frações (sêmen total, plasma seminal, leucócitos e espermatozóides) extraídos, compararmos os resultados obtidos.

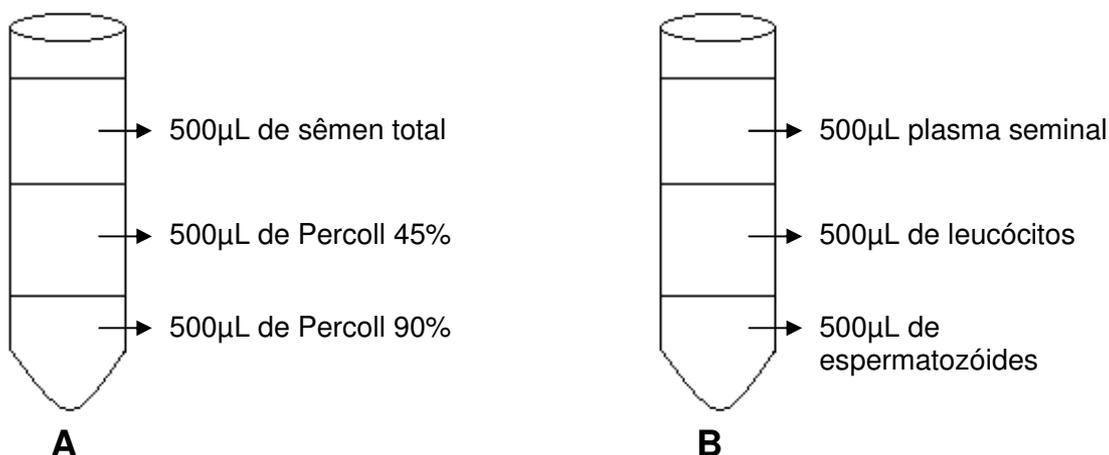


Figura 5 – Fracionamento celular das amostras de sêmen através do processo de gradiente descontínuo de concentração.

Em A: material antes de ser centrifugado; em B: frações do sêmen já centrifugadas.

#### 2.4.1.2 Segundo processamento: Diluição seriada

Para este teste, as amostras foram coletadas no período de janeiro a dezembro de 2007, quando alguns pacientes que já haviam participado desta pesquisa, foram reconvidados para realizar uma nova coleta das amostras (n=9), assim como novos pacientes foram selecionados (n=14), conforme ilustrado na figura 4.

De acordo com a figura 6: 1) Foram separadas 2 alíquotas de 400µL do sêmen total; 2)O volume de sêmen restante foi transportado para um tubo Falcon de 15mL e centrifugado a 16000g por 10 minutos; 3)Duas alíquotas de 400µL do plasma seminal (sobrenadante) foram separadas; e 4)O processo da diluição seriada foi realizado nas 4 alíquotas de sêmen (A, B, C e D).

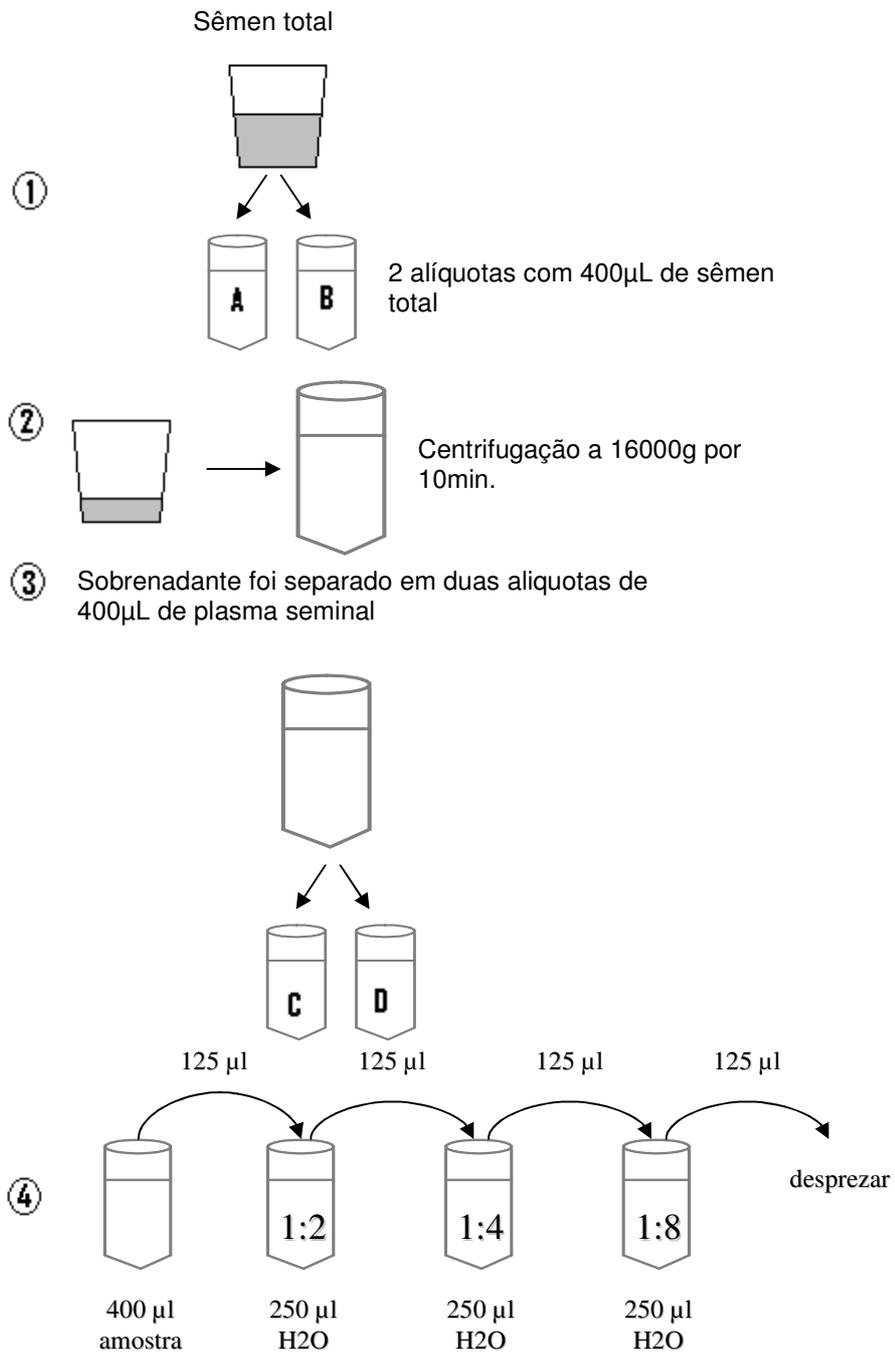


Figura 6 – Passo-a-passo da diluição seriada.

### **2.3.2. Análise Laboratorial**

Foi analisada a presença de HCV-RNA em soro pelo método Amplicor® HCV Test, version 2.0 (Roche Diagnostics S.L.), teste qualitativo, de todos os pacientes selecionados durante as fases de coleta. Posteriormente, se positivas, as amostras de sangue foram genotipadas. Todas as amostras de sêmen foram extraídas, pelo mesmo método, e a PCR executada.

Após serem comparados os resultados dos dois tipos de processamento de sêmen para verificarmos a eficácia dos procedimentos na eliminação ou diminuição dos inibidores presentes, começamos a testar a técnica de PCR em Tempo-real, para aumentar a sensibilidade dos testes nas amostras de soro e sêmen diluídas em série.

As análises da PCR pelo método AMPLICOR e genotipagem foram executadas no Laboratório de Hepatites LIM-47 do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP. As análises pela PCR em tempo real foram executadas no LIM-52, Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da FMUSP, em parceria com Dr. José Eduardo Levi.

## **3. TESTES LABORATORIAIS UTILIZADOS**

### **3.1. Amplicor® HCV Test, version 2.0 (Roche Diagnostics S.L.), teste qualitativo**

#### **3.1.1. Preparação das Amostras**

- As amostras e todos os reagentes foram deixados à temperatura ambiente;
- Os cristais da solução de lise foram dissolvidos por completo a 37°C;
- Os tubos de 1,5mL foram identificados para cada amostra e controles;
- As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, foi dado vórtex de 3 a 5 segundos;
- Um spin foi realizado nas amostras;
- A solução de lise foi preparada e foram adicionados 100µL do controle interno num frasco de solução de lise. Este produto teve estabilidade de 8 horas à temperatura ambiente;
- Foram pipetados 400µL da solução de lise em cada tubo devidamente identificado;
- Foram adicionados 200µL do soro ou sêmen de cada paciente e imediatamente agitados no vórtex por 3 a 5 segundos.

#### **3.1.2. Preparação dos Controles**

- Nos controles negativos e positivos, foram adicionados 200µL de plasma humano normal, fornecidos pelo kit, e agitados em seguida no vórtex por 3 a 5 segundos;
- Foram adicionados 20µL dos controles nos tubos correspondentes.

### **3.1.3. Extração de RNA de todas amostras**

- Todos os tubos (controles e amostras) foram incubados por 10 minutos à temperatura de 60°C;
- Foram adicionados 600µL de Isopropanol, e agitados imediatamente no vórtex por 3 a 5 segundos;
- Todos os tubos foram incubados por 2 minutos à temperatura ambiente;
- A face externa dos tubos foi marcada em relação à centrifuga, para identificar a localização do pellet;
- Os tubos foram centrifugados entre 13000 a 16000g por 15 minutos à temperatura ambiente;
- O sobrenadante foi descartado com pipeta Pasteur de 2mL, tomando-se cuidado para não raspar ou perder o pellet;
- Etapa extra de centrifugação por 13000 a 16000g por 10 minutos;
- Foram adicionados 1000µL de etanol 70%, preparados no momento do uso;
- As amostras foram centrifugadas de 13000 a 16000g por 5 minutos;
- O sobrenadante foi descartado com a pipeta Pasteur;
- Uma centrifugação rápida (spin) foi realizada e o etanol residual foi removido com uma pipeta de 200µL;
- Adicionamos 200µL do diluente, fornecido pelo kit.

### **3.1.4. Preparação do Master Mix (pré-amplificação)**

- A quantidade de tubos de reação para amostras e controles foi posicionada na bandeja que vai ao termociclador;
- O master mix foi preparado adicionando 100 µL de HCV Mn<sup>2+</sup> no frasco de HCV MMX, ambos fornecidos pelo kit, sendo agitado 10 a 15 vezes por inversão. Este produto teve estabilidade de 4 horas até 8°C;
- Foram distribuídos 50µL de Master Mix em cada tubo de reação.

### **3.1.5. Preparação das amostras para amplificação**

- O pellet da parede do tubo foi raspado e quebrado com uma ponteira de 200µL;
- Foram pipetados 50µL das amostras preparadas nos tubos de reação, evitando-se qualquer precipitado;

- As amostras foram tampadas e levadas ao Termociclador. Uma vez colocada a amostra preparada no Master Mix, a amplificação deveria ser iniciada dentro de 45 minutos.

### 3.1.6. Amplificação das amostras

Tempo de reação de aproximadamente 1 hora e 45 minutos. As amostras tiveram que ser removidas dentro de 3 horas do Hold Final (tabela 1) e poderiam ser retiradas a qualquer momento desse período final.

**Tabela 3 – Ciclos de temperatura e tempo da reação pelo método Amplicor Roche, teste qualitativo**

| Fase  | Temperatura | Tempo     |          |
|-------|-------------|-----------|----------|
| Hold  | 50°C        | 5 min     |          |
| Hold  | 62°C        | 30 min    |          |
| Cycle | 90°C        | 10 seg    | 37 vezes |
|       | 58°C        | 25 seg    |          |
| Hold  | 91°C        | Até 3 hs. |          |

### 3.1.7. Detecção das amostras amplificadas

Todas as amostras amplificadas foram detectadas utilizando o método Amplicor, sensibilidade 50UI/mL.

#### 3.1.7.1. Detecção pelo método Amplicor Roche

A detecção do material amplificado é realizada através de sondas de oligonucleotídeos específicos, que permitem a identificação do VHC e do controle interno.

- Ao término da amplificação foram adicionados 100µL da solução de desnaturação em cada tubo e homogeneizado. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente;
- Todos os reagentes fornecidos pelo método foram deixados à temperatura ambiente;
- Foram pipetados 100µL da solução de hibridização em cada poço das placas de controle interno e HCV;
- Adicionamos 25µL da amostra desnaturada;
- Incubamos por 60 minutos a 37°C;
- Preparamos a solução de lavagem;
- Lavamos a placa 5 vezes, para retirar todo o tampão residual batemos a placa;

- Adicionamos 100µL do Conjugado, fornecidos pelo kit;
- Incubamos 15 minutos a 37°C;
- Preparamos o Substrato e deixamos ao abrigo da luz;
- Lavamos a placa 5 vezes, batemos para retirar todo o líquido residual;
- Adicionamos 100µL do substrato;
- Incubamos por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz;
- Adicionamos 100µL da solução Stop;
- Lemos a placa em 450nm, no máximo 30 minutos após a adição da solução de stop.

#### **3.1.7.1.1. Interpretação dos resultados**

- HCV RNA não detectado → A amostra é negativa para VHC. Para garantir a veracidade do resultado, o controle interno deve ser positivo;
- Inibição da amostra → Quando a leitura da amostra e do controle interno não apresentam positividade, podemos concluir que houve uma inibição da reação;
- HCV RNA detectado → As amostras de VHC são interpretadas como positivas, independente do resultado apresentado no controle interno da amostra.

### **3.2. Genotipagem do VHC**

Todas as amostras foram genotipadas a partir da região 5'NCR do VHC, utilizando-se o kit Versant™ HCV Genotype Assay (Siemens).

Os produtos da PCR utilizados na genotipagem foram amplificados a partir do kit Amplicor Roche, version 2.0, segundo as instruções do fabricante.

O kit Versant™ HCV Genotype Assay utiliza o método da hibridização reversa. O produto da amplificação foi produzido utilizando-se primers biotinizados, que foram hibridizados com sondas de oligonucleotídeos imobilizados nas fitas de nitrocelulose, específicas para os diferentes genótipos e subtipos do HCV (Figura 7).

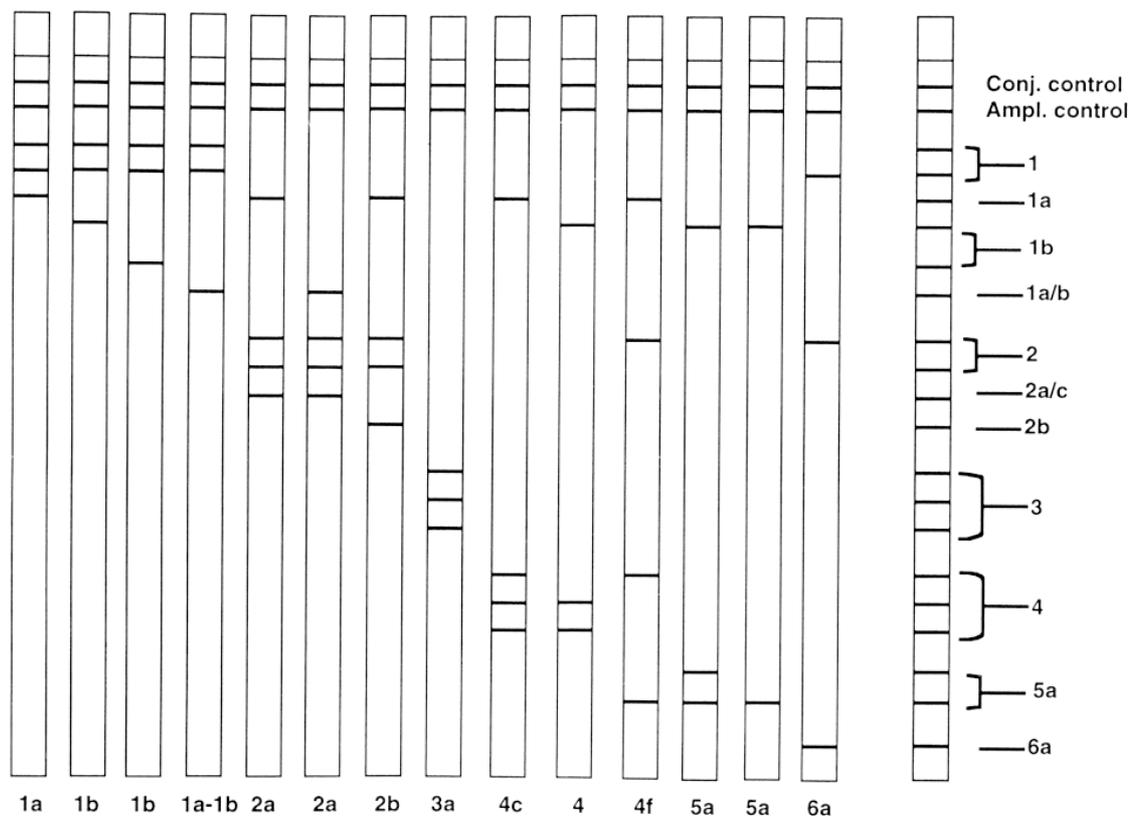


Figura 7 – Fitas de nitrocelulose em diagnóstico de genotipagem.

Figura da esquerda: Demonstramos como as fitas são visualizadas na prática. Figura da direita: demonstramos todas as bandas presentes em uma fita de nitrocelulose utilizada para genotipagem, com todos os possíveis genótipos e subtipos.

### 3.3. PCR TEMPO REAL “in house”

Sensibilidade: 60,35 UI/mL.

Todas as amostras de soro e sêmen coletadas em 2007 também foram detectadas por PCR em Tempo-real.

Os materiais extraídos pelo Amplicor® Roche foram utilizados para a síntese de cDNA utilizados na PCR em Tempo-real, conforme descrito abaixo.

- **Síntese do cDNA** → A reação foi realizada montando-se um mix (Mix I) de volume final de 69,2µl contendo 8,0µl de Tampão de PCR 10x concentrado (Invitrogen® - Minus MgCl<sub>2</sub>), 6,4µl de dNTP's (2,5mM) (Invitrogen®), 8,0µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM) (Invitrogen®), 2,0µl de Inibidor Recombinante de Ribonuclease (40U/µl) (RNaseOUT™ - Invitrogen®), 0,8µl de DTT (dithiothreitol) (0,1M) (Invitrogen®) e 44,0µL de RNA.(Amplicor) Esta mistura foi

submetida a condições de 65°C por 5 minutos. Em seguida foi preparado outro mix (Mix II) contendo 4,0µl de Random Primers (50uM) (Invitrogen®), 1,0µL de M-MLV (200U/µl) e 6,0µl de H<sub>2</sub>O DEPC (UltraPure™ DEPC-treated Water Invitrogen®). À reação inicial (Mix I) foram adicionados 11,0µl do Mix II. Em seguida a reação foi submetida a 22°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos.

Após a síntese de cDNA os mesmos poderiam ter sido utilizados imediatamente para ensaios de PCR ou congelados a -20°C para uso posterior.

- **PCR Tempo-real** → Para a realização da PCR em Tempo-real foi utilizada a sonda Pack Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), que é um sistema composto de reagentes necessários para a realização da atividade 5' nucleásica, exceto primers e probe. Detecta sequências conhecidas de DNA genômico, plasmídeo ou cDNA e um Assay mix (10x) contendo os primers SM4 (CTAGCCATGGCGTTAGTAYGA) e P50 (TACTCACCGGTTCCGCAGA) e a probe proC1 (TCCCGGGAGAGCCATA) necessários para a PCR. Foi montado um mix com 12,5µl TaqMan MasterMix (2x); 2,5µl Assay mix (10x) e 10µl cDNA.

As amostras foram submetidas ao ciclo descrito abaixo:

**Tabela 4: Ciclos de temperatura e tempo da PCR Tempo-real.**

| Fase  | Temperatura | Tempo  |          |
|-------|-------------|--------|----------|
| Hold  | 50°C        | 2 min  |          |
| Hold  | 95°C        | 10 min |          |
| Cycle | 95°C        | 20 seg | 45 vezes |
|       | 55°C        | 25 seg |          |
|       | 60°C        | 1 min  |          |

#### 4. Análise dos Dados Coletados

A análise inicial das possíveis vias de aquisição do VHC pelos pacientes incluídos no estudo foi realizada em etapas, descritas a seguir:

1. Cálculo da proporção de pacientes com antecedentes de:
  - 1.1 Ter recebido transfusão de sangue e/ou hemocomponentes;
  - 1.2 Usar/ter feito uso de droga injetável;
  - 1.3 Usar/ter feito uso de droga inalatória;
  - 1.4 Sem epidemiologia aparente.
2. Análise dos genótipos dos pacientes incluídos no estudo.
3. Comparação dos resultados de sêmen pelas metodologias de processamento utilizadas: gradiente descontínuo de concentração e diluição seriada.

4. Comparação dos resultados obtidos através da PCR convencional (Amplicor Roche®) e a PCR em Tempo-real, nas amostras de soro e sêmen processadas através da diluição seriada. A significância entre os dois métodos de PCR foi analisada estatisticamente pelo Teste de Concordância de Mc'Nemar e Teste de Simetria de Pearson.

## RESULTADOS

---

---

Dos 20 pacientes selecionados em 2004 para este estudo, sete foram excluídos: um por apresentar o PCR-HCV do soro negativo; dois por apresentarem uma quantidade insuficiente de material e quatro por terem sido utilizados em projeto piloto cujo método não seguia os mesmos padrões aqui estabelecidos. Portanto, concluímos a primeira fase do trabalho com 13 pacientes.

Dos 23 pacientes selecionados em 2007, um paciente do grupo dos reconvocados e dois pacientes novos foram excluídos por apresentarem o PCR-HCV do soro negativo.

Portanto, concluímos a segunda fase do trabalho com 20 pacientes, sendo 8 pacientes de 2004 que foram reconvocados e 14 pacientes selecionados em 2007.

Dos 27 pacientes estudados (13 pacientes de 2004 e 14 pacientes de 2007), a média de idade foi de 40,77 anos (28-50 anos), com mediana de 45 anos.

Quanto ao tempo de descoberta da infecção pelo VHC, a média foi de 7,15 anos (2-14 anos) e mediana de 7 anos.

Tabela 5 – Distribuição dos 27 pacientes quanto a fatores de risco para aquisição do VHC.

| <b>Epidemiologia</b>                              | <b>Nº de pacientes</b> | <b>%</b>    |
|---|------------------------|-------------|
| <b>Desconhecida</b>                               | 10                     | 37,1%       |
| <b>Usuário de droga injetável e/ou inalatória</b> | 8                      | 29,6%       |
| <b>Transfusão sanguínea</b>                       | 6                      | 22,2%       |
| <b>U.D e transfusão</b>                           | 2                      | 7,4%        |
| <b>Profissional da saúde</b>                      | 1                      | 3,7%        |
| <b>Total</b>                                      | <b>27</b>              | <b>100%</b> |

Tabela 6 – Distribuição dos 27 pacientes quanto aos subtipos do VHC 1a, 1b, 1a/1b, 2b e 3a.

| <b>Genótipo</b> | <b>Nº de pacientes</b> |
|-----------------|------------------------|
| <b>1a</b>       | 7 (26,0%)              |
| <b>1b</b>       | 4 (14,8%)              |
| <b>1a/1b</b>    | 2 (7,4%)               |
| <b>2b</b>       | 3 (11,1%)              |
| <b>3a</b>       | 11 (40,7%)             |
| <b>Total</b>    | <b>27 (100%)</b>       |

Tabela 7 – Resultados obtidos pela revelação através do método Amplicor Roche®, teste qualitativo das amostras de sêmen processadas com o gradiente descontínuo de concentração.

| Paciente | Soro     | Sêmen Total | Plasma Seminal | Leucócitos | Espermatozóides |
|----------|----------|-------------|----------------|------------|-----------------|
| 01       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 02       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 03       | Positivo | Inibido     | Negativo       | Inibido    | Inibido         |
| 04       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 05       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 06       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 07       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 08       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 09       | Positivo | Inibido     | Negativo       | Inibido    | Inibido         |
| 10       | Positivo | Negativo    | Negativo       | Negativo   | Positivo        |
| 11       | Positivo | Inibido     | Negativo       | Inibido    | Inibido         |
| 12       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |
| 13       | Positivo | Inibido     | Inibido        | Inibido    | Inibido         |

Tabela 8 – Comparação entre as técnicas de PCR comercial (Roche Amplicor) e Tempo-real (TR) nas amostras de soro, sêmen total e processadas através da diluição seriada de sêmen 1:2, sêmen 1:4 e sêmen 1:8

| Amostras | Soro                |                    | Semem Total |          | 1:2      |          | 1:4      |          | 1:8      |          |
|----------|---------------------|--------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|          | Roche               | TR                 | Roche       | TR       | Roche    | TR       | Roche    | TR       | Roche    | TR       |
|          | 1                   | PACIENTE EXCLUÍDO* |             |          |          |          |          |          |          |          |
| 2        | Positivo            | Positivo           | Positivo    | Negativo | Inibido  | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 3        | Positivo            | Positivo           | Positivo    | Negativo |
| 4        | PACIENTE EXCLUÍDO*  |                    |             |          |          |          |          |          |          |          |
| 5        | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 6        | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo |
| 7        | Positivo            | Positivo           | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 8        | Positivo            | Positivo           | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 9        | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Positivo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 10       | PACIENTE EXCLUÍDO** |                    |             |          |          |          |          |          |          |          |
| 11       | Positivo            | Positivo           | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 12       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo | Negativo | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo |
| 13       | Positivo            | Positivo           | Positivo    | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Positivo |
| 14       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo |
| 15       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 16       | Positivo            | Positivo           | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Inibido  | Positivo | Negativo | Negativo |
| 17       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 18       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo | Negativo | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Positivo |
| 19       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo |
| 20       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo |
| 21       | Positivo            | Positivo           | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 22       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Negativo | Inibido  | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo |
| 23       | Positivo            | Positivo           | Inibido     | Positivo | Inibido  | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo |

\*amostra insuficiente \*\*PCR em soro negativa

Na diluição 1:2 não foi possível realizar a análise estatística, onde seria necessário ao menos um paciente positivo. A diluição 1:8 foi a que melhor apresentou semelhança entre os métodos (McNemar igual a 1 e uma correlação entre os métodos de  $p=0,001$ ).

Tabela 9 – Comparação entre as técnicas de PCR comercial (Roche Amplicor) e Tempo-real (TR) nas amostras de plasma seminal total processadas através da diluição seriada de plasma 1:2, plasma 1:4 e plasma 1:8

|    | Amostras            |          |          |          |          |          |          |          |
|----|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|    | Plasma Total        |          | 1:2      |          | 1:4      |          | 1:8      |          |
|    | Roche               | TR       | Roche    | TR       | Roche    | TR       | Roche    | TR       |
| 1  | PACIENTE EXCLUÍDO * |          |          |          |          |          |          |          |
| 2  | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 3  | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 4  | PACIENTE EXCLUÍDO*  |          |          |          |          |          |          |          |
| 5  | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 6  | Negativo            | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 7  | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 8  | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 9  | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 10 | PACIENTE EXCLUÍDO*  |          |          |          |          |          |          |          |
| 11 | Inibido             | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 12 | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 13 | Positivo            | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 14 | Inibido             | Negativo |
| 15 | Inibido             | Negativo | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| 16 | Negativo            | Negativo | Inibido  | Positivo | Inibido  | Negativo | Negativo | Positivo |
| 17 | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 18 | Inibido             | Negativo |
| 19 | Inibido             | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 20 | Negativo            | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 21 | Inibido             | Negativo | Inibido  | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo |
| 22 | Inibido             | Negativo | Inibido  | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Negativo |
| 23 | Inibido             | Negativo | Inibido  | Negativo | Inibido  | Negativo | Negativo | Positivo |

\*amostra insuficiente \*\*PCR em soro negativa

Na dosagem do plasma total não foi possível realizar a análise estatística, onde seria necessário ao menos um paciente positivo em cada método. A diluição 1:8 foi a que melhor apresentou semelhança entre os métodos (Mc Nemar igual a 1 e não houve correlação entre os métodos  $p=0,641$ ).

**DISCUSSÃO**

---

---

O vírus da Hepatite C (VHC) vem sendo amplamente estudado desde seu descobrimento em 1989, e, mesmo após 15 anos, um aspecto continua em discussão: se o VHC é ou não sexualmente transmissível.<sup>3-5</sup>

Estudos epidemiológicos indicam que a forma mais eficiente de transmissão é a parenteral, transmitida através do contato com sangue e derivados contaminados pelo VHC, porém ainda continua incerta a contribuição exercida por outros fluídos corpóreos, tais como saliva, urina, líquido ascítico e principalmente sêmen.<sup>68</sup>

O sêmen é formado pelos espermatozoides e pelo plasma seminal secretado, principalmente, pela próstata e vesícula seminal. A secreção da vesícula seminal contém frutose, fosfatos, nitrogênio não protéico, cloretos, colina e prostaglandinas; e na secreção prostática podemos encontrar sódio, potássio, cálcio, ácido cítrico, espermina, zinco, magnésio e várias enzimas como a fosfatase ácida, fibrinolissina, muromidase, deidrogenase e outras.<sup>73</sup>

O fato de o sêmen possuir muitos componentes e prováveis inibidores da PCR-HCV exigiu que fossem realizadas técnicas de processamento diferentes para o sêmen e uma extração cuidadosa, tornando este o passo mais importante de toda a reação. O método de extração selecionado foi o Amplicor Roche®, que é utilizado no LIM-47 para os exames de rotina para diagnóstico do VHC.

Devido à presença de inibidores, alguns pesquisadores conseguiram detectar o VHC no sêmen, ao passo que outros não obtiveram resultados satisfatórios. Quando lidamos com extração de RNA no sêmen nos deparamos com falsos negativos, devido aos inibidores que podem interferir durante o processo de amplificação e enzimas inerentes ao sêmen, que podem degradar o RNA do VHC durante o armazenamento e processamento do material.<sup>72,74-75</sup>

Nosso estudo teve como objetivo comparar: a eficácia de dois protocolos de processamento do sêmen e duas técnicas de PCR diferentes, na tentativa de avaliar a presença ou ausência do vírus da hepatite C no sêmen de pacientes infectados.

Este projeto teve início há cerca de cinco anos quando foi realizado um estudo piloto com quatro pacientes, naquela ocasião foi utilizada a técnica "in house" Nested-PCR-VHC, presente na

rotina deste laboratório. Posteriormente, a técnica utilizando-se o Kit comercial Amplicor HCV Test®, version 2.0 (Roche Diagnostics S.L.) foi acrescida e utilizada neste protocolo.

Com base nas informações obtidas a partir dos questionários, os fatores de risco para aquisição da doença foram resgatados nos 27 pacientes. Entretanto, por ser um grupo pequeno tornou-se inviável realizar uma análise estatística.

No Brasil, a prevalência de indivíduos com infecção pelo VHC entre 30 a 45 anos de idade corrobora estes dados da literatura. Neste trabalho a idade média foi de 40,77 anos, coincidindo com outros estudos relatados de prevalência mundial.<sup>38</sup>

Em 1990, testes de alta sensibilidade foram introduzidos em grandes centros de doação de sangue, diminuindo drasticamente as taxas de contaminação, o que explica atualmente uma maior prevalência em pacientes mais idosos.<sup>41</sup>

O uso de drogas injetáveis e/ou inalatórias é, atualmente, um dos mais importantes fatores de risco de transmissão do VHC, constatamos que 37,1% dos pacientes envolvidos na pesquisa relataram uso de drogas injetáveis. Em algumas comunidades essa taxa chega a atingir 60% dos casos novos.<sup>38</sup>

A transmissão através do uso de drogas inalatórias ainda não está bem esclarecida, porém acredita-se que seja decorrente da absorção de sangue contaminado pela mucosa nasal através dos papelotes utilizados coletivamente.<sup>38</sup>

O genótipo do VHC é um importante marcador epidemiológico e de distribuição geográfica. Em nosso estudo, foi selecionado um número pequeno de pacientes, o que impossibilitou a obtenção de dados estatísticos significativos quanto à distribuição dos genótipos.

Porém, coincidem os dados deste trabalho e os encontrados na literatura, relatando a prevalência dos genótipos circulantes em nosso meio.

Cavalheiro, em 2002, citou que os genótipos encontrados com maior frequência no Brasil são os tipos 1 (70%), 2 (4,2%) e 3 (22,3%), o que foi evidenciado em nosso estudo, como podemos ver na tabela 6.<sup>20</sup>

Apesar dos genótipos 1, 2 e 3 aparecerem com maior frequência, acredita-se que a prevalência entre eles denuncie variações geográficas que podem estar relacionadas com a história e evolução do VHC.<sup>76</sup>

Ao analisarmos a tabela 5 notamos que dez pacientes apresentaram epidemiologia desconhecida. Qual a origem da infecção desses portadores do VHC sem fatores de risco mencionados? Ao questioná-los, tais pacientes não pertenciam ao grupo de risco parenteral, também não relataram uso de drogas, transfusões, tatuagens e cirurgias prévias.

Cavalheiro, em 2004, estudou a transmissão da hepatite C entre 24 casais heterossexuais. No entanto, um casal lhe chamou a atenção por não apresentar epidemiologia, ou compartilhamento de utensílios de higiene pessoal, e, ao analisar o genoma do vírus deste casal foi evidenciado, similaridade de 98,7%, sugerindo que houvesse possibilidade de transmissão sexual.<sup>60</sup>

Esses pacientes sem epidemiologia aparente abrem precedentes para a possibilidade de transmissão sexual do VHC, justificando a continuidade de estudos mais abrangentes sobre a questão, analisando comportamento familiar e sexual ou utilização de medicinas alternativas; enfim, um questionário epidemiológico bem direcionado poderá revelar fatores de risco não tão aparentes.<sup>77</sup>

Ao analisarmos a tabela 7 podemos observar que todas as amostras de soro e sêmen tiveram seu RNA extraído e detectado a partir do método Amplicor Roche, teste qualitativo. Também pudemos observar que todos os pacientes apresentaram positividade sérica.

Este achado foi essencial para que fossem feitas as análises no sêmen, pois de acordo com Liou e cols. homens que apresentam VHC RNA negativo no soro, não carregam o vírus no sêmen.<sup>68</sup>

No entanto, nas amostras de sêmen processadas com o auxílio do gradiente descontínuo de concentração obtivemos 12 inibições e 1 positivo na fração dos espermatozoides, 12 inibições e 1 negativo nos leucócitos e, finalmente, no plasma seminal encontramos 4 amostras negativas e 9 inibidas como resultado.

Estes resultados nos levam a crer que o método Amplicor Roche que apresenta sensibilidade de 50UI/ml tenha nos fornecido resultados corretos, onde as amostras, por apresentarem inibidores, como citado anteriormente, possam ter inibido a reação de amplificação.

Entre todas as amostras com inibição e/ou prováveis falso-negativos, não podemos deixar de notar o paciente 10. Dentre suas amostras, o sêmen total, os leucócitos e o plasma seminal apresentaram resultados negativos e o espermatozóide apresentou positividade.

As possibilidades de explicação para o caso acima são inúmeras. É curioso perceber que apenas um paciente não apresentou inibição em nenhuma fração do sêmen, resultado que difere de todos os outros pacientes, sabendo que as técnicas de separação das frações, extração do RNA, amplificação e revelação foram iguais para todas as amostras analisadas. Podemos crer como cada indivíduo é único, que possa haver outros fatores, que não a carga viral, que estejam associados à presença do VHC no sêmen.<sup>72</sup>

Já nas tabelas 8 e 9, tivemos a oportunidade de comparar os dois protocolos de processamento de sêmen, para alguns pacientes selecionados em duas técnicas de PCR diferentes, a PCR convencional e a PCR-Tempo-real. Ao analisarmos estes resultados podemos perceber que a realização de diluições seriadas mostrou-se eficaz contra os inibidores presentes nas amostras de sêmen, porém a quantidade de resultados não detectados aumentou significativamente.

Com a utilização das diluições seriadas, a concentração de inibidores foi diluída, porém a possível carga viral presente nas amostras também pode ter sido prejudicada. Como vemos nas tabelas 8 e 9, obtivemos 15 resultados positivos, 41 inibidos e 104 negativos, na PCR convencional. Com base nesses resultados percebemos a extrema importância de uma técnica mais sensível de detecção do vírus em amostras como o sêmen.

Ao analisarmos essas amostras com a PCR Tempo-real obtivemos 8 resultados positivos, 0 (zero) inibidos e 152 negativos. Podemos perceber um aumento significativo nos resultados negativos. Isso é decorrente do fato de que na PCR em Tempo-real não foi utilizado nenhum controle interno que nos certifique de que não houve inibição nessas amostras.

O risco de transmissão sexual tem sido muito discutido, estima-se que a taxa nos EUA seja de 1-6% e na Itália de 10%.<sup>42,45</sup>

Alguns artigos mencionam pouca ou nenhuma evidência de transmissão sexual. Everhart e cols., em 1990, estudaram 42 casos de parceiros heterossexuais, onde nenhum paciente apresentou

positividade, entretanto o método utilizado, testes de anticorpos de 1ª geração, é considerado desatualizado e pouco sensível.<sup>78</sup>

Healey e cols., em 1995, realizaram um estudo sobre a transmissão da hepatite C aguda após exposição sexual. Foram encontrados pacientes com positividade para VHC e com parceiros sabidamente HCV positivo. Tais relatos indicam que parceiros sexuais podem ser infectados, porém não há garantia de que a via de transmissão seja a sexual.<sup>79</sup>

Rooney, após analisar ambos os artigos citados acima, concluiu, em seu artigo, que a detecção do HCV RNA no sêmen em alguns estudos demonstra a transmissão sexual, mas não para todos os estudos.<sup>57</sup>

Bourlet e cols., em 2003, conseguiram positividade em 12,5% dos plasmas seminais de pacientes cronicamente infectados pelo VHC, e curiosamente afirmam ter encontrado estudos anteriores que falharam ao detectar o vírus no sêmen.<sup>74</sup>

O autor acredita que, para que haja um aconselhamento adequado aos pacientes, é necessária a obtenção de mais dados sobre os riscos de transmissão sexual.<sup>74</sup>

Terrault, em 2002, concluiu que a transmissão sexual pode ser considerada como um fator de risco principalmente nos casos agudos, onde 18% dos pacientes entrevistados relataram ter tido contato sexual com parceiros portadores do vírus.<sup>80</sup>

Em 2006, Canto e cols. concluíram que a presença do vírus da Hepatite C no sêmen podia ser detectado nas amostras que não haviam sido “lavadas”, sugerindo que a transmissão sexual pudesse ocorrer com baixa frequência.<sup>75</sup>

Durante o andamento do nosso projeto pudemos observar a eficácia da diluição seriada contra os inibidores presentes nas amostras de sêmen, principalmente as frações 1:8, que estatisticamente melhor apresentou semelhança entre os métodos. A técnica de PCR em Tempo-real testada se mostrou tão eficaz quanto a técnica da PCR convencional, porém a adição de um controle interno se mostrou necessária para a confiabilidade dos resultados.

O desafio da análise de amostras de sêmen para detecção de partículas do VHC se justifica pela falha de conhecimentos quanto à epidemiologia e fatores de risco para aquisição da doença que é

desconhecido para uma parcela de 40% dos pacientes portadores do vírus. As dificuldades impostas por inibidores da amplificação genômica presentes na secreção de sêmen, que levam a resultados falso-negativos foram alvo deste estudo onde procuramos caminhos e técnicas alternativas disponíveis em nosso meio que pudessem criar expectativas de sucesso na detecção.

Persistimos na expectativa de continuidade na linha de pesquisa que envolve transmissão do Vírus da Hepatite C, sabendo que esta pequena contribuição pode abrir caminhos para novas discussões sobre este assunto que acreditamos ainda não estar esgotado.

**CONCLUSÃO**

---

---

1. Na tentativa estabelecer uma técnica e manuseio adequados a detecção do VHC em sêmen, a dificuldade maior encontrada foi de driblar os inibidores presentes nas amostras de sêmen e o procedimento de diluições seriadas mostrou maior eficácia quando comparado com o processamento através do gradiente descontínuo de concentração. Contudo, a grande quantidade de não detectados mostrou que a carga viral pode ter sido “diluída”, gerando a necessidade da utilização de técnicas mais sensíveis.
2. Ao comparar as técnicas de PCR e detecção do vírus da Hepatite C não houve diferença entre os resultados da PCR convencional e PCR-Tempo-real.

**ANEXOS**

---

---

HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(Instruções para preenchimento no verso)

---

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente:.....

Documento de identidade:..... Sexo: ( M ) ( F )

Data de Nascimento: ..... / ..... / .....

Endereço:.....nº.....apto .....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:..... Telefone:(.....).....

2. Responsável Legal: .....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de identidade: .....Sexo: ( M ) ( F )

Data de Nascimento: ..... / ..... / .....

Endereço: .....nº..... apto.....

Bairro: .....Cidade:.....

CEP: ..... Telefone:(.....).....

---

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Determinação do RNA-VHC no sêmen de pacientes  
cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite C

2. PESQUISADORA: Dra. Norma de Paula Cavalheiro

PESQUISADORES EXECUTANTES: Norma de Paula Cavalheiro, Carlos Eduardo de Melo, Ana Carolina de O. Santos e Suzana Rie Morimitsu.

3. CARGO/FUNÇÃO: Biologista

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 5581 CRBM

UNIDADE DP HCFMUSP: LIM-47 – Laboratório de Hepatites

4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ( x )                      RISCO MINÍMO ( )                      RISCO MÉDIO ( )

RISCO BAIXO ( )                      RISCO MAIOR ( )

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

5. DURAÇÃO DA PESQUISA:    4 anos

---

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e objetivos da pesquisa:

Estamos estudando a transmissão do VHC, pois se trata de uma doença que acontece em todo o mundo e muitas dúvidas pairam sobre como este vírus é transmitido de uma pessoa para outra. Trata-se de uma doença grave e normalmente crônica que pode levar o paciente a quadros de cirrose e câncer de fígado. Esta pesquisa pretende avaliar a possível transmissão sexual em homens que apresentam diagnóstico para Hepatite C. Para isso vamos analisar o VHC no sêmen desses homens, para tentar saber quais os riscos do VHC ser transmitido pelo sêmen. Precisamos de sua ajuda para tentarmos investigar essa provável rota de transmissão da Hepatite C.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Se você tem Hepatite C, deverá fazer exames de sangue de rotina para acompanhamento clínico, para esta pesquisa precisaremos de um pouco de sangue (10mL). Precisaremos também de uma amostra de sêmen, que você deverá colher por masturbação. O sêmen deverá ser colhido em frasco estéril, que será fornecido para você.

3. Desconfortos e riscos esperados:

Para a coleta de sangue serão os mesmos de qualquer coleta, como dor no local ou inchaço. Para a coleta de sêmen o desconforto será o da masturbação.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

Você estará ajudando a melhor entender as rotas de transmissão do VHC e principalmente na investigação da provável transmissão sexual. Desta forma também ajudando a melhor entender a doença causada pelo VHC.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

Colaborando com este estudo você não terá nenhuma vantagem a mais. Pois será atendido normalmente no Ambulatório de Hepatites ou em qualquer outro setor do Hospital das Clínicas.

---

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas;
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência;
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade;
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa;
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dr. Antônio Alci Barone

---

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

---

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,                      de                      de 2008

---

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

---

assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

**Determinação do RNA-VHC no sêmen de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da  
Hepatite C**

PACIENTE: \_\_\_\_\_

Soroteca: \_\_\_\_\_ N<sup>o</sup> amostra: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F Idade: \_\_\_\_\_

Forma de aquisição da doença: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo descobriu a doença: \_\_\_\_\_

Grupo de risco? \_\_\_\_\_

Já fez tratamento? \_\_\_\_\_ Medicamentos? \_\_\_\_\_

Está em tratamento? \_\_\_\_\_

Genótipo: \_\_\_\_\_

---

OBSERVAÇÕES

## REFERÊNCIAS

---

---

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated Hepatitis not due to Viral Hepatitis Type A or B. *Engl J Med.* 1975; 292:767-70.
2. Iwarson S, Lindberg J, Lundin P. Progression of hepatitis non-A, non-B to chronic active hepatitis: a histological follow-up of two cases. *J Clin Pathol.* 1979; 32:351-5.
3. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, Tegtmeier GE, Bonino F, Colombo M, Lee WS, Kuo C, Berger K, Shuster JR, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989; 224:362-64.
4. Strauss E. Historia natural, fatores de progressão, avaliação prognostica da HCV crônica. In: FOCACCIA R. *Tratado das Hepatites Virais.* 2a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007. cap.4.6, p.231-45.
5. Morton LA, Kelen GD. Hepatitis C. *Ann Emerg Med.* 1998; 31(3):381-90.
6. Choo QL, Pinho JRR. Virologia molecular e variabilidade viral. In: FOCACCIA R. *Tratado das Hepatites Virais.* 2a ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2007. cap.4.1, p.195-204.
7. Smith DB, Mello J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol.* 1995; 76:1749-61.
8. Umlaft F, Wong DT, Oefner PJ, Underhill PA, Cheung RC, Wright TL, Kolykhalov AA, Gruenewald K, Greenberg HB. Hepatitis C virus detection by single-round PCR specific for the terminal 3' noncoding region. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2552-8.
9. Silva LC, Silva Jr. LC, Mendes LCA. Aspectos peculiares e historia natural da Hepatite C. In: Silva LC. *Hepatites agudas e crônicas.* São Paulo: Editora Sarvier; 1995. cap.14, p.155-62.
10. Santolini E, Migliaccio G, La Mônica N. Biosynthesis and biochemical properties of the Hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1994; 68:3631-41.
11. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol.* 1992; 73:673-9.
12. Fang JWS, Chow V, Lau JYN. Virology of the hepatitis C virus. *Clin Liver Dis.* 1997; 1(3):493-514.
13. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* 1998; 282:938-41.
14. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by PCR E2 protein. *Science.* 1999; 285:107-10.

15. Simmonds P. Variability of Hepatitis C virus. *Hepatology*. 1995; 21:570-83.
16. Smith DB, Strasser SI, Desmond PV. Current perspectives in hepatitis C. *Aust N Z J Med*. 1995; 25:350-7.
17. Silva LC, Pinho JRR. Hepatite C. In: Gayotto LCC, Alves VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. Sao Paulo: Editora Atheneu; 2001. cap.40, v.1, p.469-87.
18. Maertens G, Stuyver L. HCV genotyping by line probe assay INNO-LIPA HCV II. In: Lau JYN. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa: Humana Press, 1998. cap.16, p.183-98.
19. Dixit V, Quan S, Martin P, Larson D, Brezina M, Dinello R, Sra K, Lau JYN, Chien D, Kolberg J, Tagger A, Davis G, Polito A, Gitnick G. Evaluation of a novel serotyping system for Hepatitis C virus: strong correlation with standard genotyping methodologies. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:2978-83.
20. Cavaleiro NP, Barone AA, Tengan FM. HCV Serotypes in Brazilian patients. *Int J Infect Dis*. 2002; 6:228-32
21. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244:359-62.
22. Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, et al. Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT-PCR. *Virology*. 1993; 202:606-14.
23. Lau JYN, Davis GL. Detection of hepatitis C virus RNA genome liver tissue by nonisotopic in situ hybridization. *J Med Virol*. 1994; 42:268-71.
24. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RCA, Anphlett E, Clarke B, Rowlands D, Lemon SM. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*. 1996; 222:31-42.
25. McGarvey MJ, Houghton M, Weiner AJ. Structure and molecular virology. In: Lau, JYN. *Hepatitis C protocols: methods in molecular medicine*. Totowa: Humana Press, 1998. cap.19, p.253-70.
26. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, Lawlor E, Power J, Yap PL, Simmonds P. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol*. 1997; 78:321-8.
27. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-selby A, Baar PJ, Weiner AJ, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Genetic organization and diversity of the Hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci*. 1991; 88:2451-55.
28. Cha TA, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chien D, Kuo G, Urdea MS. At least five relates, but distinct, hepatitis C virus genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:7144-8.
29. Okamoto H, Kurai K, Okada S, Yamamoto K, Lizuka H, Tanaka T, Fukuda S, Tsuda F, Mishiro S. Full-length sequence of a hepatitis C virus genome havin poor homology to report isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology*. 1992; 188:331-41.

30. Enomoto N, Takada A, Nakao T, Date T. There are two major types of hepatitis C virus in Japan. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 170:1021-5.
31. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS5 region. *J Gen Virol*. 1993; 7:2391-9.
32. Sherlock S, Dooley J. Hepatite pelo virus C. In: Gayotto LCC, Alves VAF. *Doenças do fígado e vias biliares*. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. cap.18, v.1, p.263-75.
33. Delisse AM, Descurieux M, Rutgers T, D'Hondt E, De Wilde M, Arima T, Barrera-Sala JM, Ercilla MG, Ruelle JL, Cabezon T. Sequence analysis of the putative structural genes of hepatitis C virus from Japanese and European origin. *J Hepatol*. 1991; 13(4):S20-S23.
34. Mizokami M, Gojobori T, Ohba KI, Ikeo K, Ge XM, Ohno T, Orito E, Lau YN. Hepatitis C virus type 7, 8 and 9 should be classified as type 6 subtypes. *J Hepatol*. 1996; 24:622-4.
35. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of Hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol*. 1994; 75:1053-61.
36. Strauss E. Hepatitis C. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34(1):69-82.
37. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000; 20(1):1-16.
38. Focaccia R, Conceição OJG, Sette-Junior H, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorengo R, Souza FV, Kiffer CRV, Santos EB, Gonzáles MP, Saez-Alquezar A, Riscal JR, Chamone D. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Brz J Infect Dis*. 1998;2:269-87.
39. Quer J, Esteban JI. Epidemiology. In: Zucherman AJ, Thomas HC. *Viral Hepatitis*. England: Churchill Livingstones; 1998. cap.20, p.271-831.
40. Silva LC. Hepatite C. In: Silva LC. *O fígado sofre calado*. São Paulo: Ed. Atheneu; 2002. cap.11, p.59-64.
41. Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yamn DH, McAllister HÁ Jr, Reitz BA, Nelson KE. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 1992; 327(6):369-73.
42. Chiamonte M, Stroffolini T, Lorenzoni U, Minniti F, Conti S, Floreani A, Ntakirutimana E, Vian A, Ngatchu T, Naccarato R. Risk factors in community-acquired chronic hepatitis C virus infection: a case-control study in Italy. *J Hepatol*. 1996; 24:129-34.
43. Mansell CJ, Locamini SA. Epidemiology of Hepatitis C in the East. *Semin Liver Dis*. 1995; 15:15-32.
44. Alter MJ. Epidemiology of Hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis*. 1995; 15:5-14.

45. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat.* 2002; 9:84-100.
46. Roy E, Haley N, Leclerc P, Boivin JF, Cedras L, Vincelette J. Risk factors for hepatitis C virus in infection among street youths. *CMAJ.* 2001; 165:557-60.
47. Strauss E, Guz B, Fernandes HS, Almeida AL, Chamone DAF. Epidemiology of Hepatitis C in São Paulo – Brazil. In: *IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease.* Chicago. 1996. p.188.
48. Mauser-Bunchoten EP, Bresters D, Van Driemelen AA, Roosendaal G, Cuypers HT, Reesink HW, Van Der Poel CL, Van Der Berg HM, Lelle PN. Hepatitis C infection and viremia in Dutch hemophilia patients. *J Med Virol.* 1995; 45:241-46.
49. Gross JB. Hepatitis C: a sexually transmitted disease? *Am J Gastroenterol* 2001;96:3051-3.
50. Filippini P, Coppola N, Scolastico C, Rossi G, Onofrio M, Sagnelli E, Piccinino F. Does HIV infection favor the sexual transmission of hepatitis C? *Sex Transm Dis.* 2001; 28:725-9.
51. Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ, Kramer E, Miller JK, Mandel E, Hadler SC, Margolis HS. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *JAMA.* 1989; 262:1201-15.
52. Tanaka K, Stuver SO, Ikematsu H, Okayama A, Tachibana N, Hirohata T, Kashiwagi S, Tsubouchi H, Mueller NE. Heterosexual transmission of hepatitis C virus among married couples in southwestern Japan. *Int J Cancer.* 1997; 72:50-5.
53. Bonacini M, Puoti M. Hepatitis C in patients with human immunodeficiency virus infection: diagnosis, natural history, meta-analysis of sexual and vertical transmission, and therapeutic issues. *Arch Intern Med.* 2000; 160:3365-73.
54. Flamm SL. Chronic hepatitis C virus infection. *JAMA.* 2003; 289:2413-7.
55. Brook MG. Sexually acquired hepatitis. *Sex Transm Infect.* 2002; 78:235-40.
56. Bodsworth NJ, Cunningham P, Kaldor J, Donovan B. Hepatitis C virus infection in a large cohort of homosexually active men: independent associations with HIV-1 infection and injecting drug use but not sexual behaviour. *Genitourin Med.* 1996; 72:118-22.
57. Rooney G, Gilson RJ. Sexual transmission of hepatitis C virus infection. *Sex Transm Infect.* 1998; 74:399-404.
58. Capelli C, Prati D, Bosoni P, Zanuso F, Pappalettera M, Mozzi F, De Mattei C, Zanella A, Sirchia G. Sexual transmission of hepatitis C virus to a repeat blood donor. *Transfusion.* 1997; 37:436-40.
59. Soto B, Rodrigo L, Garcia-Bengoechea M, Sanchez-Quijano A, Riestra S, Arenas JI, et al. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the index case. A multicentre study of 423 pairings. *J Intern Med.* 1994; 235:515-9.

60. Cavalheiro NP. Hepatite C: transmissão entre casais (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
61. Rosenberg W. Sex and drugs and HCV? *GUT*. 1999; 45:7-8.
62. Hershov RC, Kalish LA, Sha B, Till M, Cohen M. Hepatitis C virus infection in Chicago women with or at risk for HIV infection: evidence for sexual transmission. *Sex Transm Dis*. 1998; 25:527-32.
63. Mesquita PE, Granato CF, Castelo A. Risk factors associated with hepatitis C virus (HCV) infection among prostitutes and their clients in the city of Santos, São Paulo State, Brazil. *J Med Virol*. 1999; 51:338-43.
64. Tengan FM, Eluf-Neto J, Cavalheiro NP, Barone AA. *Sexual transmission of hepatitis C virus*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001; 43:133-7.
65. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36(5 supply 1):S99-105.
66. Hsu HH, Wright TL, et al. Failure to detect hepatitis C virus genome in human secretions with the polymerase chain reaction. *Hepatology*. 1991; 14:763-7.
67. Young KC, Chang TT, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and in saliva. *J Med Virol*. 1993; 41:55-60.
68. Liou TC, Chang TT, et al. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol*. 1992; 37:197-202.
69. Fabris P, Infantolino D, Biasin MR, Marchelle G, Venza E, Terribile Wiel Marin V, Benedetti P, Tositti G, Manfrin V; de Lalla F. High prevalence of HCV-RNA in the saliva cell fraction of patients with chronic hepatitis C but no evidence of HCV transmission among sexual partners. *Infection*. 1999; 27:86-91.
70. Silvermann AL, Puccio JE, Kuleska GW, McCray DG, Gordon SC. HCV RNA is present in the menstrual blood of women with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol*. 1994; 89:1201-2.
71. Cassuto NG, Sifer C, Feldman G, Bouret D, Moret F, Benifla JL, et al. A modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. *Hum Reprod*. 2002; 17:3153-6.
72. Pekler VA, Robbins WA, Nyamathi A, Yashina TL, Leak B, Robins TA. Use of Versant TMA and bDNA 3.0 Assay to detect and quantify Hepatitis C virus in semen. *J Clin Lab Analysis*. 2003; 17:264-70.
73. Maia GD. Aparelho Genital Masculino. In: Maia GD. *Embriologia Humana*. São Paulo: Editora Atheneu; 2000. Ed.1, cap.2, p.27-38.
74. Bourlet T, Levy R, Laporte S, Blachier S, Bocket L, Cassuto G, Chollet L, Leruez-Ville M, Maertens A, Mousnier F, Pasquier C, Payan C, Pellegrin B, Schvoerer E, Zavadzki P,

- Chouteau J, Duverlie G, Izopet J, Lunel-Fabiani F, Pawlotsky JM, Profizi N, Rouzioux C, Stoll-Keller F, Thibault V, Wattré P, Pozzetto B. Multicenter quality control for the detection of hepatitis C virus RNA in seminal plasma specimens. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(2):789-93.
75. Canto CLM, Segurado AC, Pannuti C, Cedenho A, Srougi M, Spaine D, Fernandes S, Carretiero N, Bernal MC, Levi JE. Detection of HIV and HCV RNA in semen from Brazilian coinfected men using multiplex PCR before and after semen washing. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006; 48(4):201-6.
76. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):223-35.
77. Cavalheiro NP. Sexual transmission of Hepatitis C. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007;49(5):271-7.
78. Everhart JA, DiBisceglie AM, Murray LM. Risk for non-A, non-B (type C) hepatitis through sexual or household contact with chronic carriers. *Ann Intern Med*. 1990;115:1537-44.
79. Healey CJ, Smith DN, Wlaker JL. Acute hepatitis C infection after sexual exposure. *GUT*. 1995; 36:148-50.
80. Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for Hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5):S99-105.

# 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](#)