



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS (PCM)
MESTRADO FORA DE SEDE - UFBA



ANDRÉ MAURÍCIO COSTA RAMOS

**Avaliação da Prevalência dos Subtipos do Vírus da
Hepatite C em Pacientes Portadores do Vírus da
Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida.**

Salvador - Bahia
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉ MAURICIO COSTA RAMOS

AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DOS SUBTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE C EM
PACIENTES PORTADORES DO VÍRUS DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA ADQUIRIDA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro em acordo com o Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia no Mestrado Fora de Sede Mestrado fora de sede.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Brites

Salvador-Bahia
2008

ANDRÉ MAURÍCIO COSTA RAMOS

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DOS SUBTIPOS DO VÍRUS DA HEPATITE C EM
PACIENTES PORTADORES DO VÍRUS DA SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA ADQUIRIDA.**

Salvador, 09 de julho de 2008

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves / Universidade Federal da Bahia

Avaliador: Prof. Dr. Edgar Marcelino de CarvalhoFilho / Universidade Federal da Bahia

Avaliadora: Profa. Dra. Songelí Menezes Freire / Universidade Federal da Bahia

Avaliadora: Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Revisora: Prof. Dra. Flávia Alcântara Gomes / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico esta dissertação a minha esposa Karina pela compreensão, paciência e amor e ao meu filho Lucas pelo incentivo desde o ventre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meus caminhos;

Aos meus pais Sylvio e Carminha Ramos pelo eterno aprendizado, amor, carinho e crença no meu potencial;

Ao Prof. Dr. Carlos Brites pela orientação recebida e pelas importantes críticas e sugestões que serviram como grande contribuição na elaboração deste trabalho;

Ao Dr. Eduardo Netto pelo incentivo e apoio estatístico no trabalho;

Ao Dr. Roberto Badaró pela oportunidade desde o início da minha jornada acadêmica;

Ao Prof. Dr. Radovan Borojevic por acreditar neste trabalho desde a entrevista;

Ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto pela paciência e compreensão durante todo o curso;

A Profa. Dra. Fabiana Paim pelo apoio e pelas dicas;

Ao Biólogo Alex Torres pela força diária e fundamental colaboração na citometria de fluxo;

A Bioquímica Márcia Moreira pela parceria e apoio prático;

A Drs. Márcio Oliveira e Isabela Nóbrega pelo apoio e comprometimento na busca dos pacientes;

A Lílian Amaral Inocêncio e Denise Souza da Unidade de Laboratório (ULAB) - Programa Nacional DST e AIDS – Ministério da Saúde pela parceria e apoio incondicional;

A Michele Portela pelo auxílio na implantação e padronização da técnica de genotipagem para o VHC;

Aos colegas do Laboratório de Infectologia: Célia Pedroso, Marcos Abraão, Maurina Alcântara, Sheila Silva, Nadja Pacheco, Rodrigo Abreu, Rosangela Lima, Rosangela Castro e Soninha que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho;

Aos técnicos Natanael Dantas e Márcia Paz pelo auxílio na coleta dos pacientes e processamento das amostras;

E principalmente, aos pacientes pela paciência e doação.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”.*

Louis Pasteur

RESUMO

Os subtipos do VHC podem impactar na progressão da doença e responder diferentemente para tratamentos específicos. O HIV modifica a história natural da infecção pelo VHC, aumentando sua carga viral, acelerando o curso da progressão da hepatite crônica para cirrose e o aparecimento do carcinoma hepatocelular comparado com pacientes mono-infectados pelo VHC. O presente estudo visa determinar a prevalência dos subtipos da hepatite C em pacientes com HIV no período de 2005 a 2007, em Salvador, Bahia. Um total de 75 indivíduos apresentaram sorologia positiva para ambas as patogenias. Entretanto, 2/3 (58,7%) foram do sexo masculino com média de idade de 44 anos. O RNA do VHC foi detectado em 54 amostras. Porém, o seqüenciamento foi confirmado em 46 destas, evidenciando o tipo 1 como o mais prevalente (60,9%), seguido do tipo 3 (34,8%). Os subtipos do VHC foram determinados em 45 pacientes sendo o 1b (15 pacientes– 33,3%) o mais prevalente, seguido pelo 1a (13 – 28,9%), 3a (12 – 26,7%), 3d (3 – 6,7%) e 2a, 4a (1 – 2,2 cada). A carga viral para HIV e a contagem das células CD4 e CD8 não mostraram diferença no grupo RNA positivo em relação ao grupo negativo. Na Bahia, o subtipo do vírus da hepatite C mais prevalente entre os pacientes infectados pelo HIV foi o subtipo 1b. Foi observada uma tendência para maior prevalência do subtipo 1a do VHC entre os usuários de drogas ilícitas injetáveis.

Palavras- chave: VHC. HIV. Genótipos. Epidemiologia.

ABSTRACT

The subtypes of HCV might impact on the progression of the disease and respond differently to specific treatments. HIV changes the natural history of HCV infection, increasing their viral load, accelerating the course of progression of chronic hepatitis and cirrhosis for appearance of hepatocellular carcinoma compared with patients mono-infected with HCV. This study aims to determine the prevalence of subtypes of hepatitis C in patients with HIV in the period from 2005 to 2007, in Salvador, Bahia. A total of 75 individuals had positive serology for both pathogens. Meanwhile, 2/3 (58.7%) were male with an average age of 44 years. The RNA of HCV was detected in 54 samples. However, the sequencing was confirmed in 46 of these, showing the type 1 as the most prevalent (60.9%), followed by type 3 (34.8%). The subtypes of HCV were determined in 45 patients where 1b (15 patients-33.3%) the most prevalent, followed by the 1st (13 - 28.9%), 3rd (12 - 26.7%), 3d (3 - 6.7%) and the 2nd, 4th (1 - 2.2 each). The viral load for HIV and CD4 count and CD8 showed no difference in the group RNA positive in the group negative. In Bahia, the subtype of the hepatitis C virus most prevalent among patients infected with HIV was the subtype 1b. There was a trend towards higher prevalence of subtype 1st of HCV among users of injectable drugs.

Key words: HCV. HIV. Genotypes. Epidemiology.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Representação tridimensional da estrutura do VHC com as respectivas proteínas (membrana externa e core) e ácido ribonucléico (RNA)..... 06
- Figura 2 Representação esquemática da estrutura genômica do VHC apresentando as regiões não codificadas (5'NC e 3'NC), as regiões estruturais (Core, envelope - E1 e E2) e as não estruturais (NS2, NS3, NS4, NS5a e NS5b) com as respectivas proteínas codificadas..... 07
- Figura 3 Modelo esquemático do ciclo de replicação do VHC evidenciando as fases de: penetração do vírus na célula hospedeira, o processo de translação no retículo endoplasmático e o surgimento de novas cópias virais..... 08
- Figura 4 Representação esquemática do HIV evidenciando as proteínas do envelope (Gp41 e Gp 120), Core (p17 e p24), polimerase (transcriptase reversa, p66 e p51) e o material genético (ácido ribonucléico – RNA)..... 11
- Figura 5 Representação esquemática da estrutura genômica do HIV evidenciando as terminações de repetições longas (LTR - 5' e 3') genes do gag (p55 – p17, p24 e p15), genes da polimerase (p11, p66/55 e p32), genes do envelope (Gp 160 – Gp120 e Gp41) e os genes acessórios (vif – p23, vpr – p16, vpr – p12, tat – p14, rev e nef – p27)..... 12
- Figura 6 Modelo esquemático do ciclo de replicação do HIV evidenciando as fases de: penetração do vírus na célula hospedeira, transcrição reversa, integração, protease e o surgimento de um novo vírus..... 14
- Figura 7 Perfil eletroforético do produto de amplificação da região 5'NC gene do vírus C da Hepatite (VHC) nas amostras de sangue periférico em pacientes com HIV co-infectados com o VHC, na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de março de 2005 a outubro de 2007. Identificação do gel da esquerda para direita: marcador do peso molecular de 50 pares de base (pb) (Applied Biosystems); amostras (4676, 4805, 5857, 6613 e 6967) com os respectivos resultados [(+) positivo e (-) negativo]; em seguida o controle positivo (CP) e o controle negativo (CN)..... 31

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	Descrição da seqüência dos iniciadores da região 5'NC do vírus C da hepatite (VHC) utilizado na reação de retrotranscrição (RT-PCR) e amplificação (PCR).....	26
Quadro 2	Programação da temperatura e tempo utilizada na retrotranscrição (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região 5'NC do vírus C da hepatite (VHC).....	27
Quadro 3	Programação da temperatura e tempo utilizada na reação CLIP para seqüenciamento da região 5'NC do vírus C da hepatite (VHC).....	29

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Freqüência de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	32
Tabela 2	Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico, Salvador, Bahia, Brasil – março de 2005 a outubro de 2007...	33
Tabela 3	Análise das médias, medianas e desvios padrões da contagem de células CD4 de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	34
Tabela 4	Análise das médias, medianas e desvio padrão de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a quantificação da carga viral plasmática para o HIV e a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	35
Tabela 5	Análise das médias, medianas e desvio padrão de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a quantificação da carga viral plasmática para o HIV e a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	36
Tabela 6	Freqüência de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o tipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	36
Tabela 7	Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o tipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	38
Tabela 8	Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o tipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	39

Tabela 9	Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o subtipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.....	41
----------	---	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	- Microlitro
3'NC	- Região Não Codificadora 3'
5'NC	- Região Não Codificadora 5'
A	- Adenina
AIDS/SIDA	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês "Acquired Immunodeficiency Syndrome"
ARV	- Vírus Associado a AIDS, do inglês "AIDS-associated Retrovirus"
C	- Citosina
C1 a C5	- Regiões Constantes de 1 a 5 do HIV
CCR5	- Co-receptor para Quimiocinas 5, do inglês "chemokine (C-C motif) receptor 5"
CD4	- Grupamento de diferenciação 4, do inglês "Cluster of Differentiation"
CD8	- Grupamento de diferenciação 8, do inglês "Cluster of Differentiation"
CD81	- Grupamento de diferenciação 81, do inglês "Cluster of Differentiation"
cDNA	- Fita de DNA complementar
Com-HUPES	- Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos
CXCR4	- Co-receptor para Quimiocinas
Cy5 e Cy5.5	- Iniciadores da Reação CLIP™
DMSO	- Sulfoxido Dimetil
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico, do inglês "Deoxyribonucleic Acid"
DNase	- Enzima que degrada DNA
E1/E2	- Proteínas do Envelope do VHC
EIA	- Ensaio Imunoenzimático
ELISA	- Ensaio Imunoenzimático, do inglês "enzyme linked immunosorbent assay"
ENV	- Glicoproteínas do Envelope do HIV
G	- Guanina
GAG	- Proteína do Cerne Viral do HIV

GL C	- Galactosil Ceramídeo
GP120	- Glicoproteína com Peso Molecular 120 Kd
GP41	- Glicoproteína com Peso Molecular 41 Kd
HAART	- Terapia Anti-rtroviral de Potente, do inglês “Highly Active Anti-retroviral Therapy”
HCV	- Vírus da Hepatite C, do inglês, “Hepatitis C virus”
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Adquirida, do inglês “Human Immunodeficiency Virus”
HNANB	- Hepatite Não A / Não B
HPTs	- Hepatites Pós-Transfusionais
HTLV	- Vírus Linfotrópico de Células “T” Humanas, do inglês “Human T Lymphotropic Virus Type”
ICB	- Instituto de Ciências Biomédicas
ICS	- Instituto de Ciências da Saúde
K3 EDTA	- Ácido Etilenodiaminatetracético Tripotássio
Kd	- Kilo Dáltons
KY78	- Iniciador de Seqüência do VHC
KY80	- Iniciador de Seqüência do VHC
LAPI-VIR	- Laboratório de Pesquisa em Infectologia – Unidade de Virologia
LAV	- Vírus Associado a Linfadenopatia, do inglês “Lymphadenopathy-Associated Virus”
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade, do inglês “Low Density Lipoprotein”
LTR	- Terminações de Repetições Longas, do inglês “Long Terminal Repeats”
M	- Maior, do inglês, Major
mg	- Miligramas
MHC	- Complexo Principal da Histocompatibilidade, do inglês “Major Histocompatibility Complex”
mL	- Mililitro
mm ³	- milímetro cúbico
mol/L	- Molaridade por Litro
N	- Normal
NEF	- Gene Acessório do HIV

nm	- Nanômetro
NS	- Proteínas Não Estrututrais, do inglês “Non Structural”
O	- Grupo Externo, do inglês “Outlier”
ORF	- Zona de leitura aberta, do inglês “Open Reading Frame”
pb	- Pares de Base
PBS	- Tampão Salino de Fosfato, do inglês “Phosphate Buffered Saline”
PCM	- Programa de Pós Graduação em Ciências Morfológicas
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”
POL	- Enzimas de Replicação do HIV
RNA	- Ácido Ribonucléico, do inglês “Ribonucleic acid”
RNAse	- Enzima que degrada RNA
RPM	- Rotações por Minuto
RT-PCR	- Transcrição Reversa
T	- Timina
TAT	- Gene Regulatório do HIV
TBE	- Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	- Tetra Metil Benzidina
Tth	- thermus Termophilus
U	- Unidade
UDI	- Usuário de Drogas Intravenosas
UFBA	- Universidade Federal da Bahia
UFRJ	- Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	- Ultravioleta
V1 a V5	- Regiões Variáveis do HIV
VER	- Gene Regulatório do HIV
VHC	- Vírus da Hepatite C
VIP	- Gene Acessório do HIV
VPR	- Gene Acessório do HIV
VPU	- Gene Acessório do HIV

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1	O VÍRUS DA HEPATITE TIPO C (VHC).....	03
2.1.1	Histórico do VHC.....	03
2.1.2	Morfologia e Genoma do VHC.....	05
2.1.3	Ciclo de Replicação do VHC.....	07
2.1.4	Epidemiologia do VHC.....	09
2.2	O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ADQUIRIDA (HIV)..	09
2.2.1	Histórico do HIV.....	09
2.2.2	Morfologia e Genoma do HIV.....	10
2.2.3	Ciclo de Replicação do HIV.....	13
2.2.4	Epidemiologia do HIV.....	15
2.3	CO-INFECÇÃO VHC E HIV.....	16
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	OBJETIVO GERAL.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4	JUSTIFICATIVAS.....	19
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1	AMOSTRAGEM.....	20
5.2	EXAMES LABORATORIAIS.....	20
5.2.2	Ensaio Imunoenzimático (EIA) para o VHC.....	21
5.2.3	Ensaio Imunoenzimático (EIA) para o HIV.....	21
5.2.4	Exame confirmatório para HIV (“Western Blot”).....	22
5.2.5	Exame da Quantificação da Carga Viral para HIV.....	23

5.2.5.1	Liberação e Isolamento dos Ácidos Ribonucléicos (RNA).....	23
5.2.5.2	Amplificação Isotérmica dos Ácidos Ribonucléicos (RNA).....	24
5.2.5.3	Detecção Quimioluminescente dos Ácidos Ribonucléicos (RNA)....	24
5.2.6	Exame da Contagem de Células CD4 e CD8.....	25
5.2.7	Exame de Genotipagem do VHC.....	26
5.2.7.1	Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do VHC.....	26
5.2.7.2	Reação de Seqüenciamento do VHC.....	28
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
6	RESULTADOS.....	31
6.1	Detecção do RNA do VHC no Sangue Periférico.....	31
6.2	Análise dos Tipos do VHC no Sangue Periférico.....	36
6.3	Análise dos Sub-Tipos do VHC no Sangue Periférico.....	39
7	DISCUSSÃO.....	42
8	CONCLUSÕES.....	47
9	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICES.....	60

1 INTRODUÇÃO

As hepatites virais são doenças infecciosas causadas por diferentes agentes etiológicos que acometem o tecido hepático. O vírus da hepatite C causa cirrose hepática em 4% com uma prevalência de 1 a 2% de infectados nos países desenvolvidos (IKEDA *et al.*,1993; MORSICA *et al.*,2007; MUSSI *et al.*,2007). No Brasil, este índice atinge 1,2% da população, com taxa de incidência de 9,6 por 100.000 habitantes, atingindo cerca de 3 milhões de portadores em estágio crônico da doença. As células do tecido hepático ou hepatócitos são os principais alvos de infecção pelo vírus C que eventualmente podem ser encontrados em linfócitos causando manifestações clínicas extra-hepáticas como desordem auto-imune e doenças linfoproliferativas (MORSICA *et al.*,2007; MUSSI *et al.*,2007; ZIGNEGO *et al.*,1999).

O HIV apresenta RNA como forma de armazenamento das informações genéticas e trata-se de um vírus não oncogênico e citopático. As células CD4 são o principal alvo do HIV, porém, outras linhagens de células humanas podem ser infectadas tais como: linfócitos T supressores, linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans da pele, células da glia cerebral, células dos linfonodos, da medula óssea, do timo e células cromaffínicas do cólon, duodeno e reto (L H DOS S OLIVEIRA.,1994). No Brasil foram registrados 183.074 óbitos por AIDS de 1995 a 2005, sendo a Bahia o segundo estado do norte/nordeste nesta categoria. O ministério da saúde registrou no Brasil, 7.747 homens e 5.467 mulheres totalizando 13.214 novos casos de AIDS no ano de 2006 com predomínio etário entre 30 a 34 anos, somando 433.067 casos desde 1980 (MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2006).

A infecção pelo vírus HIV modifica a história natural do VHC levando a um aumento da carga viral plasmática e hepática do VHC, acelerando o curso da progressão de hepatite crônica para cirrose, aumentando o aparecimento do carcinoma hepatocelular numa faixa etária menor e dentro de um período mais curto de infecção em comparação com pacientes mono-infectados pelo VHC (BENHAMOU *et al.*,2001; BONACINI *et al.*,2000; GARCIA-SAMANIEGO *et al.*,2001; GRAHAM *et al.*,2001; MURILLAS *et al.*,2005; SORIANO *et al.*,1999a; SORIANO *et al.*,1999b; SOTO *et al.*,1997; SULKOWSKI *et al.*,2000; ZIGNEGO *et al.*,1999). O tratamento é dispendioso, demorado e apresenta respostas variáveis de acordo com o subtipo do VHC. Pacientes co-infectados pelo subtipo 1 apresentam respostas virológicas inferiores (<50%) comparados com o subtipo 3 (>80%). O conhecimento da prevalência dos subtipos do VHC e das vias de transmissão em nosso meio pode permitir o planejamento da melhor estratégia para tratamento desta patogenia. O presente estudo visa determinar a prevalência dos subtipos virais da hepatite C em pacientes co-infectados pelo HIV-1 e sua associação com as diversas vias de transmissão na cidade de Salvador, Bahia, durante o período de março de 2005 a outubro de 2007.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O VÍRUS DA HEPATITE TIPO C (VHC)

2.1.1 Histórico do VHC

As primeiras observações sobre os sintomas provocados pelas hepatites datam da Grécia antiga, porém somente em 1885 foi confirmado em soro humano (AACH *et al.*,1981). Esta identificação ocorreu nos anos seguintes entre receptores de sangue e de hemoderivados levando a admitir a etiologia viral das Hepatites Pós-Transfusionais (HPTs) (NEEFE *et al.*,1954).

Havens Jr em 1948, estudando voluntários que apresentaram icterícia após a ingestão de fluido duodenal e inoculação de sangue de indivíduos com hepatite aguda, classificou as hepatites como: a) infecciosa, que são transmitidas através de alimentos ou líquidos contaminados por fezes de convalescentes e b) sorohomólogas, transmitidas pelo sangue e hemoderivados, somente descrita em usuários de drogas ilícitas injetáveis (STEIGMANN *et al.*,1950) e entre receptores de unidades transfusionais de doadores sadios sem história clínica previa de hepatite (HAVENS *et al.*,1948; NEEFE *et al.*,1954).

A primeira tentativa de descrição do vírus das HTPs ocorreu em 1956, estudando um usuário de drogas ilícitas injetáveis acometido por episódios agudos distintos de hepatites. Exames não constataram o tipo da infecção, sendo classificada como hepatite não-A/não-B (HNANB) (HAVENS, JR.,1956).

O agente etiológico causador das HTPs foi primeiramente descrito por Choo e cols. em 1989, analisando plasma de chipanzés portadores do vírus da HNANB. A identificação deste agente somente foi possível através da técnica do DNA recombinante que permitiu a clonagem genômica do vírus e a sua denominação de vírus da hepatite C (CHOO *et al.*,1989).

O teste imunológico ELISA (do inglês “enzyme linked immunosorbent assay”) capaz de detectar anticorpos contra o VHC foi desenvolvido nos anos seguintes, sendo implantado em bancos de sangue e evitando acentuadamente a transmissão do vírus via transfusão sanguínea (DONAHUE *et al.*,1992).

Posteriormente, foram caracterizados diferentes genótipos do VHC a partir das análises filogenéticas das cepas virais isoladas em diversas regiões do mundo. As diferenças de 31 a 34% nas seqüências de nucleotídeos e aproximadamente 30% nas seqüências de aminoácidos determinam tipos ou grupos distintos que são classificados conforme denominação indo-arábico de 1 a 6. Dentro de um mesmo grupo a discordância de 20 a 23% entre as seqüências nucleotídicas determina a formação de subgrupos ou subtipos distintos identificados de forma alfanumérica como por exemplo: 1a, 1b, 2a, 3a, etc (ROBERTSON *et al.*,1998; SIMMONDS.,1998).

As células do tecido hepático ou hepatócitos são os principais alvos de infecção pelo vírus C que eventualmente podem ser encontrados em linfócitos causando manifestações clínicas extra-hepáticas como desordem auto-imune e doenças linfoproliferativas (ROBERTSON *et al.*,1998; SIMMONDS.,1998; ZIGNEGO *et al.*,1999).

Os hemoderivados constituem-se na principal via de transmissão do VHC, ocorrendo raros relatos de contaminação via sexual e materno-fetal (ALTER *et al.*,1992; OHTO *et al.*,1994). A infecção aguda na maioria dos casos é assintomática

podendo ocorrer sintomas como náuseas, mal-estar e icterícia. O estágio crônico da doença ocorre em 70% dos pacientes acometidos pelo vírus, sendo que 20% apresentam um quadro de cirrose hepática após 20 anos e 4% evoluem para carcinoma hepatocelular (IKEDA *et al.*,1993).

Atualmente, a hepatite do tipo C pode ser combatida com a combinação entre o interferon- α simples ou peguilado e a ribavirina sendo, um tratamento de custo elevado e havendo a necessidade de monitoramento laboratorial para evitar possíveis efeitos colaterais das drogas (Anon.,2005).

2.1.2 Morfologia e Genoma do VHC

O VHC está atualmente classificado na família Flaviviridae juntamente com o vírus da dengue e da febre amarela, porém no gênero Hepacivirus separado dos Flavivírus e Pestivirus devido a diferença entre as seqüências genômicas (CHOO *et al.*,1991; KUO *et al.*,1989; ROBERTSON *et al.*,1998; ROSS *et al.*,2000) (FIGURA 1)

O material genético do VHC é armazenado em ácido ribonucléico de fita simples (RNA), com polaridade positiva contendo cerca de 9.400 nucleotídeos dispostos em uma única região aberta de leitura (ORF – “open reading frame”) que compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína com mais de 3.000 aminoácidos genômicas (CHOO *et al.*,1991; KUO *et al.*,1989; ROBERTSON *et al.*,1998; ROSS *et al.*,2000).

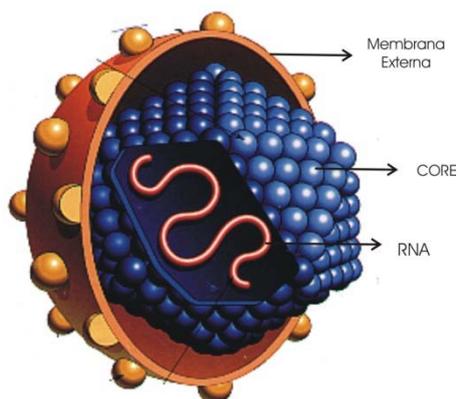


Figura 1: Representação tridimensional da estrutura do VHC com as respectivas proteínas (membrana externa e core) e ácido ribonucleico (RNA). Fonte: Adaptado do encarte de divulgação do kit TRUGENE 5'NC (Visible Genetics Toronto – Canadá - Bayer Health Care Diagnostics)

As regiões não codificadoras 5' (5'NC) e 3' (3'NC) estão dispostas nas extremidades do genoma viral. Os genes que codificam as proteínas estruturais do vírus são representados pela região do nucleocapsídeo ou "C" (do inglês "core") e pelas glicoproteínas que formam o envelope viral "E1" e "E2". Estas proteínas estão relacionadas à fusão do vírus à membrana da célula hospedeira. As regiões que formam o complexo de genes das proteínas não estruturais (NS) são: "NS2", "NS3", "NS4", "NS5A" e "NS5B" que irão atuar no ciclo replicativo viral (FIGURA 2) (CHOO *et al.*,1991; KUO *et al.*,1989; ROBERTSON *et al.*,1998; ROSS *et al.*,2000).

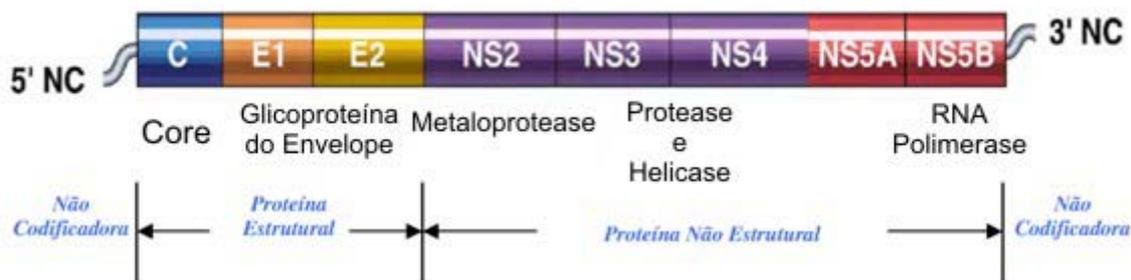


Figura 2: Representação esquemática da estrutura genômica do VHC apresentando as regiões não codificadas (5'NC e 3'NC), as regiões estruturais (Core, envelope - E1 e E2) e as não estruturais (NS2, NS3, NS4, NS5a e NS5b) com as respectivas proteínas codificadas. Fonte: Adaptado do encarte de divulgação do kit TRUGENE 5'NC (Visible Genetics Toronto – Canadá - Bayer Health Care Diagnostics)

O genoma do VHC após traduzido produz uma poliproteína precursora com cerca de 3.000 aminoácidos que são clivados pela ação de proteases virais e celulares produzindo pelo menos 10 proteínas estruturais e não estruturais.

2.1.3 Ciclo de Replicação do VHC

O acoplamento é o primeiro passo para infecção do VHC à célula alvo. Os membros da família flaviviridae se utilizam de uma ligação com os receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL – “Low Density Lipoprotein”) das células alvos para dar início ao processo de internalização (THOMSEN *et al.*, 1992). Porém, Pileri e cols. em 1998, identificaram a interação da proteína do envelope viral E2 com a molécula de superfície CD81 da célula hospedeira como mais uma forma de

acoplamento (PILERI *et al.*,1998). Ambos os processos necessitam ser mais bem investigados para avaliar o grau de infecção produtiva vírus-célula hospedeira (BARTENSCHLAGER *et al.*,2000) (figura 3).

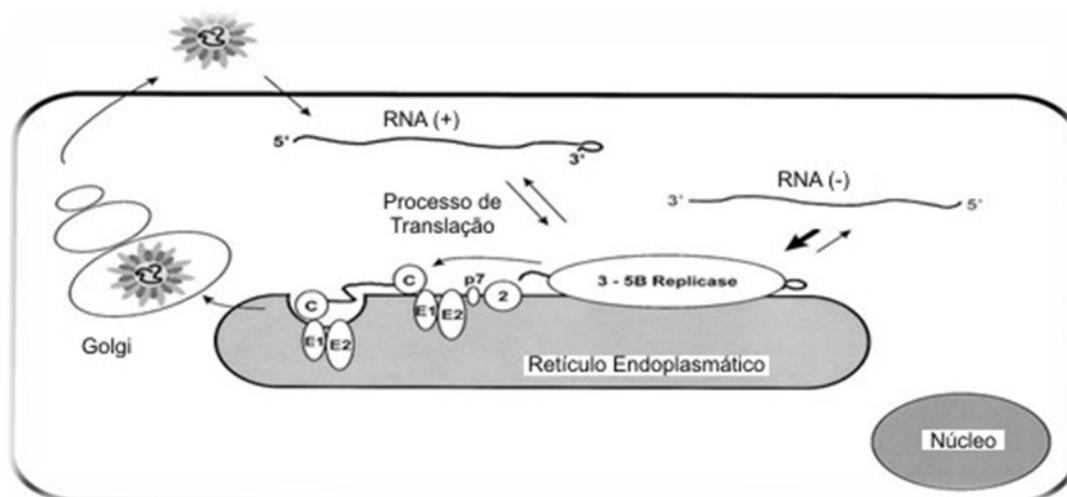


Figura 3: Modelo esquemático do ciclo de replicação do VHC evidenciando as fases de: penetração do vírus na célula hospedeira, o processo de translação no retículo endoplasmático e o surgimento de novas cópias virais. Fonte: Desconhecida.

Após a penetração do VHC na célula hospedeira o RNA viral é diretamente transcrito, devido a sua polaridade positiva, não havendo necessidade de retrotranscrição ou inserção ao ácido desoxirribonucléico (DNA) celular. A transcrição do RNA viral através do reticulo endoplasmático rugoso da célula hospedeira produz uma poliproteína que é clivada por uma proteína celular e duas virais (BARTENSCHLAGER.,1999; DE *et al.*,1998) formando as proteínas necessárias para compor uma nova unidade viral que será conduzida até a superfície da célula hospedeira, onde é eliminada, estando apta a infectar novas células (BARTENSCHLAGER *et al.*,2000).

2.1.4 Epidemiologia do VHC

O Ministério da Saúde não dispõe de dados oficiais sobre a infecção pelo vírus da hepatite tipo C, mas estima em cinco milhões os portadores acometidos por esta patologia no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2007) com uma prevalência de 1,3% estimada para a população da cidade de Salvador, Bahia (MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2007).

Na cidade de Santos, São Paulo, foi determinada uma prevalência de 36,2% de pacientes apresentando co-infecção pelos vírus VHC/HIV sendo significativamente elevado entre usuários de drogas intravenosas (UDI) (SEGURADO *et al.*,2004).

2.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ADQUIRIDA (HIV)

2.2.1 Histórico do HIV

A infecção pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS/SIDA) foi primeiramente descrita em 1981, a partir da identificação de indivíduos homossexuais masculinos com imunodeficiência celular, desenvolvendo pneumonia pelo *Pneumocystis jiroveci* e candidíase oral (GOTTLIEB *et al.*,1981).

O agente etiológico da AIDS somente foi descoberto em 1983, por uma equipe de pesquisadores do Instituto Pauster de Paris, estudando gânglios linfáticos de pacientes com imunodeficiência e linfadenopatia generalizada. Esse agente foi, então, denominado Vírus Associado à Linfadenopatia (LAV) (BARRE-SINOSSI *et al.*,1983).

Paralelamente, outro grupo de cientistas do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos isolou um vírus semelhante ao descrito pela equipe do Instituto Pasteur que, também, causava imunodeficiência celular e o denominou de Vírus Linfotrópico de Células T Humanas, tipo III (HTLV-III) (GALLO *et al.*,1983).

Este agente ainda recebeu o nome de Vírus Associado à AIDS (ARV) (LEVY *et al.*,1984), porém, em 1985, foi observado que os isolados virais com diversas denominações convergiam na determinação de quadros clínicos característicos de pacientes com AIDS, concluindo-se que se tratava do mesmo vírus (RATNER *et al.*,1985). Logo, o Comitê Internacional de Nomenclatura de Vírus adotou o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) como terminologia padrão a ser utilizada por todos os portadores acometidos por essa infecção.

Os primeiros casos de AIDS registrados no Brasil, datam de 1982, com os pacientes apresentando quadros clínicos semelhantes àqueles diagnosticados na Europa e Estados Unidos (USA). Contudo, o isolamento viral em nosso meio, somente ocorreu em 1987 (GALVAO-CASTRO *et al.*,1987).

2.2.2 Morfologia e Genoma do HIV

O HIV está classificado taxonomicamente na família Retroviridae, subfamília Lentivirinae. Trata-se de vírus não oncogênico, citopático que apresenta RNA como forma de armazenamento das informações genéticas.

A estrutura externa esférica é formada por uma membrana bilaminar glicolipoproteica com um diâmetro de aproximadamente 100 nm (Figura 4). O vírus apresenta um cerne cilíndrico denso, que corresponde ao nucleocapsídeo ("core")

viral. Envolto por essa região encontram-se proteínas estruturais codificadas pelo gene gag, constituído por duas fitas simples de RNA (Genoma Viral) e enzimas codificadas pelo vírus, dentre as quais, a transcriptase reversa e a integrase, responsáveis pela retrotranscrição e inserção do provírus, respectivamente (GELDERBLOM *et al.*,1987).

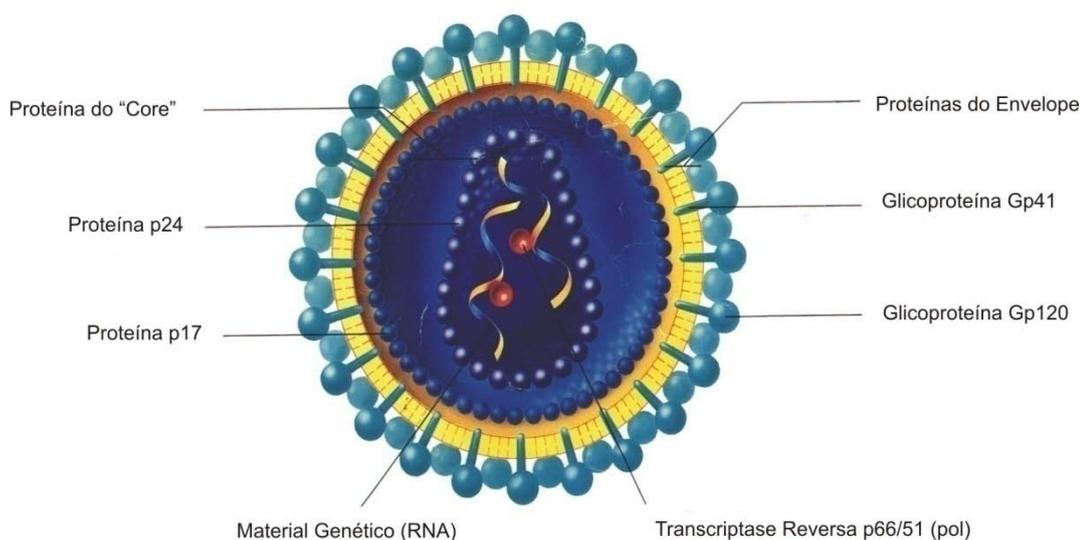


Figura 4: Representação esquemática do HIV evidenciando as proteínas do envelope (Gp41 e Gp 120), Core (p17 e p24), polimerase (transcriptase reversa, p66 e p51) e o material genético (ácido ribonucléico – RNA). Fonte: Adaptado do encarte do kit de “western Blot” Abbott Diagnostics.

O genoma viral possui uma extensão aproximada de 10Kd, entre duas regiões laterais longas de repetição denominadas LTR ("Long Terminal Repeat"), contendo elementos responsáveis pelo controle para integração, transcrição e poliadenilação dos RNAs mensageiros, assim como, genes codificadores de proteínas do cerne viral (gag), enzimas de replicação (pol) e glicoproteínas do envelope (env) (Figura 5).

O gene gag é responsável pela codificação das proteínas constitutivas do "core", que são clivadas a partir de uma proteína precursora de 55Kd, produzindo as proteínas P24, P16 e P14. O gene pol tem como função produzir a transcriptase reversa e a integrase, originadas a partir de uma proteína precursora de 160Kd. O gene env traduz uma proteína de 160Kd que após clivagem e glicosilação, resulta na proteína GP120, que constitui a fração mais externa do vírus e a GP41 inserida através da membrana do vírus (GEYER *et al.*,1988).

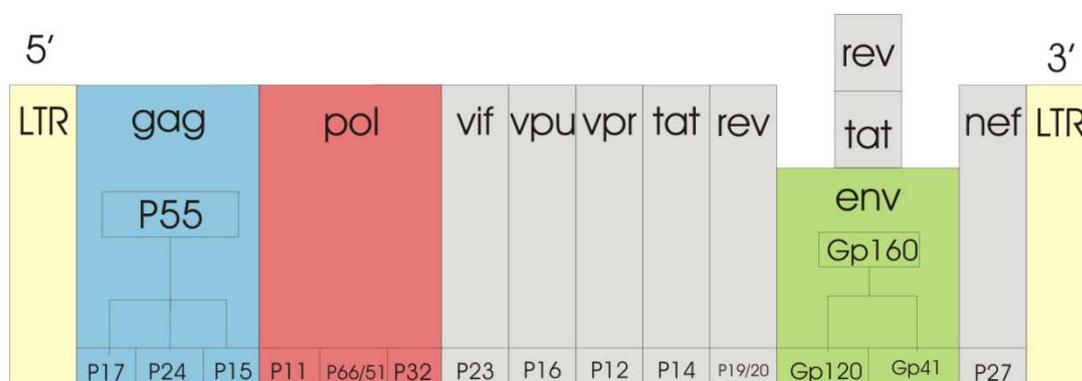


Figura 5: Representação esquemática da estrutura genômica do HIV evidenciando as terminações de repetições longas (LTR - 5' e 3') genes do gag (p55 – p17, p24 e p15), genes da polimerase (p11, p66/55 e p32), genes do envelope (Gp 160 – Gp120 e Gp41) e os genes acessórios (vif – p23, vpu – p16, vpr – p12, tat – p14, rev e nef – p27). Fonte: Elaboração própria.

O HIV-1 ainda possui seis genes adicionais que são divididos em dois grupos: acessórios (vif, nef, vpr, e vpu) e regulatórios (tat e rev). Os genes nef, tat e rev são essenciais nos processos regulatórios da replicação viral.

O gene nef é responsável pela tradução de uma proteína de 27Kd, presumidamente atuando no processo de transcrição viral com a função de regulação negativa. O gene tat codifica uma proteína pequena de, apenas, 14Kd, que atua na

região tar do RNA mensageiro, localizado nas LTRs, de forma a transativar a tradução de proteínas virais. O gene regulador da expressão das proteínas virais (*rev*) é traduzido em uma proteína de 18Kd e tem a função de transporte seletivo de RNA mensageiro do citoplasma.

O genoma viral é dividido em 5 regiões variáveis (V1 a V5) e 5 regiões constantes (C1 a C5), situados no gene *env*. A variação nos genes *env* e *gag*, do HIV-1, determinou a identificação de oito subtipos genéticos pertencente ao grupo principal (M – do inglês “Major”) (GURTLER *et al.*,1994; LAROSA *et al.*,1990; MYERS *et al.*,1994)(Gurtler *et al.*, 1994; LaRosa *et al.*, 1990; Myers *et al.*, 1994) e outros que foram denominados de "O" (do inglês “Outlier”) pois, não puderam ser classificados em nenhum dos constituintes do grupo "M" (GURTLER *et al.*,1994; JANSSENS *et al.*,1994; VANDEN *et al.*,1994).

No Brasil, o subtipo B é o mais predominante, semelhante ao padrão apresentado na Europa e América do Norte; contudo, outros subtipos virais (F, C e D) já foram detectados em nosso meio, demonstrando uma grande variabilidade genética (COUTO-FERNANDEZ *et al.*,1994).

2.2.3 Ciclo de Replicação do HIV

O ciclo replicativo do HIV tem início com a ligação da Gp 120 (proteína mais externa do vírus) nas células com receptores de superfície específicos (moléculas CD4 da superfície T4) (DALGLEISH *et al.*,1984; KLATZMANN *et al.*,1984) (Figura 6). A molécula CD4 é uma glicoproteína de 55 a 58 kd, presente na superfície da célula hospedeira. Ela é detectada em grande quantidade nos linfócitos auxiliares/indutores e participam no reconhecimento de antígenos associados a moléculas classe 2 do

complexo principal de histocompatibilidade (MHC) nas células apresentadoras de antígenos CD4 e co-receptores do tipo CXCR4 (linfócitos T) e CCR5 (macrófagos e monócitos) (WU *et al.*,1996).

A fusão entre as membranas viral e celular é mediada através da Gp 41 (LIFSON *et al.*,1986). O vírus, então, insere o seu material genético (RNA), no citoplasma da célula hospedeira juntamente com as enzimas transcriptase reversa e ribonuclease H, que transformará as fitas simples em duplas fitas de DNA, e as integrará ao genoma da célula hospedeira através da enzima integrase. Após a integração, o material genético é denominado provírus. Após esse processo, o vírus utilizará as vias sintéticas da célula hospedeira para traduzir e sintetizar suas próprias proteínas. Todo o processo de replicação viral ocorre em um período de seis horas.

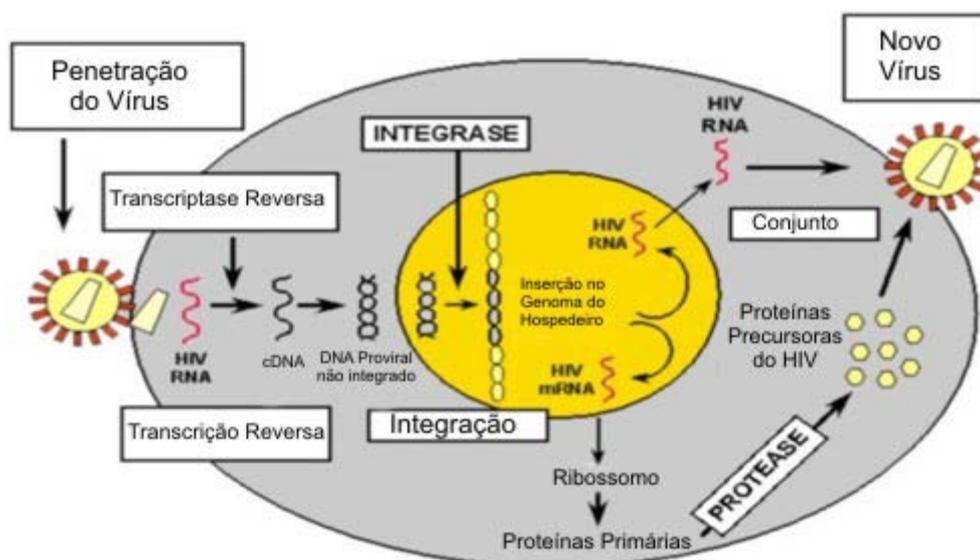


Figura 6: Modelo esquemático do ciclo de replicação do HIV evidenciando as fases de: penetração do vírus na célula hospedeira, transcrição reversa, integração, protease e o surgimento de um novo vírus. Fonte: Desconhecida.

O HIV pode, ainda, infectar outras linhagens de células humanas tais como, linfócitos T supressores, linfócitos B, macrófagos, monócitos, células de Langerhans da pele, células da glia cerebral, células dos linfonodos, da medula óssea, do timo e células cromafínicas do cólon, duodeno e reto (L H DOS S OLIVEIRA.,1994). O galactosil ceramídeo (GI C) (HAROUSE *et al.*,1991) e os receptores do complemento e da fração Fc das imunoglobulinas se constituem em receptores alternativos para a infecção pelo vírus (TAKEDA *et al.*,1988).

O sincício, como é chamado o produto de fusão, não é funcional, causando grande destruição dos linfócitos CD4. Por ação indireta, o vírus promove a formação de sincícios pela ligação de células infectadas que expressam a Gp120 em sua membrana, com células não infectadas, que expressam moléculas CD4 (L H DOS S OLIVEIRA.,1994).

2.2.4 Epidemiologia do HIV

O ministério da saúde registrou no Brasil, 7.747 homens e 5.467 mulheres totalizando 13.214 novos casos de AIDS no ano de 2006 com predomínio etário entre 30 a 34 anos, somando 433.067 casos desde 1980 (MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2006).

Os dados epidemiológicos da AIDS apontam a região Sudeste com a maior incidência e prevalência de casos no Brasil. A Bahia ocupa a sétima colocação em número de casos de AIDS no Brasil, despontando como maior pólo de concentração do norte/nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2006).

Foram registrados no Brasil 183.074 óbitos por AIDS de 1995 a 2005, sendo a Bahia o segundo estado do norte/nordeste nesta categoria. Entretanto, no ano de 2005 a Bahia registrou um decréscimo na taxa de incidência por 100.000 habitantes,

em relação ao ano anterior, sendo o vigésimo primeiro do Brasil e estando abaixo da média nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE.,2006).

2.3 CO-INFECÇÃO VHC E HIV

O HIV modifica a história natural da infecção pelo VHC levando a um aumento da carga viral plasmática e hepática do VHC, acelerando o curso da progressão de hepatite crônica para cirrose, aumentando o aparecimento do carcinoma hepatocelular numa faixa etária menor e dentro de um período mais curto de infecção em comparação com pacientes mono-infectados pelo VHC. (BENHAMOU *et al.*,2001; BONACINI *et al.*,2000; GARCIA-SAMANIEGO *et al.*,2001; GRAHAM *et al.*,2001; MURILLAS *et al.*,2005; SORIANO *et al.*,1999a; SORIANO *et al.*,1999b; SOTO *et al.*,1997; SULKOWSKI *et al.*,2000).

A terapia anti-retroviral de alta potência (“Highly Active Anti-retroviral Therapy” – HAART) adotada para o tratamento de pacientes com HIV contribuiu para o aumento e melhora da sobrevida nesta população, estabelecendo condições favoráveis para a progressão lenta do VHC e conseqüente insuficiência hepática. Este fato não era observado antes do advento da terapia HAART, sendo o paciente levado a óbito por doenças oportunistas antes mesmo do comprometimento hepático. Porém, este fato isoladamente não se constitui na única justificativa para o aumento da mortalidade causada pelo HCV. A análise de múltiplos fatores como a interação vírus-hospedeiro e vírus-vírus, imunossupressão do paciente e dano hepático induzido por drogas podem estar correlacionados para o agravamento na progressão da doença (BICA *et al.*,2001; MONGA *et al.*,2001; TEDALDI *et al.*,2003).

O vírus da hepatite C possui uma alta prevalência (36,2%) na população de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida na cidade de Santos, estado de São Paulo, região sudeste do Brasil (SEGURADO *et al.*,2004). Entretanto portadores do vírus HIV residentes na região norte, no estado da Amazônia, apresentaram somente 5% de reatividade contra anticorpos do VHC (BRAGA *et al.*,2006). Os dados da região centro-oeste apontam 3,2% de reatividade contra anticorpos do vírus HIV e 2,5% para HCV, com 42% de positividade para HCV nos pacientes HIV positivos (PEREIRA *et al.*,2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência dos subtipos virais da hepatite C em pacientes co-infectados pelo HIV-1 e sua associação com as diversas vias de transmissão na cidade de Salvador, Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência dos subtipos do VHC na população estudada.
- Avaliar associação da infecção pelos diversos subtipos do VHC com as características demográficas e fatores de risco, em pacientes infectados pelo HIV-1 em Salvador, Bahia.

4 JUSTIFICATIVAS

A co-infecção VHC/HIV aumenta o risco de progressão da doença hepática. O tratamento é dispendioso, demorado e apresenta respostas variáveis de acordo com o subtipo do VHC. Pacientes co-infectados pelo tipo 1 apresentam respostas virológicas inferiores (<50%) comparados com o tipo 3 (>80%). O conhecimento da prevalência dos subtipos do VHC e das vias de transmissão em nosso meio pode permitir o planejamento da melhor estratégia para tratamento desta patogenia.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas no Laboratório de Pesquisa em Infectologia – Unidade de Virologia (LAPI-VIR) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) em Salvador, Bahia, amostras de 75 pacientes infectados pelo HIV previamente diagnosticado para hepatite “C” no período de março de 2005 a outubro de 2007 e determinados o status sorológicos para co-infecção pelo VHC. Desta forma, foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) e a ficha epidemiológica (Apêndice 2).

Após o preenchimento das certidões, as amostras foram coletadas pelo sistema à vácuo, em frascos de 5 mL, estéreis contendo 0,5 mL do anticoagulante ácido Etilenodiaminatetracético Tripotássio (K3 EDTA), centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (RPM) durante 10 minutos e extraído o plasma.

5.2 EXAMES LABORATORIAIS

No plasma dos voluntários a presença de anticorpos reagentes aos vírus HIV e VHC (n=75) foi determinada pelos métodos de ensaio imunoenzimático (EIA) e confirmado pelo “Western Blot” na infecção pelo HIV.

As amostras positivas para ambas as infecções foram submetidas a quantificação da carga viral plasmática do vírus HIV (NASBA – Biomerieux), contagem das células CD4/CD8 (FACSCalibur – Becton Dickinson) e para

determinação dos genótipos do vírus da hepatite C foi utilizado o kit TRUGENE 5'NC (Visible Genetics Toronto – Canadá - SIEMENS Diagnostics).

5.2.2 Ensaio imunoenzimático (EIA) para VHC

O teste sorológico para pesquisa de anticorpos contra os antígenos do vírus C da hepatite (anti-VHC) foi realizado pelo método imunoenzimático indireto (ETI-Ab-HCVK-3, Diasorin), comercialmente disponível. As placas utilizadas foram previamente sensibilizadas com polipeptídeos das regiões estruturais (c22 e c23 recombinantes) e não estruturais do VHC (NS4 e NS5 peptídeos). Após adição do soro ou plasma, a placa foi incubada por 60 minutos e lavada 5 vezes com tampão salino de fosfato (PBS) e Tween[®] 20 para a incubação com a solução de conjugado contendo peroxidase com IgG humano cultivado em cabras. Em seguida, efetuou-se um novo processo de lavagem seguido da pipetagem da mistura da tetra-metil-benzidina (TMB) com tampão citrato e peróxido de hidrogênio (solução reveladora – substrato) e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final da incubação, as amostras positivas demonstraram uma cor azul sendo alterada para amarela com a adição do ácido sulfúrico 1N e a absorbância mensurada contra o filtro de 450nm com 620nm de referência. O ponto de corte foi determinado calculando-se a média dos controles negativos somado com o fator de diluição fornecido pelo fabricante.

5.2.3 Ensaio imunoenzimático (EIA) para HIV

O ensaio para detecção dos anticorpos contra o HIV 1 e 2 (Vironostika HIV Uni-Form II – Biomerieux), comercialmente disponível, baseia-se no princípio “sandwich” em uma única etapa. Foram utilizados microplacas revestidas com uma mistura das

proteínas do vírus HIV (p24 HIV-1, gp160 HIV-1, ANT70 HIV-1 e aa592-603 HIV-2) e uma esfera em forma de perola com conjugado liofilizado e marcado com peroxidase.

A primeira fase inicia-se com a adição de 100 μ L do diluente da amostra seguido de 50 μ L da amostra de soro ou plasma do paciente a ser testado e incubado por 60 minutos a 37°C. Após sucessivas lavagens adicionou-se 100 μ L da solução reveladora (TMB) seguido de um período de incubação de 30 minutos em temperatura ambiente. A última fase ocorre com a adição do ácido sulfúrico a uma concentração de 1N para bloquear a reação seguida da leitura colorimétrica utilizando filtros com comprimento de onda em 450 nm e 620 nm como referência.

5.2.4 Exame confirmatório para HIV (“Western Blot”)

O exame de “Western Blot” é utilizado como principal padrão na confirmação de amostras repetidamente positivas no teste EIA. O kit utilizado para execução das amostras contidas neste estudo foi o GENELABS Technologies. A primeira etapa iniciou-se com a adição de 2 mL da solução de lavagem à fita de reação para hidratação durante 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação orbital de 100 RPM. Após o término desta fase, adicionou-se 20 μ L de soro ou plasma da amostra a ser testada iniciando por 60 minutos um processo de incubação em temperatura ambiente sob agitação orbital de 100 RPM. Em seguida após três processos de lavagens adicionou-se o conjugado sendo submetido ao mesmo período de incubação citado na fase anterior. Após nova etapa de lavagens adicionou-se 2 mL do substrato durante um período de incubação de 15 minutos em temperatura ambiente com 100 RPM. Após aspiração do substrato e da água destilada utilizada para

interromper a reação efetuou-se a análise dos resultados seguindo os critérios determinados pelo fabricante.

5.2.5 Exame da Quantificação da Carga Viral para HIV

O método utilizado para quantificação da carga viral para HIV baseia-se no princípio NASBA (Biomerieux). Esta metodologia é semelhante ao ciclo replicativo do HIV “*in vivo*” sendo capaz de detectar valores entre 80 e 10.000.000 de cópias por mililitro de plasma na amostra testada. O exame se desenvolve em três etapas: liberação e isolamento do RNA viral; amplificação do RNA viral e a detecção através do método de hibridização.

5.2.5.1 Liberação e Isolamento dos Ácidos Ribonucléicos (RNA)

A liberação do RNA do vírus VHC foi realizado através da utilização de 1 mL de plasma do paciente com 9 mL do tampão contendo tiocianato de guanidina 5mol/L, triton x-100 e alta concentração salina (Nuclisens[®] Lysis Buffer, Biomerieux), com a finalidade de solubilizar as proteínas e os lipídios levando a inativação dos agentes infecciosos presentes na amostra. Nesta fase são adicionados três calibradores de RNA sintéticos com concentrações conhecidos que irão atuar como controles internos, além de permitir a criação de uma curva padrão para cálculo do resultado da amostra desejada.

O início da fase do isolamento viral ocorre através da imobilização dos ácidos nucleicos liberados, em partículas de sílica. A purificação automatizada (Extractor – Biomerieux) dos RNA's imobilizados em fase sólida inicia-se com sucessivas

lavagens com etanol e acetona para eliminação completa dos materiais solubilizados presentes na amostra. A etapa de eluição ocorreu com a adição de uma solução tampão de baixa concentração salina permitindo a liberação dos RNA's aderidos às partículas de sílica. Ao final da extração obtêm-se um material genético altamente purificado e livre de fatores inibitórios.

5.2.5.2 Amplificação Isotérmica dos Ácidos Ribonucléicos (RNA)

A amplificação de ácidos nucleicos utilizado para a quantificação de RNA do HIV em plasma baseia-se em uma reação isotérmica que ocorre a 41°C e pode gerar um fator de 10^9 cópias de RNA em 90 minutos. A região do HIV amplificada corresponde ao gene "gag" e consiste na atividade simultânea das enzimas transcriptase reversa, RNase H e a T7 – RNA polimerase. O início desta fase ocorre após a preparação dos iniciadores, do conjunto de enzimas e descongelamento do material extraído. Adiciona-se 10µL da amostra de RNA viral extraída e purificada a 5µL dos iniciadores incubando-os por 5 minutos a 65°C. Após esta etapa transferem-se os tubos contendo os iniciadores e os RNAs virais extraídos para 41°C deixando-os estabilizar a temperatura por 5 minutos. Em seguida, adiciona-se 5µL do conjunto de enzimas e permite que a amostra permaneça por 90 minutos na mesma temperatura. Após concluído esta fase pode-se congelar o produto a -20°C ou dar início a fase de detecção.

5.2.5.3 Detecção Quimioluminescente dos Ácidos Ribonucléicos (RNA)

O processo de detecção inicia-se com o preparo de quatro tubos contendo 20 μ L do padrão de sondas específicas e genéricas que permitirá uma reação de hibridização dos três calibradores adicionados na fase inicial e o RNA da amostra analisada. A estas sondas adiciona-se 5 μ L do material amplificado deixando-os incubados a uma temperatura de 41°C por 30 minutos sendo necessária uma agitação a cada 10 minutos. Após ajuste da concentração desejada as amostras são levadas ao equipamento que irá efetuar a contagem da amostra e dos calibradores através da imobilização do complexo biotina-estreptoavidina ligado a esferas magnéticas presente nas sondas. Através de uma descarga elétrica o átomo de rutênio na presença de um composto chamado de tripropilamina presente no complexo irá sofrer uma reação de eletroquimioluminescência e a quantidade de luz emitida por esta reação será mensurada sendo proporcional à quantidade de amostra amplificada. O sinal proveniente da reação é digitalizado sendo calculada uma curva padrão a partir dos três calibradores utilizados permitindo o cálculo da concentração do RNA viral presente na amostra analisada e seu respectivo resultado em cópias de vírus por mililitro de plasma.

5.2.6 Exame da Contagem de Células CD4 e CD8

O equipamento utilizado para a realização da contagem das células CD4 e CD8 foi o FACSCalibur (BD – Biosciences) que possui um laser de argônio com comprimento de onda de 488 nm e 3 detectores de fluorescência na seguinte ordem: FL-1 capta a luz verde ($\lambda = 530$ nm), o FL-2 que capta a luz laranja ($\lambda = 570$ nm) e o FL-3 que capta a luz vermelha ($\lambda = 670$ nm).

Na preparação das amostras foi adicionado 20µL do anticorpo monoclonal BD TriTEST™ ao tubo BD TruCOUNT™ seguido de 50µL de sangue periférico contendo anticoagulante K3 EDTA e após agitação iniciou-se o processo de incubação em temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luminosidade. Após conclusão dessa etapa, foram adicionados 450µL do tampão de lise das hemácias (“BD FACS Lysing Solution”) na diluição 1:10 que após agitado e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luminosidade estava apto para ser processado. As amostras foram analisadas pelo programa BD Multiset™ após calibração e compensação do aparelho com as partículas BD CaliBRITE™ através do software BD FACSCComp™ sendo os resultados calculados e liberados em valores absolutos (células/mm³).

5.2.7 Exame de Genotipagem do VHC

5.2.7.1 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do VHC

O RNA foi extraído e purificado pela mesma metodologia utilizada na quantificação da carga viral plasmática do HIV e foram submetidos as reações de transcrição reversa (RT-PCR) e amplificação (PCR) (kit EZ r Tth RNA PCR – Applied Biosystems) em apenas uma única etapa, utilizando os iniciadores de sequência (invitrogen™) da região não codificante 5´ no domínio estrutural do genoma viral do VHC desenhados conforme descrito no quadro 1:

Quadro 1: Descrição da seqüência dos iniciadores da região 5'NC do vírus C da hepatite (VHC) utilizado na reação de retrotranscrição (RT-PCR) e amplificação (PCR).

Iniciador	Seqüência
KY78	CAC TCG CAA GCA CCC TAT CAG GCA GT
KY80	GCA GAA AGC GTC TAG CCA TGG CG

Na reação da RT-PCR e PCR foram utilizados 0,85mM de manganês, 150nM de cada iniciador de seqüência (KY78 e KY80), 200 μ M dos pares de bases, 5U da enzima *thermus Termophilus (Tth)*, 16 μ L do tampão da enzima e água livre de DNase e RNase (Gibco) para ajuste da concentração final. Esta reação foi disposta em tubos de PCR contendo 18 μ L da mistura e 5 μ L do RNA extraído e purificado dos respectivos pacientes. A reação de RT-PCR e PCR foi realizada no termociclador (GenAmp[®] PCR Systems 9700 Applied Biosystems) com variação de 1 $^{\circ}$ C/segundo conforme o programa descrito no quadro 2:

Quadro 2: Programação da temperatura e tempo utilizada na retrotranscrição (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região 5'NC do vírus C da hepatite (VHC).

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
RT	Anelamento e Extensão	53	45 min	01
		94	02 min	
PCR	Desnaturação	94	30 seg	10
	Anelamento	54	30 seg	
	Extensão	72	1 min	
PCR	Desnaturação	94	30 seg	25
	Anelamento	60	30 seg	
	Extensão	72	1 min	
	Extensão Final	72	7 min	01
	Resfriamento	04	∞ (infinito)	01

Os produtos da PCR foram corados com tampão “Blue Juice” 10x (Invitrogen™), submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2% (GIBCO- BRL) com 10 mg/mL de brometo de etídio (*Sigma Chemical Company*), a 130V por 60 minutos em tampão TBE (0,089M Tris, 0,089M ácido bórico e 0,002M EDTA pH 8) e fotografado em um transiluminador de luz ultra-violeta (UV). Foi utilizado como padrão de peso molecular 50 ou 100 pares de base (pb) (Invitrogen™). Fragmentos de DNA considerados positivos referem-se a uma banda com peso molecular de 250 pb.

5.2.7.2 Reação de Seqüenciamento do VHC

Os subtipos do VHC foram determinados através do kit TRUGENE 5'NC (Visible Genetics Toronto – Canadá - Bayer Health Care Diagnostics), comercialmente disponível, que após a reação de seqüenciamento CLIP™, produz um fragmento com 244 pares de base (pb) na região não codificante 5' do domínio estrutural, previamente amplificado e analisado no programa GeneObjects 3.2 (visible genetics).

A reação de seqüenciamento CLIP (CLIP™ – Trugene HCV 5'NC genotyping Kit) utiliza dois diferentes tipos de iniciadores de seqüência (Cy5 e Cy5.5) para expandir o fragmento previamente amplificado em duas direções. A preparação da mistura principal para uso em 12 amostras incluindo os controles positivos e negativos seguiu o protocolo descrito pelo fabricante com adição de 165,75µL de água própria para uso em biologia molecular inclusa no kit, 32,50µL do tampão CLIP e sulfoxido dimetil (DMSO), 26µL da mistura dos iniciadores de seqüência e por último 16,25µL da enzima. Essa mistura foi mantida em baixa temperatura e distribuída nos respectivos tubos de PCR (21µL), adicionado 4µL do produto da PCR.

Simultaneamente, efetuou-se a distribuição das misturas contendo aminoácidos terminais marcados da seguinte forma: foi pipetado 3 μ L em uma placa contendo 96 poços compatíveis com PCR (Applied Biosystems) o aminoácido marcado terminal com adenina (A) no poço A1, o aminoácido marcado terminal com citosina (C) no poço B1, o aminoácido marcado terminal com guanina (G) no poço C1, o aminoácido marcado terminal com timina (T) no poço D1 e assim sucessivamente até completar a placa, incluindo os controles negativos e positivos. Em seguida, foi pipetado 4 μ L da mistura do CLIP contendo o produto da amplificação nos respectivos poços contendo cada aminoácido marcado e acondicionado no termociclador (Applied Biosystems 9700) com a programação descrita no quadro 3.

Quadro 3: Programação da temperatura e tempo utilizada na reação CLIP para seqüenciamento da região 5'NC do vírus C da hepatite (VHC).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
Aquecimento	95	01 min	01
Desnaturação	95	30 seg	
Anelamento	45	30 seg	30
Extensão	70	1 min	
Resfriamento	04	∞ (infinito)	01

Após o término da reação CLIP adiciona-se a solução de parada seguido da etapa de desnaturação no termociclador (Applied biosystems 9700) durante 3 minutos à 85°C.

O produto da reação CLIP foi aplicado em uma placa de vidro (microcel 300 cassettes – VGI) contendo gel de poliacrilamida (sureFill™ 6% Sequence Gel – VGI) polimerizado (Gel Toater™ – VGI) e seqüenciado (Long-Read Tower Sequencer –

VGI). Os resultados obtidos com o sequenciamento foram analisados no programa GeneObjects 3.2 e gerado um resumo dos subtipos homólogos com o respectivo genótipo.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi construído no programa Excel 2003 (Microsoft® Office) e analisado estatisticamente no SPSS versão 13.0, sendo utilizado o teste de Mann-Whitney U para avaliar diferenças entre variáveis contínuas.

6 RESULTADOS

6.1 Detecção do RNA do VHC no Sangue Periférico

No período de março de 2005 a outubro de 2007, a análise de 75 amostras no EIA apresentaram reatividade para o vírus C da hepatite e para o vírus HIV, enquadrando-se nos requisitos deste estudo. Todas as amostras tiveram material genético viral isolado e aquelas que apresentaram um fragmento com aproximadamente 250 pb após serem submetidas a RT-PCR e PCR foram classificados como positivas para a presença do RNA do vírus C de hepatite (Figura 7).

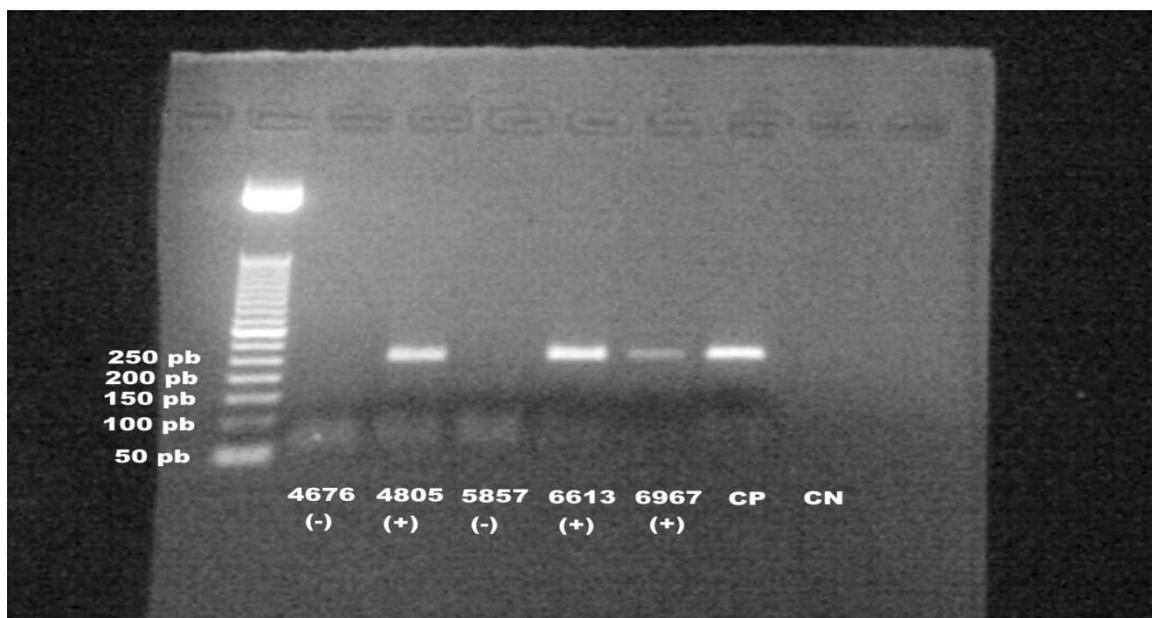


Figura 7: Perfil eletroforético do produto de amplificação da região 5'NC gene do vírus C da Hepatite (VHC) nas amostras de sangue periférico em pacientes com HIV co-infectados com o VHC, na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de março de 2005 a outubro de 2007. Identificação do gel da esquerda para direita: marcador do peso molecular de 50 pares de base (pb) (Applied Biosystems); amostras (4676, 4805, 5857, 6613 e 6967) com os respectivos resultados [(+) positivo e (-) negativo]; em seguida o controle positivo (CP) e o controle negativo (CN).

Foi detectado fragmento de RNA do VHC em 54 (72,0%) amostras e em 21 (28,0%) amostras não foi observado nenhum vestígio de material genético para o vírus C da hepatite (tabela 1).

Tabela 1: Frequência de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

RNA do VHC no Sangue Periférico	Frequência (%)
Positivo	54 (72,0)
Negativo	21 (28,0)
Total	75 (100,0)

Na amostra estudada a média da idade foi de $44,0 \pm 2,9$ anos e a maior quantidade de casos ocorreu no intervalo entre 30 a 63 anos (38 pacientes - 55,1%, $p=0,55$). O número de pacientes do sexo masculino foi maior em relação ao sexo feminino (58,7x41,3%, $p=0,87$). O valor percentual dos pacientes com relato de hemotransfusão foi mais freqüente (4 pacientes, 33,3%, $p=0,07$) nos entrevistados que não possuíam RNA para o VHC detectável no sangue periférico. A atividade heterossexual representou maioria (44 pacientes, 80%, $p=0,94$) em ambos os grupos analisados. A utilização de drogas ilícitas injetáveis foi relatada por 24 (43,6%) pacientes, contudo, a maioria (31/55 – 56,4%) dos pacientes atestou não utilizar este comportamento ($p=0,55$) (tabela 2).

Tabela 2: Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico, Salvador, Bahia, Brasil – março de 2005 a outubro de 2007.

Características Demográficas e Fatores de Risco	RNA do VHC no Sangue Periférico		Total	Valor de p
	Positivo	Negativo		
Idade/anos				
18 a 30	4 (8,3)*	-	4 (5,8)	
31 a 40	11 (22,9)	5 (23,8)	16 (23,2)	
41 a 50	26 (54,2)	12 (57,1)	38 (55,1)	
> 50	7 (14,6)	4 (19,0)	11 (15,9)	
Total	48 (100,0)	21 (100,0)	69 (100,0)	0,55
Sexo				
Masculino	32 (59,3)	12 (57,1)	44 (58,7)	
Feminino	22 (40,7)	9 (42,9)	31 (41,3)	
Total	54 (100,0)	21 (100,0)	75 (100,0)	0,87
Hemotransusão				
Sim	4 (10,8)	4 (33,3)	8 (16,3)	
Não	33 (89,2)	8 (66,7)	41 (83,7)	
Total	37 (100,0)	12 (100,0)	49 (100,0)	0,07
Atividade Sexual				
Heterossexual	31 (79,5)	13 (81,3)	44 (80,0)	
Homossexual	3 (7,7)	1 (6,3)	4 (7,3)	
Bissexual	5 (12,8)	2 (12,5)	7 (12,7)	
Total	39 (100,0)	16 (100,0)	55 (100,0)	0,94
Uso de Drogas Ilícitas Injetáveis				
Sim	16 (41,0)	8 (50,0)	24 (43,6)	
Não	23 (59,0)	8 (50,0)	31 (56,4)	
Total	39 (100,0)	16 (100,0)	55 (100,0)	0,55

* Número de Pacientes (%)

Dos 68 pacientes que obtiveram registrados a contagem das células CD4 notou-se uma média mais elevada ($492,0 \pm 260,9$ células/mm³) no grupo positivo para o RNA do VHC (48 pacientes - 70,6%), contudo este achado não obteve uma correlação estatística significativa ($p=0,42$), conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3: Análise das médias, medianas e desvios padrões da contagem de células CD4 de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

RNA do VHC no Sangue Periférico	Casos (Total = 68)	Contagem de Células CD4 (células/mm ³)		
		Média	Desvio Padrão	Mediana
Positivo	48 (70,6)*	492,0	260,9	461,0
Negativo	20 (29,4)	431,4	290,8	404,0

* Número de Pacientes (%)

$p=0,42$

Como forma de avaliar a resposta imunológica citotóxica dos pacientes envolvidos no estudo foi registrada a contagem das células CD8. Os entrevistados que possuíam RNA do VHC detectáveis no sangue periférico obtiveram uma maior contagem das células CD8 na comparação entre as médias ($924,9 \pm 551,9$ células/mm³), contudo esta diferença não representou significado estatístico ($p=0,52$) na análise dos dados (tabela 4).

Tabela 4: Análise das médias, medianas e desvios padrões da contagem de células CD8 de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

RNA do VHC no Sangue Periférico	Casos (Total = 68)	Contagem de Células CD8 (células/mm ³)		
		Média	Desvio Padrão	Mediana
Positivo	48 (70,6)*	924,9	551,9	732,0
Negativo	20 (29,4)	824,3	481,2	705,5

* Número de Pacientes (%) p=0,52

Dos 68 pacientes com a carga viral plasmática para HIV registrada, 42 (61,8%) obtiveram o valor abaixo do limite de detecção e foram excluídos da análise estatística. Destes, 31 (45,6%) pacientes apresentaram RNA do VHC e 11 (16,2%) pacientes não apresentavam RNA do VHC no sangue periférico. Entre os entrevistados com carga viral para HIV acima do limite de detecção a maior média ($3,8 \pm 1,04$ log) foi anotada nos pacientes com ausência de RNA para o VHC no sangue periférico não sendo encontrada diferença estatística deste parâmetro, na comparação com o grupo que apresentou RNA do VHC no sangue periférico ($p=0,24$) (tabela 5).

Tabela 5: Análise das médias, medianas e desvio padrão de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo a quantificação da carga viral plasmática para o HIV e a presença de RNA do VHC no sangue periférico na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

RNA do VHC no Sangue Periférico	Casos (Total = 26)	Quantificação da Carga Viral Plasmática para o HIV (Log)		
		Média	Desvio Padrão	Mediana
Positivo	17 (65,4)*	3,3**	0,98**	2,9**
Negativo	9 (34,6)	3,8	1,04	3,8

*Número de Pacientes (%)

p= 0,24

**Foram excluídos da análise estatística os valores abaixo do limite de detecção do teste.

6.2 Análise dos tipos do VHC no Sangue Periférico

Das 54 amostras (72,0%) que apresentaram RNA do VHC detectado no sangue periférico obteve-se o seqüenciamento de 46 (61,3%), evidenciando o tipo 1 (60,9%) como o mais prevalente, seguido do tipo 3 (34,8%), conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 6: Frequência de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o tipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

Tipo do Vírus C da Hepatite	Frequência (%)
1	28 (60,9)
2	1 (2,2)
3	16 (34,8)
4	1 (2,2)
Total	46 (100,0)

Na análise entre os tipos 1 e 3 do vírus C da Hepatite em pacientes co-infectados pelo vírus HIV em relação às características demográficas e fatores de risco da população estudada evidenciam-se características semelhantes tais como: uma maior incidência em pacientes com idade entre 41 a 50 anos (22 pacientes, 53,7%, $p=0,30$), sexo masculino (28 pacientes, 60,9%, $p=0,45$), predomínio da relação heterossexual (26 pacientes, 74,3%, $p=0,87$), não utilização de drogas ilícitas injetáveis (20 pacientes, 55,6%, $p=1,00$) e não utilização de hemoderivados (30 pacientes, 88,2%, $p=0,74$) (tabela 7).

Tabela 7: Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o tipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

Características demográficas e fatores de risco	Tipo do Vírus C da Hepatite				Total	Valor de p**
	1	2	3	4		
Idade/anos						
18 a 30	2 (8,3)*	-	1 (6,7)	-	3 (7,3)	
31 a 40	5 (20,8)	1 (100)	2 (13,3)	-	8 (19,5)	
41 a 50	14 (58,3)	-	8 (53,3)	1 (100,0)	23 (56,1)	
> 50	3 (12,5)	-	4 (26,7)	-	7 (17,1)	
Total	24 (100,0)	1 (100,0)	15 (100,0)	1 (100,0)	41 (100,0)	0,30
Sexo						
Masculino	19 (67,9)	1 (100,0)	9 (56,3)	1 (100,0)	30 (65,2)	
Feminino	9 (32,1)	-	7 (43,8)	-	16 (34,8)	
Total	28 (100,0)	1 (100,0)	16 (100,0)	1 (100,0)	46 (100,0)	0,45
Hemotransfusão						
Sim	2 (10,5)	1 (100,0)	1 (7,1)	-	4 (11,8)	
Não	17 (89,5)	-	13 (92,9)	-	30 (88,2)	
Total	19 (100,0)	1 (100,0)	14 (100,0)	-	34 (100,0)	0,74
Atividade Sexual						
Heterossexual	17 (85,0)	1 (100,0)	9 (64,3)	-	27 (77,1)	
Homossexual	1 (5,0)	-	2 (14,3)	-	3 (8,6)	
Bissexual	2 (10,0)	-	3 (21,4)	-	5 (14,3)	
Total	20 (100,0)	1 (100,0)	14 (100,0)	-	35 (100,0)	0,87
Uso de Drogas Ilícitas Injetáveis						
Sim	9 (42,9)	-	6 (42,9)	-	15 (41,7)	
Não	12 (57,1)	1 (100,0)	8 (57,1)	-	21 (58,3)	
Total	21 (100,0)	1 (100,0)	14 (100,0)	-	36 (100,0)	1,00

* Número de Pacientes (%)

** Análise estatística realizada somente com os tipos 1 e 3 do vírus C hepatite devido ao baixo número de indivíduos nos tipos 2 e 4.

6.3 Análise dos subtipos do VHC no Sangue Periférico

Das 46 (61,3%) amostras com RNA do VHC detectáveis no sangue periférico e seqüenciadas, 45 (60,0%) obtiveram diferenciação entre os genótipos dessa forma, pôde-se determinar o subtipo 1b (15 pacientes, 33,3%) como o mais prevalente, seguido dos subtipos 1a (13 pacientes, 28,9%) e 3a (12 pacientes, 26,7%), conforme os dados demonstrados na tabela 7.

Tabela 8: Frequência de pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o subtipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

Subtipo do Vírus C da Hepatite	Frequência (%)
1a	13 (28,9)
1b	15 (33,3)
2b	1 (2,2)
3a	12 (26,7)
3d	3 (6,7)
4a	1 (2,2)
Total	45 (100,0)

Para a análise estatística foram utilizados os subtipos 1a, 1b, 3a e 3d do vírus C da hepatite devido ao baixo número de pacientes nos subtipos 2a e 4a, desta forma as características demográficas e fatores de risco demonstram que a maioria dos entrevistados possui idade entre 41 a 50 anos (23 pacientes, 56,1%), destacando-se o subtipo 1B (8 pacientes, 61,5%) como o mais prevalente dentre os subtipos nesta faixa etária. Entretanto, o subtipo 1a apresentou o maior percentual (9 pacientes - 69,2%) do sexo masculino. Conforme demonstrado na tabela 9, a utilização de drogas

ilícitas injetáveis predomina em pacientes portadores do subtipo 1a (75%) em relação aos pacientes portadores do subtipo 1b (23,2%) evidenciando uma tendência do subtipo 1a por esta via de transmissão ($p=0,052$). A maioria dos entrevistados (04 pacientes - 12,1%) negou hemotransfusões e relataram relações heterossexuais (26 pacientes – 76,5%), sendo observado nos subtipos 1a (7 pacientes – 100%) e 1b (10 pacientes – 76,9%) a maior concentração dos pacientes.

Tabela 9: Características demográficas e fatores de risco em pacientes com HIV co-infectados com o vírus C da hepatite (VHC) segundo o subtipo do VHC na cidade de Salvador, Bahia, Brasil no período de março de 2005 a outubro de 2007.

Características demográficas e fatores de risco	Subtipo do Vírus C da Hepatite						Total	Valor de p**
	1a	1b	2b	3a	3d	4a		
Idade/anos								
18 a 30	2 (18,2)*	-	-	1 (8,3)	-	-	3 (7,3)	
31 a 40	2 (18,2)	3 (23,1)	1 (100,0)	1 (8,3)	1 (33,3)	-	8 (19,5)	
41 a 50	6 (54,5)	8 (61,5)	-	7 (58,3)	1 (33,3)	1 (100,0)	23 (56,1)	
> 50	1 (9,1)	2 (15,4)	-	3 (25,0)	1 (33,3)	-	7 (17,1)	
Total	11 (100,0)	13 (100,0)	1 (100,0)	12 (100,0)	3 (100,0)	1 (100,0)	41 (100,0)	0,60
Sexo								
Masculino	9 (69,2)	10 (66,7)	1 (100,0)	7 (58,3)	1 (33,3)	1 (100,0)	29 (64,4)	
Feminino	4 (30,8)	5 (33,3)	-	5 (41,7)	2 (66,7)	-	16 (35,6)	
Total	13 (100,0)	15 (100,0)	1 (100,0)	12 (100,0)	3 (100,0)	1 (100,0)	45 (100,0)	0,68
Hemotransfusão								
Sim	1 (14,3)	1 (8,3)	1 (100,0)	1 (10,0)	-	-	4 (12,1)	
Não	6 (85,7)	11 (91,7)	-	9 (90,0)	3 (100,0)	-	29 (87,9)	
Total	7 (100,0)	12 (100,0)	1 (100,0)	10 (100,0)	3 (100,0)	-	33 (100,0)	0,92
Atividade Sexual								
Heterossexual	7 (100,0)	10 (76,9)	1 (100,0)	6 (60,0)	2 (66,7)	-	26 (76,5)	
Homossexual	-	1 (7,7)	-	1 (10,0)	1 (33,3)	-	3 (8,8)	
Bissexual	-	2 (15,4)	-	3 (30,0)	-	-	5 (14,7)	
Total	7 (100,0)	13 (100,0)	1 (100,0)	10 (100,0)	3 (100,0)	-	34 (100,0)	0,42
Uso de Drogas Ilícitas Injetáveis								
Sim	6 (75,0)	3 (23,1)	-	5 (50,0)	-	-	14 (40,0)	
Não	2 (25,0)	10 (76,9)	1 (100,0)	5 (50,0)	3 (100,0)	-	21 (60,0)	
Total	8 (100,0)	13 (100,0)	1 (100,0)	10 (100,0)	3 (100,0)	-	35 (100,0)	0,052

* Número de Pacientes (%)

**Análise estatística foi realizada com os subtipos 1A,1B, 3A e 3D do vírus C hepatite devido ao baixo número de pacientes nos subtipos 2B e 4A.

7 DISCUSSÃO

A análise da reação da polimerase em cadeia (PCR) demonstrou neste estudo que 54 (72%) pacientes foram positivos nas sorologias para ambas as patogenias e apresentaram material genético no sangue periférico para determinação do genótipo para o VHC. Este valor está acima do encontrado por Silva e Cols. em um estudo realizado na cidade de Salvador na Bahia, região nordeste do Brasil em 2000 que foi detectado 83 (65,4%) de 127 pacientes com apenas o anti-VHC positivo e material genético do VHC circulante no sangue periférico (SILVA *et al.*,2000). Os dados de outro estudo no estado do Mato Grosso, região central do Brasil, apontam um índice maior (86,8%) que o registrado no presente estudo em pacientes portadores do HIV e co-infectados pelo VHC com material genético do VHC presente no sangue periférico (MUSSI *et al.*,2007; ZIGNEGO *et al.*,1999). Dado ratificado na Espanha, em 2005 com um índice de 88,82%, acima do encontrado neste estudo, envolvendo 767 pacientes acometidos pelas duas infecções (RUBIO *et al.*,2005). Entretanto, outros grupos de pesquisadores na Itália, analisando 49 pacientes duplamente infectados pelo HIV e VHC obtiveram 69% da presença do RNA para o VHC sendo, abaixo do presente estudo. As alterações nos valores observados podem estar relacionadas ao comportamento, alimentação, costumes bem como, o poder da depuração do VHC da circulação periférica (ALTER *et al.*,2000; RUBIO *et al.*,2005). A região do RNA do VHC utilizada para a realização da técnica de retrotranscrição e amplificação utilizada foi a 5'NC desta forma, descarta-se a divergência entre a correlação dos resultados apresentados nos estudos supra citados bem como, as metodologias (ALTER *et al.*,2000; HAUSHOFER *et al.*,2003; RUBIO *et al.*,2005).

Amostras falso-positivas pode ser outro fator associado às divergências nos resultados obtidos.

A média da contagem de células linfocíticas T CD4 foi de aproximadamente 492,0 ($\pm 260,9$) células/mm³ de sangue nos pacientes contendo RNA do VHC no sangue periférico e 431,4 ($\pm 290,8$) células/mm³ nos pacientes sem a presença do vírus. Na comparação entre as médias não foram observadas variações significativas estatisticamente ($p=0,42$). Contudo, entre os 68 pacientes com resultado positivo para o RNA do VHC, a maioria (40 pacientes, 58,8%) possuíam CD4 acima de 200 células/mm³ de sangue ($p=0,74$) (dados não mostrados). Em um estudo realizado por Braga e cols., em 2006, na divisão de gastroenterologia e hepatologia da Universidade Federal da Bahia, apontaram 78,5% dos pacientes que possuíam os vírus HIV e VHC obtiveram a contagem do CD4 maiores que 200 células/mm³ (BRAGA *et al.*,2006). Em outro estudo realizado com pacientes portadores do HIV e VHC em Dublin, Irlanda, 85% dos participantes com resposta virológica sustentada em tratamento ou na intenção do tratamento, mantiveram o CD4 acima de 250 células/mm³ (SHEA *et al.*,2008). Entretanto Garcia-Samaniego e cols., em 2001, estudando uma coorte de usuários de drogas ilícitas injetáveis registraram 81% de pacientes com o CD4 abaixo do limite de 200 células/mm³ de sangue porém, ausência de condições definidoras do quadro de AIDS (GARCIA-SAMANIEGO *et al.*,2001). Estes estudos demonstram que a infecção pelo vírus C de hepatite não contribui para o comprometimento imunológico em pacientes portadores do vírus HIV apesar da possibilidade da replicação do vírus VHC nas células T linfocíticas exclusivamente em pacientes portadores do vírus HIV podendo acarretar uma competição e conseqüente diminuição acentuada das células T CD4 (LASKUS *et al.*,2000).

As células com receptores de membrana CD8 apresentaram nos pacientes positivos para a presença do VHC no sangue periférico uma média de 924,9 ($\pm 551,9$) células/mm³ e 824,3 ($\pm 481,2$) células/mm³ nos pacientes que não apresentavam RNA do VHC. A análise estatística não revelou significância entre os grupos estudados ($p=0,52$).

No presente estudo a média da carga viral para o vírus HIV foi de 3,3 log ($\pm 0,98$) nos pacientes que apresentaram RNA do VHC no sangue periférico e 3,8 log ($\pm 1,04$) nos pacientes com ausência para o RNA do VHC. Estes valores não obtiveram correlação estatística ($p=0,24$), sendo excluídas as cargas virais com resultado abaixo do limite de detecção do teste. Em um estudo realizado na China, com pacientes co-infectados VHC/HIV foram determinadas as respectivas médias das cargas virais para HIV como sendo, 4,61 e 4,45 log nos grupos analisados (PAN *et al.*,2007). Outro estudo realizado em 2005, na Espanha, avaliando a epidemiologia da hepatite crônica pelo VHC determinou o valor médio da carga viral para HIV em 4,59 log nos pacientes estudados (RUBIO *et al.*,2005).

O tipo 1 foi encontrado em 28 (60,9%) pacientes com o material genético detectável no sangue periférico, seguido do tipo 3 (16 pacientes, 34,8%) e dos tipos 2 (1 paciente, 2,2%) e 4 (1 paciente, 2,2%) em cada grupo. Os dados do presente estudo estão em consonância com um estudo realizado por Braga e cols. em 2006 com pacientes mono-infectados pelo VHC e co-infectados VHC/HIV na cidade de Salvador, onde foi encontrado uma prevalência de 70,8% dos pacientes positivos para o tipo 1 e 29,2% para os tipos 2 ou 3 (BRAGA *et al.*,2006). Estudos com pacientes mono-infectados pelo VHC, na mesma localidade, descreveram o tipo 1 como mais prevalente seguido pelo tipo 3 (CODES *et al.*,2003; SILVA *et al.*,2000). Yoo e cols., em 2005, realizando um estudo multicêntrico com hemofílicos co-

infectados pelo VHC/HIV, nos Estados Unidos, também observaram uma maior prevalência do tipo 1 (84%) seguido do tipo 3 (14%), tipo 4 (4,4%) e tipo 2 (3,9%) (YOO *et al.*,2005). Na costa oeste dos Estados unidos, Seal e cols. identificaram o tipo 1 como o mais predominante em paciente co-infectados VHC/HIV, seguido do tipo 3 (SEAL *et al.*,2007). O estudo de Ramos e cols. realizado na Espanha, em 2007, com uma grande quantidade de participantes (1343 pacientes) sendo 797 (65%) pacientes positivos para ambas as patogenias, determinou o tipo 1 como mais prevalente (58,5%), seguido do tipo 3 (25%) e do tipo 4 (13,3%) (RAMOS *et al.*,2007). Entretanto, Morsica e cols., em 2007, analisando 34 pacientes co-infectados VHC/HIV na região central da Itália, obteve, com diferença de apenas um paciente, o tipo 3 como mais predominante (15 – 44,1%), em seguida o tipo 1 (14 – 41,2%), e por fim os tipos 4 (4 pacientes, 11,8%) e o tipo 2 (1 paciente, 5,9%) (MORSICA *et al.*,2007). Em um estudo Europeu multicêntrico com pacientes co-infectados VHC/HIV, que envolveu dentre outros países a Itália, o tipo 1 (48%) foi o mais prevalente seguido do tipo 3 (34%) (VAN *et al.*,2004). Desta forma, os resultados encontrados nos pacientes co-infectados pelo VHC e HIV no presente estudo na cidade do Salvador, estão de acordo com a distribuição descrita por pesquisas em todo o mundo. A diferença encontrada nos valores do estudo de Morsica e cols. pode ser atribuída ao reduzido número de participantes, não demonstrando a real situação dos tipos do VHC circulantes na população com HIV da Itália.

Na análise entre os tipos mais prevalentes (tipos 1 e 3), observou-se que o sexo masculino (19 pacientes – 43,2%; $p=0,44$), o numero de pessoas que relataram manter relações heterossexuais (17 pacientes – 51,5%; $p=0,12$), não ter recebido

hemoderivados (17 pacientes – 51,5%, $p=0,738$) e não utilizaram drogas ilícitas injetáveis (12 pacientes – 34,2%; $p=1,000$) foram mais predominante no tipo 1.

Os resultados do presente estudo revelaram o subtipo 1b como o mais prevalente (15 pacientes, 33,3%), seguido pelo subtipo 1a (13 pacientes, 28,9%) e do subtipo 3a (12 pacientes, 26,7%). Em um estudo realizado no ano de 2000, na cidade de Salvador, Bahia, com indivíduos mono-infectados pelo vírus C da hepatite registrou uma distribuição semelhante com o subtipo 1b (32 pacientes, 38,6%) sendo o mais prevalente, seguido do subtipo 1a (20 pacientes, 24,1%) e 3a (18 pacientes, 21,7%) (SILVA *et al.*,2000). Entretanto, um estudo realizado com 127 pacientes mono-infectados pelo VHC, na mesma localidade, no ano de 2003, o subtipo 1b (35,4%) se manteve como o mais prevalente, seguido do genótipo 3 (33,9%) e do subtipo 1a (30,7%) (CODES *et al.*,2003). Na análise entre os pacientes co-infectados pelo vírus C da hepatite e o HIV, na região central do Brasil, o subtipo 1a (61,6%) obteve a maior porcentagem seguido do 3a (21,7%), 1b (15%) e 2 (1,7%) (MUSSI *et al.*,2007). Na Espanha um estudo envolvendo 767 pacientes co-infectados pelo VHC/HIV evidenciou-se o subtipo 1a (167 pacientes, 34,42%) como mais prevalente seguido dos subtipos 3 (124 pacientes, 25,56%) e 1b (78 pacientes, 16,08%) (RUBIO *et al.*,2005). Outro estudo publicado dois anos depois, analisando 1343 indivíduos co-infectados VHC/HIV no mesmo país, evidenciou um perfil diferente ao citado anteriormente com o subtipo 1b (32,4%) com uma maior frequência seguida dos subtipos 1a (30,2%) e 3a (20,8%) (RAMOS *et al.*,2007).

8 CONCLUSÕES

A frequência dos genótipos do vírus C da hepatite em pacientes co-infectados pelo HIV, neste estudo, é semelhante ao observado na literatura.

Há uma tendência para maior prevalência do subtipo 1a do VHC entre os pacientes usuários de drogas ilícitas injetáveis na população estudada.

Neste estudo, a distribuição dos genótipos do VHC nos pacientes co-infectados pelo HIV é semelhante a descrita na literatura em pacientes mono-infectados pelo VHC.

Referências Bibliográficas

.Consenso sobre Conduitas nas Hepatites B e C 2005

AACH R.D.;SZMUNESS W.;MOSLEY J.W.;HOLLINGER F.B.;KAHN R.A.;STEVENS C.E.;EDWARDS V.M.;WERCH J.Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A,non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study.**N.Engl.J.Med.** (17) 989-994.1981

ALTER H.J.;SEEFF L.B.Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome.**Semin.Liver Dis.** (1) 17-35.2000

ALTER M.J.;MARGOLIS H.S.;KRAWCZYNSKI K.;JUDSON F.N.;MARES A.;ALEXANDER W.J.;HU P.Y.;MILLER J.K.;GERBER M.A.;SAMPLINER R.E.;The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team.**N.Engl.J.Med.** (27) 1899-1905.1992

BARRE-SINOUSSE F.;CHERMANN J.C.;REY F.;NUGEYRE M.T.;CHAMARET S.;GRUEST J.;DAUGUET C.;XLER-BLIN C.;VEZINET-BRUN F.;ROUZIQUX C.;ROZENBAUM W.;MONTAGNIER L.Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).**Science.** (4599) 868-871.1983

- BARTENSCHLAGER R. The NS3/4A proteinase of the hepatitis C virus: unravelling structure and function of an unusual enzyme and a prime target for antiviral therapy. **J. Viral Hepat.** (3) 165-181.1999
- BARTENSCHLAGER R.; LOHMANN V. Replication of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.** (Pt 7) 1631-1648.2000
- BENHAMOU Y.; DI M., V.; BOCHET M.; COLOMBET G.; THIBAUT V.; LIOU A.; KATLAMA C.; POYNARD T. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus- and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. **Hepatology.** (2) 283-287.2001
- BICA I.; MCGOVERN B.; DHAR R.; STONE D.; MCGOWAN K.; SCHEIB R.; SNYDMAN D.R. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. **Clin. Infect. Dis.** (3) 492-497.2001
- 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.** (22) 3365-3373.2000
- BRAGA E.L.; LYRA A.C.; NEY-OLIVEIRA F.; NASCIMENTO L.; SILVA A.; BRITES C.; MARBAK R.; LYRA L.G. Clinical and epidemiological features of patients with chronic hepatitis C co-infected with HIV. **Braz. J. Infect. Dis.** (1) 17-21.2006
- CHOO Q.L.; KUO G.; WEINER A.J.; OVERBY L.R.; BRADLEY D.W.; HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science.** (4902) 359-362.1989

- CHOO Q.L.;RICHMAN K.H.;HAN J.H.;BERGER K.;LEE C.;DONG C.;GALLEGOS C.;COIT D.;MEDINA-SELBY R.;BARR P.J.;Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus.**Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** (6) 2451-2455.1991
- CODES L.;DE FREITAS L.A.;SANTOS-JESUS R.;VIVITSKI L.;SILVA L.K.;TREPO C.;REIS M.G.;PARANA R.Comparative study of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia Brazil.**Braz.J.Infect.Dis.** (6) 409-417.2003
- COUTO-FERNANDEZ J.C.;JANSSENS W.;HEYNDRICKX L.;MOTTE J.;FRANSEN K.;PEETERS M.;DELAPORTE E.;GALVAO-CASTRO B.;PIOT P.;VAN DER G.G.Genetic and antigenic variability of HIV type 1 in Brazil.**AIDS Res.Hum.Retroviruses.** (9) 1157-1163.1994
- DALGLEISH A.G.;BEVERLEY P.C.;CLAPHAM P.R.;CRAWFORD D.H.;GREAVES M.F.;WEISS R.A.The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.**Nature.** (5996) 763-767.1984
- DE F.R.;PESSI A.;STEINKUHLER C.The hepatitis C virus NS3 proteinase: structure and function of a zinc-containing serine proteinase.**Antivir.Ther.** (Suppl 3) 99-109.1998
- DONAHUE J.G.;MUNOZ A.;NESS P.M.;BROWN D.E., JR.;YAWN D.H.;MCALLISTER H.A., JR.;REITZ B.A.;NELSON K.E.The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection.**N.Engl.J.Med.** (6) 369-373.1992
- GALLO R.C.;SARIN P.S.;GELMANN E.P.;ROBERT-GUROFF M.;RICHARDSON E.;KALYANARAMAN V.S.;MANN D.;SIDHU G.D.;STAHL R.E.;ZOLLA-

PAZNER S.;LEIBOWITCH J.;POPOVIC M.Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS).**Science.** (4599) 865-867.1983

GALVAO-CASTRO B.;IVO-DOS-SANTOS J.;COUTO-FERNANDEZ J.C.;BONGERTZ V.;CHEQUER-BOU-HABIB D.;SION F.S.;BARTH O.M.;PEREIRA H.;PEREIRA M.S.Isolation and antigenic characterization of human immunodeficiency virus (HIV) in Brazil.**Mem.Inst.Oswaldo Cruz.** (4) 453-456.1987

GARCIA-SAMANIEGO J.;RODRIGUEZ M.;BERENGUER J.;RODRIGUEZ-ROSADO R.;CARBO J.;ASENSI V.;SORIANO V.Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C.**Am.J.Gastroenterol.** (1) 179-183.2001

GELDERBLOM H.R.;HAUSMANN E.H.;OZEL M.;PAULI G.;KOCH M.A.Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.**Virology.** (1) 171-176.1987

GEYER H.;HOLSCHBACH C.;HUNSMANN G.;SCHNEIDER J.Carbohydrates of human immunodeficiency virus. Structures of oligosaccharides linked to the envelope glycoprotein 120.**J.Biol.Chem.** (24) 11760-11767.1988

GOTTLIEB M.S.;SCHROFF R.;SCHANKER H.M.;WEISMAN J.D.;FAN P.T.;WOLF R.A.;SAXON A.Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.**N.Engl.J.Med.** (24) 1425-1431.1981

- GRAHAM C.S.;BADEN L.R.;YU E.;MRUS J.M.;CARNIE J.;HEEREN T.;KOZIEL M.J.Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis.**Clin.Infect.Dis.** (4) 562-569.2001
- GURTLER L.G.;HAUSER P.H.;EBERLE J.;VON B.A.;KNAPP S.;ZEKENG L.;TSAGUE J.M.;KAPTUE L.A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon.**J.Virol.** (3) 1581-1585.1994
- HAROUSE J.M.;BHAT S.;SPITALNIK S.L.;LAUGHLIN M.;STEFANO K.;SILBERBERG D.H.;GONZALEZ-SCARANO F.Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide.**Science.** (5017) 320-323.1991
- HAUSHOFER A.C.;BERG J.;HAUER R.;TRUBERT-EXINGER D.;STEKEL H.G.;KESSLER H.H.Genotyping of hepatitis C virus-comparison of three assays.**J.Clin.Virol.** (3) 276-285.2003
- HAVENS W.P., JR.Viral hepatitis: multiple attacks in a narcotic addict.**Ann.Intern.Med.** (1) 199-203.1956
- HAVENS W.P.;WILLIAMS T.L.THE CHANGES IN THE SERUM PROTEINS IN PATIENTS WITH EXPERIMENTALLY INDUCED INFECTIOUS HEPATITIS.**J.Clin.Invest.** (3 Pt 1) 340-345.1948
- IKEDA K.;SAITOH S.;KOIDA I.;ARASE Y.;TSUBOTA A.;CHAYAMA K.;KUMADA H.;KAWANISHI M.A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis.**Hepatology.** (1) 47-53.1993

JANSSENS W.;NKENGASONG J.N.;HEYNDRICKX L.;FRANSEN K.;NDUMBE

P.M.;DELAPORTE E.;PEETERS M.;PERRET J.L.;NDOUMOU A.;ATENDE

C.;Further evidence of the presence of genetically aberrant HIV-1 strains in

Cameroon and Gabon.**AIDS**. (7) 1012-1013.1994

KLATZMANN D.;CHAMPAGNE E.;CHAMARET S.;GRUEST J.;GUETARD

D.;HERCEND T.;GLUCKMAN J.C.;MONTAGNIER L.T-lymphocyte T4 molecule

behaves as the receptor for human retrovirus LAV.**Nature**. (5996) 767-768.1984

KUO G.;CHOO Q.L.;ALTER H.J.;GITNICK G.L.;REDEKER A.G.;PURCELL

R.H.;MIYAMURA T.;DIENSTAG J.L.;ALTER M.J.;STEVENS C.E.;.An assay for

circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B

hepatitis.**Science**. (4902) 362-364.1989

L H DOS S OLIVEIRA.Virologia Humana 1994

LAROSA G.J.;DAVIDE J.P.;WEINHOLD K.;WATERBURY J.A.;PROFY A.T.;LEWIS

J.A.;LANGLOIS A.J.;DREESMAN G.R.;BOSWELL R.N.;SHADDUCK

P.;.Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing

determinant.**Science**. (4971) 932-935.1990

LASKUS T.;RADKOWSKI M.;PIASEK A.;NOWICKI M.;HORBAN A.;CIANCIARA

J.;RAKELA J.Hepatitis C virus in lymphoid cells of patients coinfecting with human

immunodeficiency virus type 1: evidence of active replication in

monocytes/macrophages and lymphocytes.**J.Infect.Dis**. (2) 442-448.2000

LEVY J.A.;HOFFMAN A.D.;KRAMER S.M.;LANDIS J.A.;SHIMABUKURO

J.M.;OSHIRO L.S.Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.**Science.** (4664) 840-842.1984

LIFSON J.D.;FEINBERG M.B.;REYES G.R.;RABIN L.;BANAPOUR B.;CHAKRABARTI

S.;MOSS B.;WONG-STAAAL F.;STEIMER K.S.;ENGLEMAN E.G.Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein.**Nature.** (6090) 725-728.1986

MINISTÉRIO DA SAÚDE.Boletim Epidemiológico DST/AIDS 2006

MINISTÉRIO DA SAUDE.MINISTÉRIO DA

SAÚDE.<http://www.aids.gov.br/main.asp?ViewID=%7BDA56F374%2D128A%2D40FB%2DB16F%2DD08A1F5DD07B%7D¶ms=itemID=%7B33C5964A%2D243F%2D43D7%2D9714%2D2FAE442E24FC%7D;&UIPartUID=%7BD90F22DB%2D05D4%2D4644%2DA8F2%2DFAD4803C8898%7D>. 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE.MINISTÉRIO DA

SAÚDE.<http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS93CBC49EPTBRIE.htm>. 2007

MONGA H.K.;RODRIGUEZ-BARRADAS M.C.;BREAUX K.;KHATTAK K.;TROIISI

C.L.;VELEZ M.;YOFFE B.Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection.**Clin.Infect.Dis.** (2) 240-247.2001

- MORSICA G.;BAGAGLIO S.;GHEZZI S.;LODRINI C.;VICENZI E.;SANTAGOSTINO E.;GRINGERI A.;CUSINI M.;CARMINATI G.;BIANCHI G.;GALLI L.;LAZZARIN A.;POLI G.Hepatitis C virus (HCV) coinfection in a cohort of HIV positive long-term non-progressors: possible protective effect of infecting HCV genotype on HIV disease progression.**J.Clin.Virol.** (2) 82-86.2007
- MURILLAS J.;DEL R.M.;RIERA M.;VAQUER P.;SALAS A.;LEYES M.;ANGELES R.M.;PENARANDA V.M.;VILLALONGA C.Increased incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) in HIV-1 infected patients.**Eur.J.Intern.Med.** (2) 113-115.2005
- MUSSI A.D.;PEREIRA R.A.;CORREA E SILVA VDE;MARTINS R.M.;SOUTO F.J.Epidemiological aspects of hepatitis C virus infection among HIV-infected individuals in Mato Grosso State, Central Brazil.**Acta Trop.** (2-3) 116-121.2007
- MYERS G.J.;LANDYMORE R.W.;LEADON R.B.;SQUIRES C.Fracture of the internal lumen of a Datascope Percor Stat-DL Balloon, resulting in stroke.**Ann.Thorac.Surg.** (5) 1335-1337.1994
- NEEFE J.R.;NORRIS R.F.;RINEHOLD J.G.;MITCHELL C.B.;HOWELL D.S.Carriers of hepatitis virus in the blood and viral hepatitis in whole blood recipients. I. Studies on donors suspected as carriers of hepatitis virus and as sources of post-transfusion viral hepatitis.**J.Am.Med.Assoc.** (13) 1066-1071.1954
- OHTO H.;TERAZAWA S.;SASAKI N.;SASAKI N.;HINO K.;ISHIWATA C.;KAKO M.;UJIE N.;ENDO C.;MATSUI A.;Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group.**N.Engl.J.Med.** (11) 744-750.1994

- PAN P.L.;LIU Z.;ZHANG Y.H.;LONG X.S.;WU H.;JIANG Y.[Study on the influence of biological characteristics to HIV/HCV co-infection among HIV infected illegal blood donors in China].**Zhonghua Liu Xing.Bing.Xue.Za Zhi.** (6) 589-592.2007
- PEREIRA G.A.;STEFANI M.M.;MARTELLI C.M.;TURCHI M.D.;SIQUEIRA E.M.;CARNEIRO M.A.;MARTINS R.M.Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil.**J.Med.Virol.** (6) 719-723.2006
- PILERI P.;UEMATSU Y.;CAMPAGNOLI S.;GALLI G.;FALUGI F.;PETRACCA R.;WEINER A.J.;HOUGHTON M.;ROSA D.;GRANDI G.;ABRIGNANI S.Binding of hepatitis C virus to CD81.**Science.** (5390) 938-941.1998
- RAMOS B.;NUNEZ M.;TORO C.;SHELDON J.;GARCIA-SAMANIEGO J.;RIOS P.;SORIANO V.Changes in the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes over time in Spain according to HIV serostatus: implications for HCV therapy in HCV/HIV-coinfected patients.**J.Infect.** (2) 173-179.2007
- RATNER L.;GALLO R.C.;WONG-STAAAL F.HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus.**Nature.** (6004) 636-637.1985
- ROBERTSON B.;MYERS G.;HOWARD C.;BRETTIN T.;BUKH J.;GASCHEN B.;GOJOBORI T.;MAERTENS G.;MIZOKAMI M.;NAINAN O.;NETESOV S.;NISHIOKA K.;SHIN I T.;SIMMONDS P.;SMITH D.;STUYVER L.;WEINER A.Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy.**Arch.Virol.** (12) 2493-2503.1998

- ROSS R.S.;VIAZOV S.O.;HOLTZER C.D.;BEYOU A.;MONNET A.;MAZURE C.;ROGGENDORF M.Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing.**J.Clin.Microbiol.** (10) 3581-3584.2000
- RUBIO C.M.;RUBIO R.C.;NOGUES B.A.;MANONELLES F.A.[Epidemiology of chronic hepatitis C virus in patients infected by human immunodeficiency virus. Study of 767 patients].**Med.Clin.(Barc.)**. (2) 56-58.2005
- SEAL K.H.;MONTO A.;DOVE L.;SHEN H.;VITTINGHOFF E.;TRACY D.;MILLER E.;LAU E.;WRIGHT T.L.The association of human immunodeficiency virus infection with spontaneously resolved hepatitis C virus infection and level of viremia among injection drug users.**Dig.Dis.Sci.** (12) 3423-3430.2007
- SEGURADO A.C.;BRAGA P.;ETZEL A.;CARDOSO M.R.Hepatitis C virus coinfection in a cohort of HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors.**AIDS Patient.Care STDS.** (3) 135-143.2004
- SHEA D.O.;TUIITE H.;FARRELL G.;CODD M.;MULCAHY F.;NORRIS S.;BERGIN C.Role of rapid virological response in prediction of sustained virological response to Peg-IFN plus ribavirin in HCV / HIV co-infected individuals.**J.Viral Hepat.** 2008
- SILVA L.K.;PARANA R.;SOUZA S.P.;BERBY F.;KAY A.;TREPO C.;SANTANA N.;COTRIM H.;LYRA L.G.;REIS M.G.Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil.**Am.J.Trop.Med.Hyg.** (2) 257-260.2000
- SIMMONDS P.Variability of the hepatitis C virus genome.**Curr.Stud.Hematol.Blood Transfus.** (62) 38-63.1998

SORIANO V.;GARCIA-SAMANIEGO J.;RODRIGUEZ-ROSADO R.;GONZALEZ

J.;PEDREIRA J.Hepatitis C and HIV infection: biological, clinical, and therapeutic implications.**J.Hepatol.** 119-123.1999a

SORIANO V.;RODRIGUEZ-ROSADO R.;GARCIA-SAMANIEGO J.Management of

chronic hepatitis C in HIV-infected patients.**AIDS.** (5) 539-546.1999b

SOTO B.;SANCHEZ-QUIJANO A.;RODRIGO L.;DEL OLMO J.A.;GARCIA-

BENGOECHEA M.;HERNANDEZ-QUERO J.;REY C.;ABAD M.A.;RODRIGUEZ

M.;SALES G.M.;GONZALEZ F.;MIRON P.;CARUZ A.;RELIMPIO

F.;TORRONTERAS R.;LEAL M.;LISSEN E.Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis.**J.Hepatol.** (1) 1-5.1997

STEIGMANN F.;HYMAN S.;GOLDBLOOM R.Infectious hepatitis (homologous serum

type) in drug addicts.**Gastroenterology.** (4) 642-646.1950

SULKOWSKI M.S.;MAST E.E.;SEEFF L.B.;THOMAS D.L.Hepatitis C virus infection as an

opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency

virus.**Clin.Infect.Dis.** S77-S84.2000

TAKEDA A.;TUAZON C.U.;ENNIS F.A.Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc

receptor-mediated entry.**Science.** (4878) 580-583.1988

TEDALDI E.M.;BAKER R.K.;MOORMAN A.C.;ALZOLA C.F.;FURHRER J.;MCCABE

R.E.;WOOD K.C.;HOLMBERG S.D.Influence of coinfection with hepatitis C virus

on morbidity and mortality due to human immunodeficiency virus infection in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clin.Infect.Dis.** (3) 363-367.2003

THOMSEN R.;BONK S.;PROPFE C.;HEERMANN K.H.;KOCHEL H.G.;UY

A.Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. **Med.Microbiol.Immunol.** (5) 293-300.1992

VAN A.L.;PRINS M.Infection with concurrent multiple hepatitis C virus genotypes is associated with faster HIV disease progression. **AIDS.** (17) 2319-2324.2004

VANDEN H.M.;DECOURT J.L.;DE LEYS R.J.;VANDERBORGHT B.;VAN DER

G.G.;VAN H.H.;SAMAN E.Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. **J.Virol.** (3) 1586-1596.1994

WU L.;GERARD N.P.;WYATT R.;CHOE H.;PAROLIN C.;RUFFING N.;BORSETTI

A.;CARDOSO A.A.;DESJARDIN E.;NEWMAN W.;GERARD C.;SODROSKI J.CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. **Nature.** (6605) 179-183.1996

YOO T.W.;DONFIELD S.;LAIL A.;LYNN H.S.;DAAR E.S.Effect of hepatitis C virus (HCV) genotype on HCV and HIV-1 disease. **J.Infect.Dis.** (1) 4-10.2005

ZIGNEGO A.L.;BRECHOT C.Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. **J.Hepatol.** (2) 369-376.1999

APÊNDICES

APÊNDICE 1



Universidade Federal da Bahia
Hospital Universitário Prof. Edgard Santos
Laboratório de Pesquisa em Infectologia
Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
Tel.: (71) 3339-6210 FAX: (71) 3247-2756

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Protocolo de Pesquisa

A. Propósito e Revisão Geral

Os pesquisadores Carlos Brites e André Ramos do Hospital Universitário Professor Edgard Santos estão desenvolvendo uma pesquisa para caracterizar o Vírus da Hepatite C (HCV) em pacientes portadores do Vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV) na cidade de Salvador, Bahia. A hepatite C nos países desenvolvidos alcança uma prevalência de 1 a 2% de infectados na população total. No Brasil, este índice aponta um percentual de positividade de 1,2%, com taxa de incidência de 9,6 por 100.000 habitantes, atingindo cerca de 3 milhões de portadores em estágio crônico da doença. Este estudo pode fornecer informações importantes sobre características genotípicas da infecção pelo HCV e sua relação com o HIV, auxiliando no tratamento dos pacientes.

A. Procedimentos

Caso concorde em participar desta pesquisa terei uma amostra 10mL, aproximadamente 4 colheres de sopa, do meu sangue colhida através de punção venosa, utilizando material estéril, para a realização do exame que irá caracterizar o subtipo do HCV.

B. Riscos e Desconfortos

Nenhuma intervenção ameaçadora da integridade dos pacientes será feita. Somente a retirada do sangue, cujo risco inclui desconforto temporário da picada de agulha e queimor, raramente hematoma e infecção. As medidas habituais para coleta de sangue serão tomadas para que isso não aconteça.

C. Benefícios

Este estudo não prevê benefícios diretos para você. No entanto, espero que as informações provenientes deste, ajudem no tratamento de futuros pacientes.

D. Custos

Não haverá nenhum custo relacionado à participação no estudo. Desta forma, não pagarei por nenhum procedimento usado nessa triagem. Da mesma forma, não pagarei pelos exames que serão feitos já que parte dos mesmos são proporcionados pela própria instituição responsável.

E. Reembolso

Não receberei nenhum reembolso por participar nesse protocolo de pesquisa.

F. Questões

Recebi informações suficientes para participar deste estudo, explicada por _____, e quaisquer de minhas perguntas me foram respondidas. Caso tenha alguma dúvida a respeito desta pesquisa devo entrar em contato com André Ramos ou Dr. Carlos Brites no número (71) 339-6210.

G. Consentimento

Eu não tenho nenhuma obrigação de contribuir para este estudo, podendo desistir a qualquer momento sem qualquer prejuízo futuro. MINHA PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA. Eu recebi uma cópia deste consentimento.

Caso concorde em participar deste protocolo de pesquisa, devo assinar abaixo:

Data

Paciente

Data

Pessoa que obteve o consentimento

Data

Testemunha

APÊNDICE 2



Universidade Federal da Bahia
Hospital Universitário Prof. Edgard Santos
Laboratório de Pesquisa em Infectologia

Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
 Tel.: (71) 3339-6210 FAX: (71) 3247-2756

“Projeto de Genotipagem para HCV”

Identificação

1. Nome _____
2. Apelido _____
3. Data de Nascimento ____/____/____
4. Idade |__|__|
5. Sexo (M) (F)
6. Endereço _____

7. Ponto de Referência _____
8. Telefones _____
9. Telefone de vizinho/amigo _____

Ficha Epidemiológica

Nos últimos 6 meses você:

1. Recebeu transfusão de sangue ou derivados? (S) (N) (NS)
2. Qual a sua atividade sexual?
() homens () mulheres () homens e mulheres () não tem
3. Quantos parceiros você teve nos últimos 6 meses?
() 1 () 2 a 3 () 3 a 5 () 5 a 10 () mais de 10
4. Desses algum era garoto ou garota de programa? (S) (N) (NS)
5. Já usou droga na veia? (S) (N) (NS)
6. Já teve alguma doença sexualmente transmissível? (S) (N) (NS)
Qual? _____
7. Você já se feriu com algum instrumento que pudesse estar contaminado com sangue ou secreção? (S) (N) (NS)
Quando? _____
8. Já teve relação sexual com portador do vírus HIV? (S) (N) (NS)
Quando? _____
9. Já teve relação sexual com usuários de drogas IV? (S) (N) (NS)
Quando? _____
10. Usa camisinha nas relações sexuais? (sempre) (às vezes) (nunca)
11. Fez uso freqüente de bebida alcoólica? (S) (N)
Quando? _____ Quanto? _____

Avaliação Laboratorial

1. Resultado do Anti-HCV? (Pos) (Neg)
2. Resultado do Anti-HBC? (Pos) (Neg)
3. Resultado do Anti-HTLV? (Pos) (Neg)
4. Faz tratamento para HCV? (S) (N)
Qual? _____
5. Última dosagem de ALT (Alanina Amino-Transferase)?
Data: _____ Valor: _____
- 6. Última carga viral para HCV?**
Data: _____ Valor: _____
7. Resultado do Anti-HIV? (Pos) (Neg)
8. Faz tratamento para HIV? (S) (N)
Qual? _____
9. Última carga viral para HIV?
Data: _____ Valor: _____
10. Última contagem de células CD4?
Data: _____ Valor: _____

Observações Complementares:

FICHA CATALOGRÁFICA

R175 Ramos, André Maurício Costa,
Avaliação da Prevalência dos Subtipos do Vírus da Hepatite
C em
Pacientes Portadores do Vírus da Síndrome da Imunodeficiência
Humana
Adquirida /André Maurício Costa . – Salvador: [s.n.], 2008.
xvii, 64f. : il.

Orientador: Professor Carlos Brites.

Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) Instituto
de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e
Instituto de Ciências
da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

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](#)