

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**CINÉTICA DE CARGA VIRAL EM COMPONENTES DO SANGUE
DE PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C,
ANTES E DURANTE TERAPIA TRIPLA**

por

Jordana Rodrigues Barbosa Fradico

Belo Horizonte

2017

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

J.R.B.FRADICO

2017

JORDANA RODRIGUES BARBOSA FRADICO

**CINÉTICA DE CARGA VIRAL EM COMPONENTES DO SANGUE
DE PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C,
ANTES E DURANTE TERAPIA TRIPLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Andréa Teixeira de Carvalho

Coorientação: Marina de Moraes Mourão

Belo Horizonte
2017

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do IRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F799c Fradico, Jordana Rodrigues Barbosa.

2017

Cinética de carga viral em componentes do sangue de pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C, antes e durante terapia tripla / Jordana Rodrigues Barbosa Fradico. – Belo Horizonte, 2017.

XXIV, 149 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 136 -157

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Hepatite C/terapia 2. Hepacivirus/patogenicidade 3. Carga viral/instrumentação I. Título. II. Carvalho, Andréa Teixeira de (Orientação). III. Mourão, Marina de Moraes (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.362 3

JORDANA RODRIGUES BARBOSA FRADICO

**CINÉTICA DE CARGA VIRAL EM COMPONENTES DO SANGUE
DE PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C,
ANTES E DURANTE TERAPIA TRIPLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Andréa Teixeira de Carvalho

Coorientação: Marina de Moraes Mourão

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR – FIOCRUZ/ MG) Orientadora/
Presidente

Prof^a. Dr^a. Rosiane Aparecida da Silva Pereira (IRR – FIOCRUZ/ MG) Titular

Prof^a. Dr^a. Fernanda Freire Campos Nunes (UFMG) Titular

Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (IRR – FIOCRUZ/ MG) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 12 / 04 / 2017

Dedico este trabalho à minha pérola, minha família:

meus pais, Antônio e Silvana

minha irmã Bárbara e cunhado Rodrigo,

e meu grande amor, Daniel.

Essa vitória é NOSSA!

AGRADECIMENTOS

No tempo presente, sigo o caminho em direção a um futuro de desafios e descobertas. Sigo guiada pela memória de um passado de ensinamentos e referências. Assim, frente aos desafios desconhecidos, almejo construir o verdadeiro paradigma científico, contribuindo na construção do real saber, diante da grande incógnita da realidade científica, humana e experimental. Por isso agradeço...

À Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho que, como orientadora, delineou os passos a serem seguidos, mostrando-me os verdadeiros princípios experimentais e humanos para a construção do saber. Levarei por toda a minha caminhada a oportunidade, confiança, apoio, incentivo e o grande crescimento científico e profissional a mim dispensado nesta trajetória. Sinto-me lisonjeada por concluir esta etapa da minha formação científica sob sua orientação, pesquisadora de tamanha excelência.

À Dr^a. Marina de Moraes Mourão que, como coorientadora, compartilhou seus conhecimentos, experiências que muito contribuíram para o enriquecimento deste estudo. Obrigada pela disponibilidade e motivação.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela gentileza de me conceder o privilégio de pertencer a um importante grupo de pesquisa: Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB). Obrigada pela confiança e pelo exemplo de sabedoria e dedicação.

À Dr^a. Danielle Zauli, minha eterna gratidão por me ajudar a dar o primeiro passo desta conquista, por todos os ensinamentos, incentivos, apoio e conversas. O meu muito obrigada por enriquecer imensamente os meus conhecimentos em Biologia Molecular... muito eu devo a você!

À Dr^a. Samantha Béla pela colaboração no projeto.

À Giovanna Bauer Valério, primeira aluna de iniciação científica sob minha coorientação, uma experiência maravilhosa e de grande aprendizado. Obrigada pela ajuda nos experimentos, dedicação, amizade e carinho.

Ao Sandro Luciano Ferreira Pinho, aluno de iniciação científica, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

À Jucélia pela disponibilidade e carinho.

Ao corpo técnico do GIPB: Heloísa, Bárbara, Ludmila e Raiany pela disponibilidade, apoio e carinho.

Ao corpo técnico da Plataforma de Citometria de Fluxo da Fiocruz: Bruna, Lorena e Tiza.

A todos os colegas do GIPB pela convivência e ensinamentos.

À Plataforma de PCR em Tempo Real do IRR por fornecer a estrutura necessária para a realização dos experimentos. Agradeço à Fernanda pela disponibilidade.

À assessoria científica da empresa Abbott Molecular.

À Dr^a. Rosângela Teixeira por abrir as portas do Ambulatório de Hepatites Virais, pela grande colaboração ao projeto e pelo exemplo de empenho e dedicação aos pacientes.

Aos colegas do Ambulatório de Hepatites Virais pela convivência e pelo trabalho de cuidado e atenção aos pacientes.

Aos pacientes que participaram deste estudo pela colaboração, disponibilidade, persistência e por compartilhar inúmeras experiências e aprendizado humano.

À diretora do Instituto René Rachou, Dra. Zélia Profeta da Luz.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto René Rachou pela oportunidade ofertada.

Ao Programa, professores e funcionários da Pós-graduação em Ciências da Saúde.

À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma. Agradeço à Núzia e Segemar pela disponibilidade.

Aos órgãos financiadores: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), fundamentais para a realização deste trabalho.

À banca examinadora pela disponibilidade e contribuição na qualidade deste trabalho.

À Profa. Dr^a. Rafaela Salgado Ferreira que, como orientadora na iniciação científica, depositou em mim confiança e me incentivou a prosseguir na carreira científica.

Aos amigos da FUNED pela amizade, força e aprendizado.

Às minhas amigas “Divas Quase Doutoradas”, algumas já doutoras, pós-doutoras... Muito obrigada por todos os momentos vividos, conselhos, carinho e motivação. Me orgulho de fazer parte desse grupo de amizade (mesmo não sendo uma ‘quase doutora’ kkk).

Aos colegas da turma de pós graduação, em especial às minhas amigas Mariana e Natália pelos momentos compartilhados, companheirismo, força, conversas e carinho.

À minha amiga Isabela Gomes Ribeiro pela confiança, apoio, conversas e pelo exemplo de força, dedicação e profissionalismo. Muito obrigada amiga por eu sempre poder contar com você.

À minha grande amiga Renata, muito obrigada por todos os momentos, viagens, risos, choros, confiança e, principalmente, pela amizade maravilhosa... Obrigada por tudo amiga linda!

Aos meus eternos mestres, meus pais Antônio e Silvana, que sempre irradiaram amor incondicional e que, através de sabedoria e dedicação, transmitiram valores essenciais para a conquista desta vitória. Muito obrigada pela família linda que vocês construíram, da qual tenho muito orgulho de pertencer!

À minha irmã, amiga e confidente, Bárbara. Agradeço por compartilhar momentos inesquecíveis, por sempre estar ao meu lado me apoiando, motivando, ensinando... Você é meu exemplo de dedicação e persistência. Muito obrigada!

Ao amor de todas as minhas vidas, Daniel. Obrigada por compartilhar sonhos, momentos especiais, conversas, companheirismo, carinho, apoio, incentivo, compreensão... Você me fortalece. Muito obrigada!

Ao meu cunhado Rodrigo pelo carinho, convivência e torcida.

A meu avô Antônio, meu guia e protetor que tanto amo e admiro, por sempre orientar a minha caminhada.

À vovó Madalena pelo amor, dedicação, cuidado e carinho que sempre teve por mim com seu jeito sereno e sábio de ser.

À minha madrinha Cleonice por todo o apoio, conselhos e ensinamentos.

A todos os meus familiares Rodrigues Barbosa por sempre torcerem por mim.

A todos da família Fradico pela amizade, risos, acolhimento e momentos que passamos juntos.

A todos da família Guimarães Almeida pelo apoio e carinho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a construção e conquista deste sonho.

A Deus dedico esta vitória que, como Autor da Vida, possibilitou a construção da trajetória que agora culmina na concretização de um sonho.

“SOU FEITA DE RETALHOS

Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que vou costurando na alma. Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas me acrescentam e me fazem ser quem eu sou. Em cada momento, em cada contato, vou ficando maior... Em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma saudade... que me tornam mais pessoa, mais humana, mais completa. E penso que é assim mesmo que a vida se faz de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também. E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados... haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma. Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com os retalhos deixados em mim. Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte de suas histórias. E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado de ‘nós’.”

Cris Pizzimenti

A todos vocês meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão.

RESUMO

A hepatite C é um grave problema de saúde pública mundial, causada pelo vírus da hepatite C (VHC). Apesar dos hepatócitos serem o alvo principal do VHC, o vírus pode ainda interagir com monócitos, linfócitos, células endoteliais, eritrócitos e plaquetas. Neste contexto o presente estudo buscou avaliar a cinética viral em componentes do sangue de pacientes sintomáticos cronicamente infectados pelo VHC, antes e durante a terapia tripla (interferon-peguilado/ribavirina e inibidor de protease). Com esta finalidade, os seguintes objetivos específicos foram propostos para a população avaliada: otimizar uma metodologia in house para adaptação do kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA) para a execução da quantificação da carga viral de VHC em soro, sangue total, eritrócitos, plaquetas e leucócitos; quantificar a carga viral de VHC nesses componentes sanguíneos; associar e correlacionar a carga viral de VHC com dados laboratoriais dos pacientes antes e durante terapia tripla. Os objetivos foram cumpridos pela execução da metodologia de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o kit *Abbott RealTime HCV*[®]. Dessa maneira avaliou-se amostras de componentes sanguíneos de 20 pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica, infectados pelo VHC genótipo 1. Esta população de estudo apresentou perfis epidemiológicos e clínico-laboratoriais semelhantes aos descritos na literatura. Obteve-se otimização do kit *Abbott RealTime HCV*[®] para quantificação do RNA-VHC em condições de pesquisa e aumentou-se em 4 vezes o número de reações por kit, resultando em uma economia financeira considerável. A análise da quantificação da carga viral foi realizada por quatro variáveis, sendo elas: tempo de tratamento, componente sanguíneo, níveis da carga viral e desfecho clínico. Em todas, observou-se que o soro foi o componente com maiores níveis de carga viral e as hemácias com menor nível. Durante a terapia tripla, houve redução dos níveis de cargas virais em todos os componentes sanguíneos analisados. Esta redução só não foi observada na 24^a semana de tratamento, quando houve aumento das cargas virais, quando comparado com a quarta semana. Estes níveis apresentaram queda na 48^a semana sem, no entanto, atingir carga nula no soro, sangue total, hemácias e plaquetas. Positividade que não foi capaz de alterar o desfecho clínico dos pacientes, que se mantiveram apresentando resposta virológica sustentada (RVS). A concretização deste estudo demonstrou que pacientes infectados pelo VHC cronicamente apresentaram altas cargas de VHC associadas aos componentes sanguíneos. O tratamento medicamentoso da infecção apresentou-se eficiente e efetivo, provocando uma alteração na cinética de interação do vírus com os componentes sanguíneos. O aumento das cargas virais na 24^a semana é um indicativo de que esta é uma semana crítica na terapia tripla, que merece maior atenção dos profissionais de saúde. A constatação de baixas cargas virais no soro, sangue total, hemácias e plaquetas na 48^a semana da terapia foi um resultado surpreendente do estudo, visto que 85,7% dos pacientes obtiveram RVS. Sugere-se a continuidade de estudos que aprofundem pontos importantes evidenciados por este trabalho. Os resultados obtidos proporcionaram um entendimento maior da fisiopatologia do processo e da interação do VHC com os componentes do sangue.

Palavras-chave: Hepatite C, VHC, Carga viral, Interação VHC-componentes do sangue, RT-qPCR.

ABSTRACT

Hepatitis C is a serious global public health problem, caused by the hepatitis C virus (HCV). Although hepatocytes are the major target of HCV, the virus may still interact with monocytes, lymphocytes, endothelial cells, erythrocytes, and platelets. In this context, the present study sought to evaluate viral kinetics in blood components of patients chronically infected with HCV before and during triple therapy (pegylated interferon/ ribavirin and protease inhibitor). The following specific objectives were proposed: to optimize an in-house methodology for the adaptation of the *Abbott RealTime HCV*[®] kit (Abbott Molecular, USA) for the quantification of HCV viral load in serum, whole blood, erythrocytes, platelets and leukocytes; to quantify the HCV load in these blood components; to associate and correlate HCV load with laboratorial data of patients before and during triple therapy. The objectives were met by the implementation of the reverse transcription methodology followed by real-time PCR (RT-qPCR) using the *Abbott RealTime HCV*[®] kit. Using this approach, peripheral blood samples from 20 patients with a confirmed diagnosis of chronic hepatitis C, infected by HCV genotype 1, were analyzed. This study population presented epidemiological and clinical-laboratorial profiles similar to those described in the literature. *Abbott RealTime HCV*[®] kit was optimized for HCV RNA quantification in research conditions and increased the number of reactions per kit in 4 times. The analysis of the viral load was performed by four variables: treatment time, blood component, viral load levels and clinical outcome. In all of them, it was observed that serum was the component with the highest levels of viral load and the red cells with the lowest level. During triple therapy, there was a reduction in levels of viral loads in all blood components analyzed. This reduction was not observed at 24th week of treatment, when viral loads increased when compared to the fourth week. At 48th week, the viral load levels were decreased without, however, reaching zero load in serum, whole blood, red blood cells and platelets. This persistent positivity was not able to change the clinical outcome of the patients, who maintained a sustained virological response (SVR). The achievement of this study demonstrated that HCV chronically infected patients present high HCV loads associated with blood components. The drug treatment of the infection was efficient and effective, causing a change in the kinetics of virus interaction in the blood components. The increase in viral load at 24th week is indicative that this is a critical week in triple therapy, which deserves more attention from health professionals. Low viral load in serum, whole blood, red blood cells and platelets at 48th week of therapy was a surprising result of the study, since 85.7% of the patients obtained SVR. This finding suggests that additional studies could improve the understanding of the mechanisms responsible for the blood components-HCV interaction during the viral infection.

Key words: Hepatitis C, HCV, Viral load, HCV-blood components interaction, RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Representação esquemática da estrutura da partícula do vírus da hepatite C	30
Figura 02.	Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite C	30
Figura 03.	Distribuição da prevalência global da hepatite C	39
Figura 04.	Evolução dos marcadores bioquímicos e sorológicos durante o curso da infecção pelo vírus da hepatite C	42
Figura 05.	Vírus da hepatite C associado ao hepatócito	44
Figura 06.	Vírus da hepatite C associado aos componentes sanguíneos	45
Figura 07.	Fluxograma das principais etapas de obtenção das amostras	67
Figura 08.	Demonstração dos componentes sanguíneos após centrifugação do sangue total	70
Figura 09.	Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes de iniciar o tratamento – abordagem por tempo	88
Figura 10.	Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta das semanas 2, 4, 24 e 48 de tratamento – abordagem por tempo	89
Figura 11.	Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta – abordagem por componente sanguíneo em função dos percentuais de representatividade das amostras positivas para o VHC	92
Figura 12.	Análise da distribuição da carga viral no soro e no sangue total antes da terapia tripla	94
Figura 13.	Análise da distribuição da carga viral no soro e nas hemácias antes da terapia tripla	95
Figura 14.	Análise da distribuição da carga viral no soro e nas plaquetas antes da terapia tripla	97
Figura 15.	Análise da distribuição da carga viral no soro e nos leucócitos antes da terapia tripla	98

Figura 16.	Diagrama bidimensional da cinética de magnitude da carga viral nos componentes sanguíneos durante a terapia tripla	100
Figura 17.	Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes de iniciar a terapia tripla, na 2 ^a e 4 ^a semanas após início do tratamento – abordagem por desfecho clínico ..	103
Figura 18 -	Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes de iniciar a terapia tripla, na 2 ^a , 4 ^a e 24 ^a semanas após início do tratamento – comparação dos grupos com RVS e Não Respondedor Parcial – abordagem por desfecho clínico	105
Figura 19 -	Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de leucócitos nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla	107
Figura 20 -	Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de hemácias nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla	109
Figura 21 -	Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de hemoglobina nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla	110
Figura 22 -	Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de plaquetas nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla	111
Figura 23 -	Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de ALT nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla	113
Figura 24 -	Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de AST nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla	115

Figura 25 - Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de Gama GT nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla 117

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01.	Curva de amplificação do material genético do VHC e Controle Interno	82
Gráfico 02.	Curva-padrão obtida pela diluição seriada (1:10) do Controle Positivo Alto presente no kit <i>Abbott RealTime HCV Control</i> [®] (Abbott Molecular, EUA), composta por 6 pontos, em triplicata	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 01.	Caracterização dos agentes etiológicos associados a quadros de hepatites virais	27
Quadro 02.	Critérios de resposta virológica para avaliação do tratamento	52
Quadro 03.	Escore METAVIR para estadiamento da fibrose hepática	54
Quadro 04.	Escore de Child-Pugh	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Características epidemiológicas e clínico-laboratoriais apresentadas pelos pacientes com infecção crônica pelo VHC avaliados durante o estudo, antes do início da terapia tripla	78
Tabela 02.	Aspectos laboratoriais apresentados pelos pacientes com infecção crônica pelo VHC em uso de terapia tripla	81
Tabela 03.	Dados da amplificação das reações teste de adequação do kit Abbott RealTime HCV® (Abbott Molecular, EUA)	83
Tabela 04.	Dados da curva-padrão – VHC	86
Tabela 05.	Correlação estatística entre as variáveis carga viral e tempo de tratamento com a terapia tripla	93
Tabela 06.	Desfecho clínico após terapia tripla de pacientes com infecção crônica pelo VHC, avaliados durante o estudo	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHEV	- Ambulatório de Hepatites Virais
ALT	- Alanina aminotransferase
anti-VHC	- Anticorpos contra o vírus da hepatite C
AST	- Aspartato aminotransferase
AT	- Antes do tratamento
bDNA	- <i>Branched-DNA</i>
C++	- Controle Positivo Alto
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cDNA	- DNA complementar
CBER	- <i>Center for Biologics Evaluation and Research</i>
CHC	- Carcinoma hepatocelular
COEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
Ct	- <i>Cycle threshold</i>
DAA	- Agentes Antivirais Diretos
dL	- Decilitro
DNA	- <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
Dr(a).	- Doutor (a)
E	- Proteínas do envelope do VHC
EDTA	- <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	- Estados Unidos da América
F0	- Ausência de fibrose

F1	- Expansão fibrosa portal sem septos
F2	- Expansão fibrosa com raros septos
F3	- Expansão fibrosa com numerosos septos, sem cirrose
F4	- Cirrose
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
g	- Grama
x g	- Força G: Força Gravitacional ou RCF: Força Centrífuga Relativa
Gama GT	- Gama-glutamilttransferase
HC	- Hospital das Clínicas
HCV	- <i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i> - Vírus da Imunodeficiência Humana
IAG	- Instituto Alfa de Gastroenterologia
IC	- Controle Interno
IFN	- Interferon
IFN-α	- Interferon alfa
IP	- Inibidores de protease
IRR	- Instituto René Rachou
L	- Litro
LEP	- <i>Laboratory of Emerging Pathogens</i>
μL	- Microlitro
μmol	- Micromol
MG	- Minas Gerais
MGB	- <i>Minor Groove Binder</i>

mL	- Mililitro
MP-NAT	- Mini-pools <i>Nucleic Acid Testing</i> - mini-pools de ácido nucléico
mRNA	- RNA mensageiro
n°	- Número
NFQ	- <i>Quencher</i> sem fluorescência
nm	- Nanômetro
NS	- Proteína não-estrutural do VHC
OMS	- Organização Mundial de Saúde
p	- Coeficiente de correlação populacional
p7	- Proteína 7 do VHC
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão fosfato-salino
PCDT	- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PEG-IFNα	- Interferon-alfa-peguilado
PPP	- Plasma Pobre em Plaquetas
PR	- PEG-IFN α /RBV
Prof.(^a)	- Professor (a)
PRP	- Plasma Rico em Plaquetas
qPCR	- <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> ou <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou Reação em cadeia da polimerase em tempo real
R²	- Coeficiente de correlação
RBV	- Ribavirina
RNA	- <i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico

RNase	- Ribonuclease
RNI	- Razão Normalizada Internacional
RT-qPCR	- <i>Reverse Transcription</i> - qPCR -- Transcrição Reversa - qPCR
RVF	- Resposta Viroológica ao Final do Tratamento
RVP	- Resposta Viroológica Precoce
RVR	- Resposta Viroológica Rápida
RVS	- Resposta Viroológica Sustentada
SIDA	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Sr(a).	- Senhor(a)
SUS	- Sistema Único de Saúde
T2	- Segunda semana de tratamento
T4	- Quarta semana de tratamento
T24	- Vigésima quarta semana de tratamento
T48	- Quadragésima oitava semana de tratamento
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
UI	- Unidades Internacionais
US	- United States
UTR	- <i>Untranslated Region</i> – Região não traduzida
VHB	- Vírus da hepatite B
VHC	- Vírus da hepatite C
WHO	- <i>World Health Organization</i>
WNV	- <i>West Nile virus</i> - Vírus Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Histórico das hepatites virais	25
1.2	Vírus da hepatite C	29
1.3	Hepatite C	37
1.3.1	Epidemiologia da hepatite C	38
1.3.2	Fatores de Risco e Transmissão	39
1.3.3	Aspectos clínico-laboratoriais	41
1.3.4	Associação do VHC a componentes do sangue	44
1.3.5	Diagnóstico	47
1.3.5.1	Diagnóstico Sorológico	47
1.3.5.1.1	Testes rápidos	47
1.3.5.1.2	Imunoensaio	48
1.3.5.2	Diagnóstico molecular	48
1.3.5.2.1	Genotipagem	50
1.3.5.3	Biópsia Hepática	51
1.3.6	Tratamento	51
1.3.7	Profilaxia	57
1.3.8	Resposta Imune	58
1.3.8.1	Plaquetas e Sistema Imune	60
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	63
3	OBJETIVOS	65
3.1	Objetivo Geral	65

3.2	Objetivos específicos	65
4	METODOLOGIA	66
4.1	Caracterização da população avaliada	66
4.2	Procedimentos éticos	67
4.2.1	CrITÉRIOS de inclusão	67
4.2.2	CrITÉRIOS de exclusão	68
4.3	Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais	68
4.3.1	Hemograma	68
4.3.2	Dosagem de enzimas hepáticas	69
4.4	Quantificação da carga viral	69
4.4.1	Obtenção dos componentes sanguíneos	69
4.4.2	Extração do RNA total	72
4.4.3	PCR em Tempo Real – One Step	74
4.5	Análise estatística dos dados	77
5	RESULTADOS	78
5.1	Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais antes da terapia tripla	78
5.2	Teste de adequação do kit <i>Abbott RealTime HCV</i>[®] (Abbott Molecular, EUA)	82
5.3	Curva Padrão	84
5.4	Análise dos dados da quantificação da carga viral	87
5.4.1	Abordagem por tempo	87
5.4.2	Abordagem por componente sanguíneo	91
5.4.3	Abordagem por magnitude da carga viral	93

5.4.4	Abordagem por desfecho clínico	101
5.4.5	Correlação entre a carga viral e aspectos laboratoriais	106
6	DISCUSSÃO	119
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
8	CONCLUSÃO	135
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
	ANEXOS	158
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE	158
	ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP	167

1 INTRODUÇÃO

A expectativa que prevaleceu durante a maior parte do século XX foi que as doenças transmissíveis estavam sendo efetivamente controladas. Nos anos noventa, no entanto, estas doenças foram estabelecidas, novamente, como uma prioridade de saúde em nível mundial. O evento decisivo para a revisão dessa perspectiva foi o estabelecimento da pandemia da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). No entanto, outros fatores, dentre eles, a disseminação da hepatite C, alertaram para a necessidade de reconsiderar esta questão (SABROZA, WALTNER-TOEWS, 2001).

A partir desse momento, o foco das pesquisas básicas e clínicas em hepatite C tem sido o melhor entendimento da biologia do vírus da hepatite C (VHC), com o objetivo de aprofundar o conhecimento dos mecanismos patogênicos, desenvolver testes diagnósticos de maior sensibilidade e especificidade e obter medicamentos mais eficazes e seguros (VIEIRA, 2010).

Atualmente a hepatite C é considerada um grave problema de saúde pública mundial. Estima-se que 3% da população global esteja infectada pelo VHC, sendo que 60% a 70% desenvolverão a forma crônica da doença. Esta agressão hepatocelular prolongada pode resultar em fibrose hepática, cirrose, insuficiência hepática crônica e carcinoma hepatocelular (CHC). Estas condições demandam uma assistência à saúde especializada e de alta complexidade, o que representa elevado impacto na saúde pública (SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016). Nas fases mais avançadas, a doença pode levar ao óbito, sendo que cerca de 700.000 pessoas morrem a cada ano de hepatite C (WHOa, 2016).

1.1 Histórico das hepatites virais

O contexto histórico das hepatites virais remonta vários milênios. Epidemias de icterícia há séculos são descritas, sem, no entanto, qualquer ligação ao agente causal ou às formas de transmissibilidade. Os primeiros registros precedem a Era Cristã, com descrição de surtos de icterícia há cerca de 2.500 anos, na Babilônia. Foram marcantes, sobretudo, nos períodos de guerra e catástrofes humanas,

ocasiões de calamidade pública e social, com deterioração das condições higiênicas da população (SILVA, 1995; FONSECA, 2010; FRANÇA, 2011). Durante a primeira e segunda guerras mundiais, inúmeros soldados foram acometidos por icterícia, atingindo proporções pandêmicas (REUBEN, 2002).

Em um segundo momento, passaram a ser descritos casos de icterícia que se desenvolviam em pacientes que haviam sido vacinados, que receberam hemoderivados e, ainda, icterícias associadas à inoculação de medicações injetáveis ou coleta de sangue. Estes relatos apontavam notadamente para a associação da icterícia com transmissibilidade pela via parenteral (BEESON, 1979; SCHMID, 2001).

A partir de 1940, reforçava-se a ideia de que o desenvolvimento da icterícia epidêmica estaria primariamente relacionado à lesão hepática, tendo como causa um agente viral. Este entendimento decorria do desenvolvimento dos testes laboratoriais para avaliação da função hepática e realização da biópsia, contribuições que consolidavam a nova fase da pesquisa científica (BEESON, 1979).

Publicações a respeito do tema evidenciavam tratar-se de dois tipos de hepatite, por apresentarem características clínicas e epidemiológicas diversas, mas ambas com origem relacionada a um agente viral. Em 1947, após conduzir inúmeros estudos em modelos experimentais e humanos, o pesquisador MacCallum designou os termos hepatite A quando transmitida pela via oro-fecal e hepatite B pela parenteral (Quadro 01) (KRUGMAN, et al., 1967; FONSECA, 2010). A busca por mais conhecimento prosseguiu intensamente, resultando na identificação dos agentes infecciosos causadores das duas formas de hepatite e, ainda, na descoberta do vírus Delta, posteriormente denominado de vírus da hepatite D (Quadro 01) (BLUMBERG, et al., 1966; PRINCE, 1968; DANE, et al., 1970; ALMEIDA, et al., 1971; RIZZETTO, et al., 1977).

Quadro 01. Caracterização dos agentes etiológicos associados a quadros de hepatites virais

Agente etiológico	Família	Transmissão	Material genético
Vírus da hepatite A (VHA)	<i>Picornaviridea</i>	Entérica	RNA
Vírus da hepatite B (VHB)	<i>Hepadnaviridae</i>	DST	DNA
Vírus da hepatite C (VHC)	<i>Flaviviridae</i>	Parenteral	RNA
Vírus da hepatite D (VHD)	-	-	RNA
Vírus da hepatite E (VHE)	<i>Caliciviridae</i>	Entérica	RNA
Vírus da hepatite F	-	Não há relatos de casos em humanos	DNA
Vírus da hepatite G ou vírus GB-C (VHG/GBV-C)	<i>Flaviviridae</i>	Parenteral	RNA
Vírus SEN (VSEN)	<i>Circoviridae</i>	Parenteral	DNA
Vírus TT (Transfusion Transmissible Virus)	<i>Circoviridae</i>	Parenteral e entérica	DNA
Vírus Sanban	Vírus próximo do VTT	Parenteral e entérica	DNA
Vírus Yonban	Vírus próximo do VTT	Parenteral e entérica	DNA
Vírus VTLM	Vírus próximo do VTT	Parenteral e entérica	DNA
NV-F	-	-	DNA

Caracterização dos agentes etiológicos associados a quadros de hepatites virais quanto à família pertencente, forma de transmissão e material genético dos agentes. DNA (Deoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxirribonucleico); RNA (Ribonucleic Acid - Ácido Ribonucleico). Fontes: Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. Hepatites virais. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/hepatites-virais>. LINNEN J, et al. Molecular cloning and disease associated with hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271:505-508. TAKAHASHI, K., et al. Full or Near Full Length Nucleotide Sequences of TT Virus Variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT Virus-Like Mini Virus. *Intervirolgy* 2000;43:119-123. TANAKA Y, et al. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and relationship to TTV family. *J Inf Dis* 2001, 183: 359-367. YE H CH, CHEN TC, CHANG ML, HSU CW, YE H TS, LEE WC, et al. Identification of NV-F virus in hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2002; 79: 92-96. WATANABE, M.A.E., et al. Aspectos patológicos, imunológicos e propriedades moleculares do TT vírus. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.41 no.4 Rio de Janeiro Aug. 2005. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. *Microbiologia*. 12^a ed. Artmed, 2017.

Mesmo diante do grande avanço científico, vários casos de hepatite pós-transfusional foram descritos e, durante décadas, esta questão permaneceu como um questionamento dos pesquisadores e estudiosos da história natural das hepatites (FEINSTONE, et al., 1975; KNOPELL, et al., 1975; HOOFNAGLE, et al., 1977; FONSECA, 2010). Excluídos os vírus das hepatites A e B como agentes dessa hepatite, a doença passou a ser designada hepatite não-A não-B, denominação que foi mantida até a identificação do vírus C (Quadro 01) (FEINSTONE, et al., 1975).

A caracterização do vírus da hepatite C se deu em 1989, ano em que Michel Houghton e seus colaboradores Qui-Lim-Choo, George Kno e Daniel Bradley conseguiram, mediante sucessivos estudos envolvendo biologia molecular, a clonagem de partes do vírus C e o desenvolvimento de um teste sorológico capaz de detectar o VHC em amostras de indivíduos infectados (CHOO et al., 1989; IWARSON, et al., 1995). Estas descobertas foram de expressiva relevância para a hepatologia moderna, contribuindo no controle da disseminação das hepatites pós-transfusionais, o que reduziu significativamente a incidência da hepatite C decorrente desta via de transmissão (ALTER, 1989; SARACENI, 2001).

Em 1990, após inúmeros casos de infecção por água contaminada e exclusão do vírus da hepatite A como causa do surto, Reyes e colaboradores identificaram, com técnicas de clonagem molecular e transmissão experimental em macacos, o vírus da hepatite E (Quadro 01) como agente causal (REYES et al., 1990; MUSHAHWAR, 2008; FONSECA, 2010). A hepatite E assemelha-se à hepatite A pela forma de transmissão e ausência de evolução para a cronicidade (HARRISON, 1999).

Pesquisas realizadas de 1994 a 2001 evidenciaram a amplitude do campo de estudos das hepatites virais com a descoberta de diversos vírus supostamente associados a quadros de hepatite. Entre eles, o vírus da hepatite F, vírus das hepatites GB-C (ou vírus da hepatite G), vírus SEM, vírus TT e os vírus próximos à este último: vírus Sanban, vírus Yonban e vírus VTLM (Quadro 01) (SIMONS et al., 1995; LINNEN et al., 1996; NISHIZAWA et al., 1997; TANAKA et al., 2001; FONSECA, 2010).

Estudos mais recentes sugerem a presença de um novo vírus, denominado NV-F (Quadro 01), associado à etiopatogenia da cirrose hepática criptogênica e do carcinoma hepatocelular (YEH CH, et al., 2002; YEH CT, et al., 2006).

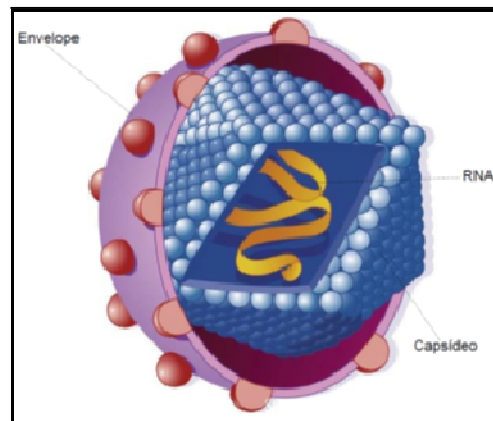
No que se refere ao avanço da pesquisa científica, permanecem inúmeras indagações no campo das hepatites virais, constituindo-se um desafio para a saúde pública mundial (WHO, 2016).

1.2 Vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C é um vírus hepatotrópico, que pertence filogeneticamente aos *Hepacivirus*, da família dos *Flaviviridae*. Possui uma relação estrita de hospedeiros, sendo apenas o homem e o chimpanzé susceptíveis à infecção natural (BRASS et al, 2007). Esta condição, associada à dificuldade de cultivo do VHC em cultura de células, levaram a atrasos no progresso do conhecimento. Por um longo período não foi possível obter um modelo de cultura celular plausível para a replicação do VHC que permitisse o isolamento viral para fins de pesquisa e diagnóstico. A caracterização, clonagem e sequenciamento do VHC só foi possível com a infecção de chimpanzés (BARTENSCHLAGER et al., 2003; BEZERRA, 2006). A partir de 2003 foi proposto um modelo de cultivo celular, para o qual foram necessárias alterações na estrutura do genoma do VHC que possibilitassem a adequação viral ao meio de cultivo *in vitro*. Esta inovação permitiu a descoberta da forma de replicação e funções de proteínas virais. No entanto, o vírus infectante presente em um indivíduo infectado continua sendo incapaz de se replicar em meios normais de cultivo (BEZERRA, 2006; LI et al., 2015).

O VHC é uma partícula viral esférica, com aproximadamente 55 a 65nm de diâmetro, envelopado e com nucleocapsídeo icosaédrico, contendo o genoma viral (Figura 01) (FRANÇA, 2011; DUBUISSON, COSSET, 2014).

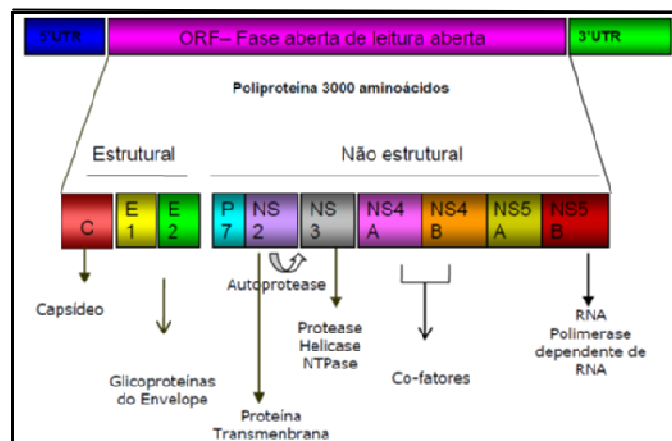
Figura 01. Representação esquemática da estrutura da partícula do vírus da hepatite C



Representação esquemática da estrutura da partícula do vírus da hepatite C, destacando o envelope, capsídeo e o RNA viral. Fonte: http://www.sciencephoto.com/images/download_lores.html?id=670063868 (modificada).

O genoma do VHC é constituído por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, com polaridade positiva, que funciona como RNA mensageiro para a tradução das proteínas virais. A molécula linear é composta por uma região 5' não traduzida (5' Untranslated Region - 5'UTR), uma única fase de leitura aberta (open reading frame - ORF), que codifica uma poliproteína precursora de cerca 3.000 aminoácidos e uma outra região não traduzida na extremidade 3' (3' UTR) (Figura 02). As UTRs contêm sequência nucleotídicas relevantes para regulação da replicação viral (MORADPOUR et al. 2007; MARQUES, 2013).

Figura 02. Representação esquemática do genoma do vírus da hepatite C



Representação esquemática dos genes do vírus da hepatite C e as respectivas identificações das proteínas que cada fragmento dará origem. Fonte: MARQUES, 2013 *apud* LEMON et al., 2007.

Durante a etapa de replicação viral essa poliproteína é clivada por proteases celulares e virais, originando dez produtos gênicos: proteínas estruturais, essenciais para a formação do capsídeo e envelope viral: proteína do core, proteínas 1 e 2 do envelope – E1 e E2; proteínas não-estruturais, associadas à replicação do RNA e a morfogêneses dos vírions: NS2 a NS5 e uma proteína transmembrana p7 (Figura 02) (LAUER et al., 2001; SUZUKI et al., 2007; SILVA, et al. 2012; MARQUES, 2013; LEVINSON, 2016). As proteínas estruturais do VHC derivam do segmento amino terminal da poliproteína precursora e são, por definição, aquelas incorporadas na partícula viral. A proteína do core, apresenta como principais funções a encapsidação do genoma e formação do nucleocapsídeo (PENIN et al., 2004; DUBUISSON, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Acredita-se que esta proteína, quando madura, seja capaz de se agrupar espontaneamente para encapsidar o RNA viral e de interagir com glicoproteínas do envelope E1 e E2 (SILVA, 2014). Existem, ainda, evidências que a proteína do core esteja envolvida em diversas outras funções, como na modulação da transcrição gênica, sinalização, proliferação e morte celular, no metabolismo lipídico, contribuindo para o desenvolvimento de esteatose hepática, na oncogênese do carcinoma hepatocelular e na supressão da resposta do hospedeiro (DUBUISSON, 2007; MARQUES, 2013).

As glicoproteínas E1 e E2 são proteínas transmembrana, responsáveis pela formação do envoltório viral, com papel importante na entrada do VHC na célula por serem essenciais para o reconhecimento e adsorção vírus-célula (BRASS et al., 2006; KAITO et al., 2006; MORADPOUR et al., 2007; MARQUES, 2013). Essas proteínas exibem elevado grau de variabilidade genética, característica relevante para o escape viral à resposta imune. A proteína E2 apresenta sítios de ligação para o receptor CD81, uma proteína de membrana encontrada nos linfócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, natural killer, células endoteliais, epiteliais e hepatócitos (DUBUISSON, 2007; ROCHA-PERUGINI et al., 2008; TORRES-PUENTE et al., 2008). A molécula CD81 parece participar do processo de adsorção/penetração do VHC, não sendo, no entanto, a única candidata a receptor para o vírus. Outras proteínas como o SR-BI (Scavenger receptor class B type I), a claudina-1, glicosaminoglicanas e lipoproteínas de baixa densidade também parecem ser necessárias para a entrada do VHC nas células. Apesar do modo de penetração do VHC na célula não estar completamente elucidado, é provável que o

vírus utilize esses fatores de forma sequencial, visto ser um processo complexo que requer a ação coordenada de diversas proteínas do hospedeiro (PLOSS et al., 2009).

A proteína p7 está localizada entre a região estrutural E2 e não estrutural NS2 do VHC e é constituída por duas α -hélices transmembrana, conectadas por uma alça voltada para o citoplasma (FRANÇA, 2011; MARQUES, 2013; LIMA, 2015). Inicialmente houve dificuldade no estabelecimento das funções desta proteína devido à inexistência de modelos adequados de cultura celular para a propagação do VHC e à limitada disponibilidade de anticorpos reconhecendo p7 (MADAN, BARTENSCHLAGER, 2015).

Apresenta propriedade funcional indicativa de canal iônico, com seletividade parcial para cátions e pequenas moléculas. No ciclo replicativo do VHC, há evidências que p7 é essencial para a montagem, maturação e liberação das partículas infecciosas desse vírus (FRANÇA, 2011; MARQUES, 2013; SILVA, 2014; LIMA, 2015; MADAN, BARTENSCHLAGER, 2015;). Estudo demonstrou, ainda, que esta proteína é essencial para a propagação produtiva do VHC in vivo, achado que concorda com estudos anteriores (SAKAI, et al., 2003). Uma hipótese seria que a p7 previne a acidificação prematura das vesículas que transportam o VHC, processo necessário às mudanças conformacionais nas proteínas do envelope para a entrada viral nas células do hospedeiro (WOZNIAK et al., 2010).

A porção carboxi-terminal da poliproteína codifica as proteínas não estruturais: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, que, por definição, são expressas nas células infectadas, mas não são incorporadas na partícula viral (FRANÇA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDEb, 2015). Estas proteínas estão envolvidas no processamento da poliproteína e na replicação viral, incluindo a síntese de RNA, modulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e montagem da partícula viral (FRANÇA, 2011; SILVA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDEb, 2015).

A proteína NS2 é uma proteína transmembrana, que atua como protease zinco-dependente com atividade autocatalítica na junção NS2/NS3 da poliproteína, levando a liberação da proteína NS3 (FRANÇA, 2011; SILVA, 2014). A NS2 é importante no desenvolvimento de esteatose hepática, regulação da estabilidade da proteína NS2 e montagem das proteínas NS5 e NS3, com papel central na

morfologia da partícula viral (DUBUISSON, 2007; FRANÇA, 2011; MARQUES 2013). Estudos indicam que a NS2 atrai as proteínas do envelope viral para o sítio de montagem do vírus, promovendo a interação entre as demais proteínas não-estruturais para a montagem da partícula viral (POPESCU et al., 2011).

A NS3 é uma proteína multifuncional, com um domínio serinoprotease na porção N-terminal e outro RNA helicase/NTPase na porção C-terminal (MORADPOUR et al., 2007). A serinoprotease, por meio da atuação do co-fator NS4A, é responsável pela clivagem da porção não-estrutural da poliproteína viral nas junções NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B, de duas proteínas adaptadoras da resposta imune da célula hospedeira, TRIF e MAVS e desempenha, ainda, função primordial no processo de multiplicação viral (DUBUISSON, 2007; SHARMA, 2010; ROMANO et al., 2011). Embora o papel da RNA helicase/NTPase ainda não tenha sido bem descrito, acredita-se que esteja envolvida na iniciação da síntese de RNA, sendo responsável pela dissociação das fitas de RNA de seus moldes durante o processo replicativo do VHC (PANG et al., 2002).

Na proteína NS3, também foram identificados importantes epítomos associados com a resposta humoral e celular para a resolução da infecção, tornando-se um alvo promissor para o desenvolvimento futuro de vacina contra a hepatite C (TELLINGHUISEN et al., 2002; FRANÇA, 2011; MARQUES, 2013). A proteína NS3 pode estar envolvida também em outros aspectos da infecção pelo VHC. Estudos mostraram que a NS3 pode interferir nas funções normais da célula hospedeira, acredita-se estar envolvida direta ou indiretamente na carcinogênese viral, ao afetar a proliferação e morte celular e ao interagir com a proteína p53. Parece interagir, ainda, com a proteína quinase A e quinase C, que participam da transdução de sinais intracelulares (TELLINGHUISEN et al., 2002; GALE, FOY, 2005).

A região genômica de NS4 codifica as proteínas NS4A e NS4B. Além de atuar como cofator para a ativação e estabilização da NS3 e permitir que o processamento da poliproteína ocorra de maneira eficaz (ROINGEARD et al., 2004), a NS4A participa da hiperfosforilação da NS5A e é capaz de alterar a membrana intracelular, induzindo a formação de rede membranosa, que serve de suporte ao complexo de replicação do genoma viral (DUBUISSON, 2007; JOYCE & TYRRELL, 2010; SHARMA, 2010).

A proteína NS4B é o principal indutor da rede membranosa por desencadear a formação específica do rearranjo das membranas vesiculares que a constitui (EGGER et al., 2002; PAUL et al., 2011). É responsável por atrair outras proteínas não estruturais do VHC para o sítio de replicação do RNA viral, apresenta atividade NTPase, parece estar envolvida na montagem de partículas virais e contribuir diretamente no processo de replicação por meio da ligação a região 3' NC de RNAs de polaridade negativa (EINAV et al., 2008; PAUL et al., 2011). A ligação da proteína NS4B com a região 3' NC da fita do RNA viral é um alvo recentemente identificado para intervenção com agentes terapêuticos (PAUL et al., 2011).

A NS5A é uma fosfoproteína normalmente localizada na membrana do retículo endoplasmático. É provável que esta proteína exerça suas funções por meio de interações com componentes virais e celulares, desempenhando múltiplas funções no ciclo biológico do VHC, como na replicação, montagem, liberação da partícula viral e modulação das vias de sinalização da célula hospedeira (HUANG et al. 2007; MORADPOUR et al. 2007). Possui uma região determinante da sensibilidade ao interferon (ISDR – Interferon Sensitivity Determining Region), que parece interferir na eficácia da resposta terapêutica ao fármaco. É sítio para mutações adaptativas que facilitam a replicação viral, apresenta potencial oncogênico e inibi apoptose (HUANG et al. 2007; SHARMA, 2010). A NS5A pode atuar como um canal que auxilia na proteção e no direcionamento do RNA dentro das membranas do complexo de replicação, e, ainda, interagir com a NS5B polimerase aumentando a atividade desta enzima viral (TELLINGHUISEN et al., 2005; VERDEGEM et al 2011).

A proteína NS5B é uma sequência altamente conservada com atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), essencial para o processo de replicação do genoma viral (DUBUISSON, 2007; SHARMA, 2010). Esta proteína é um importante alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes para a terapia anti-VHC (DUBUISSON, 2007; SHARMA, 2010).

A região 5' UTR é uma região altamente conservada entre os diferentes isolados do genoma viral. Apresenta uma estrutura secundária em forma de alça, que contém um sítio de entrada interna para ribossomos (*Internal ribosomal entry site* - IRES), responsável pela iniciação e controle da tradução do RNA viral (FRIEBE et al., 2001; SUZUKI et al., 2007; FRANÇA, 2011; SILVA, 2014).

A região 3' UTR tem comprimento variável, sendo dividida em três domínios distintos: uma pequena sequência inicial variável, altamente conservada dentro de cada genótipo, entretanto variável entre cada um deles; a segunda região é formada por uma sequência de polipirimidina (poli U/UC), altamente variável entre os diferentes genótipos, e uma terceira região altamente conservada, denominada de cauda 3'X. A região 3' UTR está envolvida no processo de replicação viral (KOLYKHALOV et al., 1996; TANAKA et al., 1996; FRIEBE et al., 2005; MORADPOUR et al. 2007; SUZUKI et al., 2007; BOONSTRA et al., 2009; BUNG et al., 2010).

Baseando-se na análise filogenética e na heterogeneidade genômica do VHC, este vírus é classificado em sete principais genótipos, denominados de 1 a 7 (SIMMONDS et al., 2005; MURPHY et al., 2007), múltiplos subtipos (a, b, c, d ...) e diversas “quasispécies” do VHC (SIMMONDS et al., 1993; SIMMONDS, 2004; SULTAN et al., 2009; TE & JENSEN, 2010). Essas são continuamente geradas durante a replicação viral, como resultado da baixa fidelidade da RNA-polimerase RNA-dependente viral, que não possui atividade de revisão. A maior ou menor diversidade das “quasispecies” parece estar relacionada com a pressão imunológica, visto que costuma ser pequena nas fases iniciais da doença, com aminotransferases normais, sendo de alta heterogeneidade nos casos de doença hepática mais avançada e/ou baixa resposta terapêutica (ROSEN, GRETCH, 1999; STRAUSS, 2001).

Esta multiplicidade de padrões de organização genética (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) atribui ao VHC um mecanismo complexo de evasão da resposta imunológica. Esta característica leva à implicações clínica e terapêutica relevantes, dentre elas a dificuldade de eliminação do VHC pelo sistema imune do hospedeiro, resultando na cronicidade da hepatite C (SILVA, et al. 2012); o tropismo por células variáveis; o rápido desenvolvimento da resistência aos fármacos e o desafio de desenvolvimento de uma vacina eficaz (BUKH, MILLER, PURCELL, 1995; ROSEN, GRETCH, 1999; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial e são os mais prevalentes no Brasil, com predominância de 60% do genótipo 1 sobre 40% dos genótipos não-1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; SILVA, et al. 2012; SMITH, et al, 2014).

Elevada heterogeneidade observa-se, também, nos aspectos bioquímicos das partículas virais (ROINGEARD et al., 2004). Estas partículas podem circular na corrente sanguínea complexados às lipoproteínas de baixa densidade ou às imunoglobulinas, ou como partículas livres (BRASS et al, 2007).

O processo de replicação do VHC ocorre no citoplasma do hepatócito e é intensificado por um microRNA específico dessas células, denominado miR-122 (LEVINSON, 2016). Esse micro-RNA é altamente expresso nos hepatócitos, desempenhando um papel central no desenvolvimento, diferenciação, homeostase e nas funções hepáticas, dentre elas agindo na regulação do metabolismo de ácidos graxos. A expressão reduzida de miR-122 tem sido associada a doença hepática (TSAI et al, 2012; BANDIERA, et al., 2015). Como o miR-122 pode ser detectado no soro, este é um biomarcador de lesão hepática na hepatite B ou C crônica, doença hepática induzida por drogas, dentre outras patologias (VAN DER MEER et al., 2013; BANDIERA, et al., 2015).

Em consonância com o papel essencial do miR-122 e de maneira contrária à maioria dos miRNAs que reprimem seus alvos ao se ligarem à região 3' UTR, na infecção pelo VHC, o miR-122 se liga à sítios da região 5' UTR do RNA viral intensificando a replicação e acelerando a infecção viral. Esta ligação potencializa a síntese do mRNA (RNA mensageiro) ao aumentar a associação de ribossomos e, ainda, estabiliza o genoma do VHC, juntamente com Argonaute 2 (Ago2) no RNA-induced silencing complex (RISC), protegendo-o da degradação por exonucleases (HENKE et al., 2008; JANGRA, YI, LEMON, 2010; MACHLIN, SARNOW, SAGAN, 2011; WILSON et al, 2011; SHIMAKAMI et al., 2012; LEVINSON, 2016).

A taxa de replicação do vírus C pode chegar a níveis elevados, oscilando entre 10^{10} a 10^{12} cópias de RNA viral por dia (OLIVEIRA, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em 2013, foi realizado um teste clínico utilizando um nucleotídeo antisense que se liga ao miR-122 e bloqueia sua atividade. Este bloqueio levou à redução prolongada dos níveis de RNA do VHC em pacientes infectados, participantes do estudo (JOPLING et al, 2005; BANDIERA, et al., 2015; LEVINSON, 2016). Estudos indicam que o miR-122 representa um elemento essencial para infecção por VHC. Decorrente destes achados, antagonistas do miR-122 estão em desenvolvimento como promissores fármacos para uso terapêutico em pacientes infectados pelo VHC (BANDIERA, et al., 2015; JOSEPH et al., 2015).

1.3 Hepatite C

Após 1989, quando Choo et al. realizaram o isolamento do DNA complementar do vírus da hepatite C, a infecção adquiriu especial relevância entre as causas de doença hepática crônica (TEIXEIRA, MARTINS FILHO, OLIVEIRA, 2005; MARTINS, et al, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Este agravo afeta mais de 185 milhões de pessoas em todos os continentes, destacando-se por ser uma das principais causas de transplantes hepáticos (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

A hepatite C é uma inflamação que ocorre no fígado com evolução aguda ou crônica, ambas geralmente assintomáticas. Cerca de 15 a 45% dos infectados apresentam eliminação viral espontânea no decorrer de 6 meses após a infecção (WHOa, 2016). Em situações em que o sistema imunológico é incapaz de eliminar o VHC, há cronicidade da infecção (SILVA, et al. 2012). A forma crônica é marcada pela evolução silenciosa, com sinais e sintomas comuns às demais doenças crônicas hepáticas, que se manifestam em fases avançadas, sendo, em sua maioria, diagnosticada décadas após a infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Essas características resultam no desconhecimento do diagnóstico por grande parte dos pacientes com a infecção, o que contribui para a permanência de número significativo de indivíduos infectados assintomáticos mundialmente (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; CONITEC, 2015).

O quadro assintomático ou oligossintomático e a desinformação da sociedade são obstáculos no combate à hepatite C, apesar do maior acesso aos serviços de saúde e de tecnologia eficaz para o diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

A elevada taxa de cronificação, seu potencial evolutivo para cirrose e CHC, seu destaque como causa de transplante hepático e sua prevalência no planeta, fazem da hepatite C um grave problema de saúde pública e um desafio para a medicina atual (SILVA, et al. 2012; SILVA, 2014).

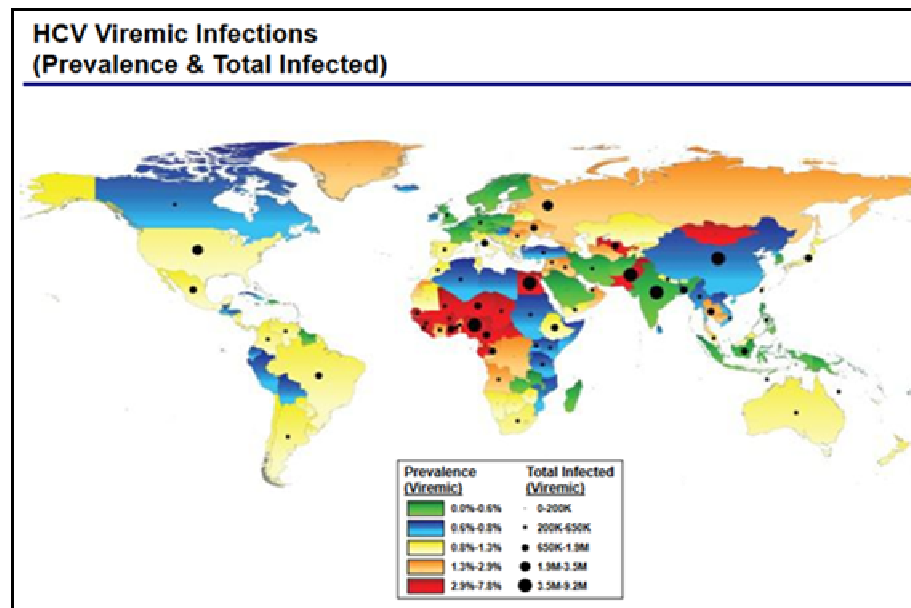
1.3.1 Epidemiologia da hepatite C

Os dados epidemiológicos referentes à hepatite C se fundamentam, principalmente, em pesquisas de prevalência subsidiada na análise de resultados da frequência do marcador sérico anti-VHC (anticorpos contra o vírus da hepatite C), de candidatos a doadores de sangue, ou em populações de maior potencial de contágio (SILVA, 2014). Porém, tratando-se de grupos com caracteres específicos, estes estudos não retratam de forma acurada a real prevalência da infecção (MARTINS, et al, 2011). Portanto, não há informações precisas a respeito da frequência da doença e das variações no padrão de fatores de risco entre as regiões brasileiras (UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO, 2010).

Fatores geográficos e temporais podem ser utilizados para definir os padrões epidemiológicos da infecção pelo VHC (SILVA, 2014). Nos países desenvolvidos, como Estados Unidos e Austrália, considera-se uma transmissão recente em virtude do uso de drogas ilícitas, visto que a maior parte dos infectados concentra-se na população entre 30 e 39 anos. Em um segundo padrão, a infecção predomina em pessoas idosas, retratando uma possível transmissão em passado distante, perfil de ocorrência na Turquia, Espanha, Itália, Japão e China (TEIXEIRA, MARTINS FILHO, OLIVEIRA, 2005; MARTINS, et al, 2011; SILVA, 2014). O terceiro padrão é encontrado no Egito, onde observa-se alta prevalência da doença em todas as faixas etárias, com aumento do número de casos, conforme a idade, apontando para um risco elevado de transmissão que se mantém desde um passado longínquo. O reconhecimento de padrões específicos de prevalência da hepatite C demonstra provável peculiaridade epidemiológica de cada região, permitindo o estabelecimento de medidas de detecção e de controle mais eficazes (MARTINS, et al, 2011).

Sabe-se que a prevalência da hepatite C é baixa em países como Reino Unido, Escandinávia, Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul. Endemicidades intermediárias ocorrem no Brasil, Europa Oriental, Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia, partes da África e Ásia. O Egito, China, Mongólia e Paquistão permanecem com alta prevalência (Figura 03) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; MARTINS, et al, 2011).

Figura 03. Distribuição da prevalência global da hepatite C



Fonte: GOWER E., et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C vírus. *Journal of Hepatology*, 2014, vol. 61, j S45–S57.

O Brasil apresenta prevalência estimada de 1,4 a 1,7 milhões de pessoas infectadas pelo VHC (CONITEC, 2015). Deste universo, apenas 120 mil casos foram notificados e confirmados, sendo aproximadamente 10 mil casos notificados a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; COELHO, 2015). Segundo o Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais, os casos confirmados de hepatite C estão, majoritariamente, na faixa etária de 45 a 54 anos. Esta faixa etária se destaca pelo elevado uso de drogas injetáveis, prática de sexo desprotegido e transfusões de sangue e hemodiálise com baixo controle nas décadas de 80 e 90 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.3.2 Fatores de Risco e Transmissão

A via parenteral é apontada como a principal forma de transmissão do VHC, sendo os principais fatores de risco: a transfusão de sangue e hemoderivados de doadores não testados para anti-VHC; uso de drogas injetáveis com compartilhamento de material perfuro-cortante; transplantes de órgãos de doadores infectados; terapias invasivas com reutilização ou esterilização inadequada de

equipamentos médicos e hemodiálise (MARTINS, et al, 2011; SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016).

A transfusão de sangue e derivados apresenta especial destaque. Nas últimas quatro décadas, a maior parte dos países desenvolvidos apresentaram reduções progressivas no risco de infecção por VHC transmitida por transfusão após implementação de inúmeras medidas. Essas medidas incluem a adoção de um sistema de doadores voluntários, triagem de doações de sangue com exames laboratoriais, rastreio de potenciais doadores com base em respostas a questões relacionadas a fatores de risco de HIV, teste anti-VHC e testes de ácido nucleico do VHC (SHEPARD, FINELLI, ALTER, 2005).

Nos países em desenvolvimento, no entanto, não há triagem adequada de doadores de sangue para infecções transmitidas por transfusão, incluindo a hepatite C. Em alguns países há obrigatoriedade por lei, de realização destes exames, mas geralmente não são executados por escassez de recurso financeiro (SHEPARD, FINELLI, ALTER, 2005). No caso do Brasil, antes de 1993, pessoas receberam transfusão sem que houvesse qualquer padronização dos processos de triagem pré-doação que permitissem diagnosticar infectados pelo VHC (MARTINS, et al, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016). Em 2015 o percentual de pacientes infectados por VHC em função de transfusão sanguínea foi de 19,5% dos casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Atualmente, usuários de drogas injetáveis são o grupo de maior risco no Brasil, representando 26,7% dos casos notificados até 2015. A infecção decorre do compartilhamento de material contaminado, principalmente entre os mais jovens (MARTINS, et al, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Estudos epidemiológicos demonstram que as taxas de prevalência mundial da infecção, entre os usuários, podem atingir a faixa dos 90% (SILVA, 2014).

Dentre outras formas de transmissão da hepatite C de menor frequência, mas não menos importantes, estão os acidentes pérfuro-cortantes ocupacionais que permanecem como potencial fator de risco em razão da ausência de medidas profiláticas pós-exposição eficazes. A transmissão vertical do VHC apresenta taxas que variam entre 0% a 20%, sendo fatores agravantes a elevada carga viral da mãe, o trabalho de parto prolongado e a coinfeção HIV (*Human Immunodeficiency Virus* -

Vírus da Imunodeficiência Humana) -VHC. A amamentação parece não contribuir de maneira significativa para a transmissão do vírus. Em relação à transmissão sexual, não se chegou a uma completa elucidação, considerando resultados divergentes em estudos realizados. A maior prevalência da infecção por esta via encontra-se entre pacientes com doenças sexualmente transmissíveis, prostitutas e seus parceiros e entre pacientes coinfectados HIV-VHC. Secundariamente, considera-se de risco o contato com maior número de parceiros sexuais, baixa adesão ao uso de preservativos, experiências sexuais traumáticas e homossexualismo masculino (MARTINS, et al, 2011).

A transmissão do vírus, no entanto, não se restringe a esses grupos. Identificam-se formas adicionais de transmissão decorrentes da variedade de atividades humanas com potencial exposição ao sangue. Pode-se citar tatuagem, *piercing*, procedimentos odontológicos, podologia, manicure e pedicure, serviços de barbearia, rituais de escarificação, circuncisão e acupuntura que não se enquadram às normas de biossegurança (MARTINS, et al, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

No Brasil, há estimativa de que cerca de 40% dos infectados não possuem histórico epidemiológico bem esclarecido, destacando a importância de um contágio inaparente do VHC (SILVA, et al. 2012). Necessitam-se estudos com metodologia adequada, que busquem o conhecimento da prevalência da hepatite C e os fatores de risco, visando a implementação correta de medidas de controle e alocação de recursos para o combate à doença (MARTINS, et al, 2011).

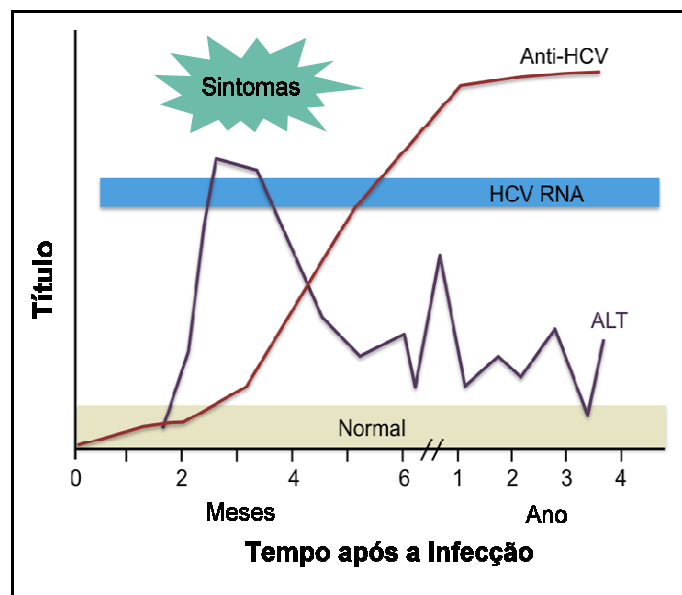
1.3.3 Aspectos clínico-laboratoriais

A história da hepatite C é variável e de difícil previsibilidade, pois o conhecimento das causas determinantes da evolução da doença ainda são pouco conhecidas (CONTE, 2000; SILVA, et al. 2012). Inúmeros fatores estão envolvidos no curso da infecção, que se relacionam aos caracteres viral, individual e ambiental. Quanto aos aspectos virais, incluem carga viral, genótipo do VHC e multiplicidade de quasiespécies. No âmbito individual, os quais estão relacionados ao hospedeiro,

englobam sexo, etnia, idade no momento da infecção, duração da infecção, obesidade, deficiência imune, susceptibilidade genética e doenças metabólicas e hepáticas concomitantes. Referente ao ambiental, envolvem o alcoolismo crônico, dieta, tabagismo, medicamentos e coinfeções pelo VHB (Vírus da hepatite B) e HIV (VIEIRA, 2010; SILVA, et al. 2012).

O período de incubação da hepatite C varia de 2 a 24 semanas. Após a exposição inicial, cerca de 80% das pessoas permanecem assintomáticas. Nos casos sintomáticos relatam-se febre, fadiga, diminuição do apetite, náuseas, vômitos, dor abdominal, urina escura, fezes de cor cinza, dor nas articulações e icterícia (SILVA, et al. 2012; WHOa,2016). Quanto aos aspectos laboratoriais, o RNA-VHC atinge níveis séricos variando de 10^5 a 10^7 UI/mL já nas primeiras semanas, antes da possibilidade de detecção do anti-VHC e do pico das aminotransferases (Figura 04) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 04. Evolução dos marcadores bioquímicos e sorológicos durante o curso da infecção pelo vírus da hepatite C



Evolução dos marcadores anti-VHC, RNA do VHC e ALT (alanina aminotransferase) durante o curso da infecção pelo vírus da hepatite C. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2005 (Adaptado).

A evolução da forma crônica é lenta, insidiosa e progressiva, frequentemente com manifestações clínicas discretas ou ausentes nas primeiras décadas. Nestes

casos, há flutuações dos níveis das aminotransferases, geralmente com histologia hepática alterada e vírus detectáveis (CONTE, 2000; SILVA, et al. 2012).

No entanto, há pacientes que constituem uma exceção por apresentarem níveis de VHC baixos ou flutuantes, anti-VHC positivos e enzimas circulantes normais. Estes resultados, na maioria das vezes, são interpretados como sinal de cura completa. No entanto, Haydon et al. (1998) alteraram essa interpretação, ao demonstrarem a presença de RNA-VHC no fígado desses pacientes. Por isso, é importante considerar a existência de limitações metodológicas no momento da interpretação dos dados fornecidos pelos exames de diagnóstico da hepatite C (CONTE, 2000).

A forma crônica, nos casos mais graves, evolui para cirrose, descompensação hepática, ascite, varizes esofágicas e encefalopatia hepática (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016).

A cirrose representa o estágio final da hepatite C crônica e é a principal indicação para transplante hepático. Suas complicações causam mortes devido às hemorragias digestivas, síndrome hepatorenal, síndrome hepatopulmonar, infecções, encefalopatia hepática e, ainda, à ocorrência do CHC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; SILVA, et al. 2012).

A associação da infecção crônica com o desenvolvimento de cirrose e CHC requer a identificação da doença precocemente e o tratamento dos pacientes, visando a redução da morbimortalidade do agravo (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

A hepatite C apresenta, ainda, importantes e frequentes manifestações extra-hepáticas. Relevância que está, provavelmente, associada à persistência prolongada do VHC no hospedeiro, seu particular tropismo pelos hepatócitos e pelas células mononucleares sanguíneas. Estas manifestações estão, em sua maioria, ligadas a processos imunes, que se relacionam, provavelmente, à possibilidade do vírus se replicar nas células linfóides e à deposição de imunocomplexos nos diversos tecidos e órgãos como a pele, o sistema músculo-articular, os nervos periféricos e os rins (CONTE, 2000; SILVA, et al. 2012). Exemplos de síndromes autoimunes são a crioglobulinemia, artralgias e uma maior incidência de linfoma não-Hodgkin do que na população geral (SILVA, et al. 2012).

1.3.4 Associação do VHC a componentes do sangue

Infecções virais persistentes resultam na cronicidade da doença hepática, atribuída à incapacidade do sistema imunológico de estabelecer uma resposta efetiva. O escape imune resulta na produção de anticorpos não neutralizantes e na consequente formação de imunocomplexos constituídos por epitopos do VHC ou o próprio vírus associados a proteínas humanas (KOSKINAS et al, 1994; MISSALE, et al, 1996; REHERMANN, 2000; DAMMACCO et al., 2001; TAMPAKI, KOSKINAS, 2014).

Apesar dos hepatócitos serem o alvo principal do VHC (Figura 05), o vírus ou os imunocomplexos podem, ainda, interagir com diversos componentes do sangue, como monócitos, linfócitos, eritrócitos, plaquetas e células endoteliais (Figura 06) (SCHMIDT et al., 1995; SCHMIDT et al., 1997; STAPLETON, 1999; RIOS et al., 2007).

Figura 05. Vírus da hepatite C associado ao hepatócito

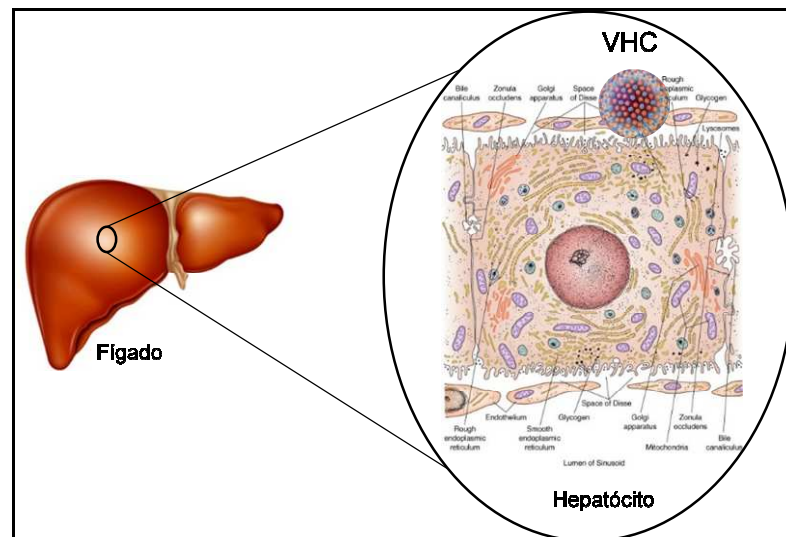


Imagem ampliada de um hepatócito infectado pelo vírus da hepatite C. Fonte: <http://www.misodor.com/FIGADO.php>; <http://www.fcms.com.br/single-post/oncologia-hep%C3%A1tica> (Adaptado).

Figura 06. Vírus da hepatite C associado aos componentes sanguíneos

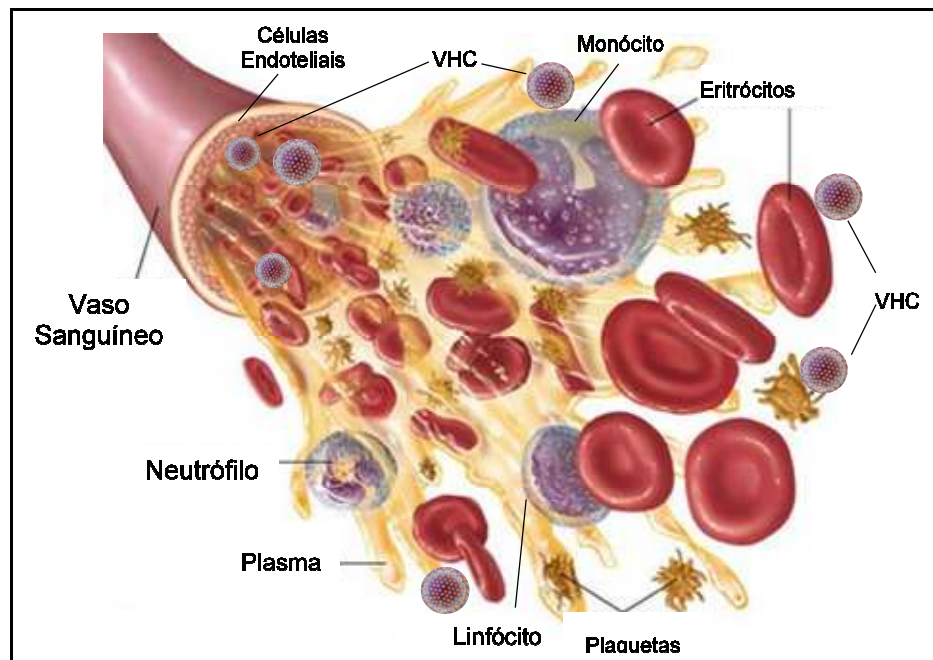


Imagem ilustrativa da associação do vírus da hepatite C com os componentes sanguíneos e células endoteliais. Fonte: <https://saude.umcomo.com.br/artigo/como-e-formado-o-sangue-2293.html> (Adaptado).

Aderência de patógenos a eritrócitos não é um novo conceito e tem sido relatado por um longo período. Alguns estudos e revisões têm sido publicados sobre o tema, discorrendo sobre a aderência e interação de diversos patógenos a eritrócitos, incluindo vírus, bactérias e parasitos (RIOS et al., 2007; BECK et al., 2009; CHANCEY et al., 2012). Embora o mecanismo exato de interação de vírus com eritrócitos humanos não esteja completamente elucidado, sabe-se que essa ligação pode ocorrer via participação de componente imunes, como anticorpos e complemento ou via diversos mecanismos não imunes, incluindo a participação de glicolípides de membrana, glicosaminoglicanas, proteoglicanas, receptores Decoy, dentre outros (ESQUITENAIRE et al., 2011). Além da interação vírus-hemácias, pesquisas vêm descrevendo a ocorrência da interação vírus-plaquetas (DE ALMEIDA et al 2007; RIOS et al, 2007; BECK et at, 2009; CHANCEY C et al, 2012; HAMAIA et al, 2012). Estudos já evidenciaram altas cargas do HIV associadas às plaquetas (YOUSSEFIAN, et al., 2002) e hemácias (LACHGAR, et al., 1998).

Em um estudo anterior do nosso grupo foi demonstrado a associação do vírus Oeste do Nilo (*West Nile virus - WNV*) a hemácias. É um vírus endêmico nos

Estados Unidos e, assim como o VHC, também pertencente à família Flaviviridae (RIOS et al., 2007). Neste estudo, RIOS e colaboradores (2007) demonstraram por meio da técnica de RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real) com sistema TaqMan, a carga viral nas hemácias excedeu a do plasma correspondente em 1 log de magnitude. Mostraram, ainda, que os WNV associados às hemácias eram infecciosos, uma vez que, quando em cultura de células Vero, eram capazes de infectá-las. Estes resultados poderiam explicar casos de transmissão de WNV por transfusão a partir de amostras de plasma negativas por teste em mini-pools de ácido nucléico (mini-pools *Nucleic Acid Testing* – MP-NAT). Estes indicativos apontaram para a necessidade de maior sensibilidade dos testes de triagem de doadores de sangue. RIOS e colaboradores (2007) sugeriram, neste estudo, o desenvolvimento de métodos que utilizam sangue total como amostra de teste e que permitem a extração do RNA dos vírus associados aos componentes celulares do sangue. Esta estratégia diminuiria o risco residual de transmissão de WNV por transfusão sanguínea (RIOS et al., 2007).

Estudo semelhante aplicado ao entendimento da associação do vírus da hepatite C a componentes sanguíneos é impossibilitado em virtude da dificuldade de cultivo do VHC em cultura de células. Apesar da proposta, em 2003, de um modelo de cultivo celular que adequa o genoma do VHC ao meio de cultivo *in vitro*, o vírus infectante presente em um indivíduo infectado continua sendo incapaz de se replicar em meios normais de cultivo (BEZERRA, 2006; LI et al., 2015).

Outro estudo do nosso grupo de pesquisa, realizado por CHANCEY e colaboradores (2012), teve como objetivo investigar a distribuição do VHC em diferentes componentes sanguíneos de doadores de sangue assintomáticos infectados pelo VHC. Diante desta impossibilidade de cultivo do vírus infectante, o estudo foi realizado utilizando o método de quantificação da carga viral. Os resultados, obtidos pela técnica de RT-qPCR, evidenciaram altas concentrações virais de VHC associadas a diferentes componentes do sangue destes pacientes. No entanto, para a maioria das amostras, o plasma apresentou a maior concentração detectável de RNA-VHC e as hemácias a menor carga viral. Estes achados indicam que a inclusão da fração de hemácias nas amostras teste não contribuiria para o aumento da sensibilidade da triagem de doadores de sangue para o VHC (CHANCEY et al., 2012).

1.3.5 Diagnóstico

A hepatite C é uma doença que impacta diretamente na qualidade de vida dos pacientes, exigindo constantes esforços para o fortalecimento da promoção à saúde, vigilância, prevenção e controle dessa patologia (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

O diagnóstico da hepatite C, geralmente, ocorre na fase crônica devido às características peculiares da mesma (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). O diagnóstico específico é comumente circunstancial, obtido em triagem sorológica para doadores nos bancos de sangue, exames ocasionais, campanhas de detecção ou investigação por suspeita epidemiológica (SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016). Este contexto reitera a necessidade da suspeição clínica pela equipe multidisciplinar e do maior acesso ao diagnóstico sorológico, principalmente às populações mais vulneráveis ao VHC (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016).

O diagnóstico da infecção baseia-se em duas categorias de exames laboratoriais: ensaios sorológicos, denominados testes indiretos, que detectam anticorpo específico para o VHC e ensaios moleculares, denominados testes diretos, que identificam e quantificam o RNA do vírus. Testes estes que exercem papel fundamental no diagnóstico da infecção, na tomada de decisões terapêuticas e na avaliação da resposta virológica ao tratamento (SILVA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

1.3.5.1 Diagnóstico Sorológico

1.3.5.1.1 Testes rápidos

São testes cuja execução, leitura e interpretação dos resultados são realizados em, no máximo, 30 minutos. São de fácil execução e não necessitam de infraestrutura laboratorial complexa. Com os resultados desses testes obtém-se a determinação qualitativa do anticorpo contra o vírus da hepatite C (anti-VHC). O

método usado para a detecção é imunocromatográfico, para o qual se utiliza antígenos sintéticos e recombinantes imobilizados em membrana para identificação seletiva do anti-VHC, em quantidade mínima de sangue total ou soro (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Estes testes estão definidos pelo Ministério da Saúde como testes de triagem da infecção pelo VHC. Segundo este Ministério, o sangue total obtido por punção digital deve ser preferencialmente utilizado por permitir a testagem na presença do indivíduo, eliminando a possibilidade de troca de amostra e permitindo o imediato conhecimento do resultado (MINISTÉRIO DA SAÚDEb, 2015).

1.3.5.1.2 Imunoensaio

Define-se como sendo exame sorológico, tradicionalmente utilizado, que detecta anti-VHC e necessita de estrutura laboratorial instalada, bem como mão-de-obra especializada (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Geralmente, estes anticorpos podem ser detectados a partir da oitava semana pós-exposição viral, porém, alguns casos levam meses para atingir níveis detectáveis (SILVA, 2014).

A presença de sorologia reativa para anti-VHC fornece dados referentes ao contato prévio com o vírus, não relativo à evolução para a cura ou cronicidade do processo infeccioso, pois em ambos os casos, este anticorpo se mantém positivo. Uma vez positivo, torna-se necessário um exame confirmatório, realizado através da pesquisa do material genético do vírus, usando técnicas de biologia molecular. Deve-se atentar, ainda, para os casos de falso-negativos, frequentemente encontrados em pacientes imunossuprimidos, em virtude da diminuição ou ausência da produção de anticorpos (SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

1.3.5.2 Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular é o teste realizado para detecção de um marcador molecular, que necessita de infraestrutura laboratorial mais complexa e mão-de-obra especializada. No caso do vírus da hepatite C, este marcador é seu RNA, o qual

apresenta níveis detectáveis no soro ou plasma a partir da 1ª semana após a exposição. Este exame, que pode ser qualitativo ou quantitativo, constitui-se na melhor ferramenta para diagnosticar precocemente a infecção aguda (SILVA, 2014).

Essa detecção do RNA viral fundamenta-se na amplificação de regiões específicas do genoma, sendo capaz de diferenciar o RNA do VHC de todos os genótipos e subgenótipos já descritos. As técnicas mais utilizadas para este fim, baseiam-se na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* ou PCR), PCR em tempo real (qPCR), *branched-DNA* (bDNA) e amplificação mediada por transcrição (TMA) (SILVA, 2014).

A PCR constitui na amplificação exponencial de sequências nucleotídicas específicas, posterior à síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa. O limite inferior de detecção dos ensaios qualitativos, por esta técnica, é de aproximadamente 50 UI/mL (SILVA, 2014).

A PCR em tempo real é um método baseado no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR) associado à um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência a qual é detectada por um sensor acoplado ao termociclador. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de RNA do vírus presente na amostra inicial. Esta metodologia apresenta elevada precisão e sensibilidade em cerca de 10 UI/mL (SILVA, 2014). Este é o teste utilizado para grandes demandas e recomendado pelo Ministério da Saúde para confirmação do diagnóstico e avaliação do tratamento (SILVA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

O bDNA é um teste de amplificação de sinal que tem como metodologia sucessivos ciclos de hibridizações por sondas. Diverge, portanto, da PCR, por não haver reação enzimática para amplificação da molécula a ser detectada. O limite mínimo de detecção do VHC-RNA para este teste está em torno de 615 UI/mL (SILVA, 2014).

A transcrição mediada por amplificação é um método isotérmico baseado em um ciclo contínuo de síntese de DNA a partir de RNA e da transcrição desse DNA para RNA. Ao final da reação, são produzidas múltiplas cópias de RNA. O referido método apresenta alta sensibilidade, com limite inferior de detecção na faixa de 5 a 10 UI/mL (SILVA, 2014).

1.3.5.2.1 Genotipagem

O teste de genotipagem viral trata-se da caracterização de parte do material genético do vírus através de técnicas moleculares de amplificação do RNA ou DNA viral. Esses testes têm sido empregados como uma ferramenta para determinação dos genótipos e para identificação de mutações associadas à resistência a drogas. É uma metodologia de alta complexidade o que restringe seu emprego aos centros diagnósticos de referência (MOREIRA, 2015).

Dentre os diferentes métodos de genotipagem, o método de referência para a identificação genotípica e classificação de isolados do VHC é o sequenciamento nucleotídico direto do genoma do vírus seguido da análise filogenética da sequência obtida (PERONE, 2007; LEVADA et al., 2010). Preconiza-se para este método a análise das regiões 5' UTR, E1 ou NS5B. Apesar da região 5'UTR ser a mais conservada do genoma do VHC, esta apresenta vários polimorfismos que permitem caracterizar os diversos genótipos virais. A análise desta região exibe boa concordância com os genótipos identificados por sequenciamento de outras regiões codificantes do genoma do vírus, mas baixo nível de exatidão para a diferenciação entre alguns subtipos. Estes métodos identificam variabilidades na estrutura primária do genoma, distinguindo-os em genótipos, sendo os principais denominados de 1 a 7, em inúmeros subtipos, os quais são identificados por letras, por exemplo, genótipo 1-a, 1-b, 1-c e, ainda, determinam populações mistas do VHC (PERONE, 2007; ATHAR, 2015).

A caracterização genotípica é desnecessária para o diagnóstico e não tem papel definido na evolução clínica da patologia. No entanto, constitui ferramenta essencial na prática clínica em razão de sua importância na definição da estratégia para o tratamento da hepatite crônica (BUSEK, OLIVEIRA, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A determinação de diferentes genótipos do VHC ajuda a prever o resultado da terapia, influencia na escolha do regime terapêutico e determina a duração da terapia antiviral (RIBEIRO, 2015; COSTA, 2016). Estudos clínicos demonstraram variações nas respostas virológicas ao tratamento da hepatite C crônica quando foram comparados pacientes infectados por VHC de genótipos diferentes. A genotipagem do VHC impacta, ainda, nas investigações

epidemiológicas e em pesquisas imunológicas que visam o desenvolvimento de vacinas (PERONE, 2008).

1.3.5.3 Biópsia Hepática

A biópsia hepática é outro exame complementar à avaliação clínico-laboratorial, não relevante para o diagnóstico da hepatite C. É estabelecida como padrão-ouro para a avaliação do grau da fibrose hepática, por ser fundamental no estadiamento e na definição do plano terapêutico da forma crônica da doença. É, no entanto, um procedimento invasivo, doloroso, com risco de infecção, hemorragias e perfuração inadvertida de outros órgãos (SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

Recentemente, a Elastografia Hepática Ultrassônica foi incorporada pelo Ministério da Saúde ao Sistema Único de Saúde (SUS), para avaliação do nível de comprometimento do fígado. Este é um exame seguro, eficaz, efetivo, de sensibilidade e especificidade significativas, com a vantagem de ser indolor e não invasivo, em comparação à biópsia hepática. Essa incorporação é um importante avanço que amplia e melhora a assistência aos pacientes infectados pelo VHC (COELHO, 2015).

1.3.6 Tratamento

Realizado o diagnóstico confirmatório de hepatite C, dá-se início ao tratamento, que visa o controle da progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral e, por fim, a erradicação do vírus no organismo do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

A erradicação do vírus é a condição que caracteriza a Resposta Viroológica Sustentada (RVS) (SILVA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). No entanto, além da RVS, há ainda, outros critérios de resposta virológica para avaliação do tratamento, os quais estão listados no Quadro 02 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Quadro 02. Critérios de resposta virológica para avaliação do tratamento

Tipo de Resposta	Conceito
Resposta virológica rápida (RVR)	HCV-RNA quantitativo (carga viral) indetectável (abaixo do limite inferior de detecção) na 4ª semana de tratamento.
Resposta virológica precoce (RVP)	Queda de pelo menos duas escalas logarítmicas (2 Log) ou 100 vezes o valor do HCV-RNA pré-tratamento (RVP parcial), ou sua indetectação na 12ª semana de tratamento (RVP total).
Resposta virológica ao final do tratamento (RVF)	HCV-RNA indetectável ao final do tratamento.
Resposta virológica sustentada (RVS)	HCV-RNA indetectável na 24ª semana de seguimento após o término do tratamento.
Recidiva virológica (recidivantes)	HCV-RNA indetectável ao final do tratamento e HCV-RNA detectável 24 semanas após o término do tratamento.
Respondedor lento	Indivíduo que apresenta RVP parcial (HCV-RNA detectável, porém com queda > 2 Log na semana 12) e HCV-RNA indetectável na 24ª semana de tratamento.
Não respondedor parcial	Indivíduo que apresenta RVP parcial (HCV-RNA detectável, porém com queda > 2 Log na semana 12) e HCV-RNA detectável na 24ª semana de tratamento.
Nulo de resposta	Indivíduo que não apresenta pelo menos RVP parcial (queda de pelo menos 2 Log do valor do HCV-RNA pré-tratamento, na 12ª semana de tratamento).

Fonte: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília: 2011.144 p.: il.

Pretende-se, com o tratamento, aumentar a expectativa e a qualidade de vida do paciente, diminuir a transmissão do VHC, interromper ou amenizar a evolução das lesões histopatológicas, melhorar a função hepática e reduzir a incidência de complicações como cirrose, carcinoma hepatocelular e óbito (SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

A evolução do tratamento da hepatite C levou à otimização quanto ao tempo de administração e eficácia dos fármacos, elevando consideravelmente as taxas de RVS. Inicialmente, o interferon (IFN), ministrado em monoterapia, apresentava taxa de RVS de cerca de 20% (SILVA, 2014).

Em 2011, em substituição à monoterapia, a Portaria do Ministério da Saúde nº 221 preconizou o tratamento com IFN- α convencional associado à ribavirina (RBV), um análogo de nucleosídeo da guanósina. Este foi definido apenas para os pacientes infectados pelo genótipo 2 ou 3 e que não apresentassem fatores preditivos de RVS baixa. Para os demais pacientes, infectados pelo genótipo 1 ou 4, considerados os mais difíceis de se tratar, e para os infectados pelo genótipo 2 ou 3 que apresentassem fatores preditivos de RVS baixa, foi estabelecida a terapia com interferon-alfa-peguilado (PEG-IFN α) associado à RBV. Este tratamento contribuiu para o aumento da RVS, apresentando uma eficácia em torno de 80% dos infectados com o genótipo 2 ou 3, e em 50% dos pacientes com o genótipo 1 (SILVA, 2014). No entanto, esse esquema terapêutico determinou inúmeras e frequentes alterações laboratoriais e reações adversas, algumas com risco de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016).

O Ministério da Saúde, através da Portaria nº 25, de 12 de novembro de 2013, aprovou o Suplemento 1 do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Hepatite Viral C e Coinfecções nº 221/11. Este PCDT preconiza, para o tratamento das formas crônicas da hepatite C, o telaprevir e boceprevir, medicamentos de ação direta pertencentes à classe de inibidores de protease (IP) de primeira geração. Estes fármacos, no entanto, levam à seleção de mutantes de resistência na NS3 protease, por isso são administrados em associação com PEG-IFN α /RBV (PR), constituindo assim uma terapia tripla (PR + IP) que visa reduzir o desenvolvimento de resistência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; SILVA, 2014).

O uso desses IP no SUS foi aprovado apenas para mono infectados pelo genótipo 1 do VHC, com fibrose hepática avançada (Metavir F3 e F4) (Quadro 03) ou cirrose hepática compensada (Child-Pugh \leq 6) (Quadro 04) e para pacientes que não foram submetidos a tratamento prévio com IP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; SILVA, 2014). Para os pacientes sem indicação de tratamento com IP, neste momento, recomenda-se avaliação clínico-laboratorial periódica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Metavir é um método que categoriza o grau de fibrose, de acordo com 5 classificações. Em uma escala de 0 a 4, o aumento da pontuação retrata um estágio mais avançado da fibrose, sendo que o F4 indica um quadro de cirrose hepática (BEDOSSA et al., 1996).

Quadro 03. Escore METAVIR para estadiamento da fibrose hepática

METAVIR	
Alteração histológica	Escore
Ausência de fibrose	F0
Expansão fibrosa portal sem septos	F1
Expansão fibrosa com raros septos	F2
Expansão fibrosa com numerosos septos, sem cirrose	F3
Cirrose	F4

Fonte: An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR. Cooperative study Group. *Hepatology*, 1996; 24: 289-293.

A classificação de Child-Pugh é utilizada para avaliar o prognóstico clínico da cirrose. É um sistema que emprega dois critérios clínicos e três critérios laboratoriais para a doença hepática. Cada critério é pontuado entre 1-3, com 3 indicando a condição mais severa. O escore de Child-Pugh é calculado pela soma dos pontos dos cinco fatores, e varia de 5 a 15. Escores 5 a 6 são a classe A de Child-Pugh e apontam para “cirrose compensada”, escores 7 a 9 indicam a classe B e escores 10 a 15 a classe C (CHOLONGITAS, et al., 2005).

Quadro 04. Escore de Child-Pugh

Cirrose- Fator de classificação de Child-Pugh	1 ponto	2 pontos	3 pontos
Bilirrubina sérica $\mu\text{mol/L}$	< 34 (< 2,0)	34-51 (2,0-3,0)	> 51(>3,0)
Albumina sérica, (g/dL)	> 35 (> 3,5)	30-35 (3,0-3,5)	< 30 (<3,0)
Ascite	Nenhuma	Facilmente controlada	Mal controlada
Distúrbio neurológico	Nenhum	Mínimo	Coma avançado
Tempo de protrombina (segundos de prolongamento)	0-4	4-6	> 6
RNI (razão normalizada internacional)	< 1,7	1,7- 2,3	> 2,3

Fonte: CHOLONGITAS, E; PAPTAEODORIDIS, GV; VANGELI, M; TERRENI, N; PATCH, D; BURROUGHS, AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis?. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 22 (11-12): 1079–89. Dec 2005.

O risco de resistência cruzada contraindica a substituição de um IP por outro. Portanto, ao constatar falha virológica, o tratamento deverá ser permanentemente descontinuado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013 – suplemento 2).

Não obstante à universalização do arsenal terapêutico, foram constatados resultados insatisfatórios como a limitação de resposta ao tratamento, terapia com duração prolongada, administração concomitante de medicamento injetável e de grande quantidade de comprimidos diariamente, além de vários efeitos adversos que exigem manejo de alta complexidade. Estes fatores levam à redução da qualidade de vida do paciente e decepcionam os profissionais de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

Em decorrência das inúmeras reações adversas inerentes à terapia tripla, os pacientes devem ser orientados antes de iniciar o tratamento e acompanhados nas semanas 2 e 4, em seguida, a cada 4 semanas. Estas consultas devem ser pautadas em uma avaliação clínica minuciosa pela equipe multidisciplinar e

apresentação de exames laboratoriais, visando a constante vigilância das complicações do tratamento e o cuidado integral ao paciente (SILVA, et al. 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Estes aspectos exigem do paciente uma atitude disciplinar e compreensão do profissional de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

As limitações inerentes à terapia tripla, associadas ao avanço do conhecimento da biologia molecular do VHC estimularam a descoberta de novas terapias antivirais. Nos últimos anos, houve o desenvolvimento de inúmeros inibidores específicos para o tratamento da hepatite C, os quais foram denominados Agentes Antivirais Diretos (DAA) (SILVA, 2014). O mecanismo de ação dos DAA não envolve o estímulo da resposta imune natural do organismo contra o vírus, sendo sua ação direcionada contra alvos moleculares do VHC, o que interrompe a replicação viral (SILVA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Esses agentes antivirais diretos apresentam maiores percentuais de cura, eficácia, segurança, tolerância e menor duração do que o arsenal terapêutico anterior (WHOa, 2016).

Em outubro de 2015, publicou-se o novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções, o qual disponibilizou, no âmbito do SUS, uma nova estratégia custo-efetiva para o tratamento da hepatite C (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015; WHOa, 2016). Análises baseadas em ensaios clínicos randomizados levaram à escolha de três DAA: sofosbuvir, simeprevir e daclatasvir, descontinuando, assim, o uso dos medicamentos de ação direta de primeira geração, boceprevir e telaprevir. O sofosbuvir é um análogo nucleotídico que inibe a polimerase do VHC; o simeprevir, um inibidor de protease de segunda geração; e o daclatasvir, um inibidor da NS5A. Estes medicamentos apresentam como eventos adversos, sintomas comuns e leves (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Para pacientes com fatores preditores de má resposta ao tratamento, como diabetes e obesidade, recomenda-se associar estes medicamentos com a ribavirina (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

Outros pacientes que se beneficiaram com a implementação dessa nova terapia da hepatite C foram os coinfectados com o HIV e os pacientes em etapa de pré- ou pós-transplante. Esses pacientes passaram a ser atendidos adequadamente, possibilitando melhoria na sua qualidade e expectativa de vida (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

1.3.7 Profilaxia

A inexistência de uma forma profilática pré- e pós-exposição ao vírus da hepatite C exige uma correta avaliação epidemiológica para elaboração de planos de ações de prevenção e controle da patologia. A determinação destas ações depende de uma complexa análise da distribuição global da doença, identificação de seus fatores de risco associados e previsão dos fatores que aceleram a evolução da doença (MARTINS, et al, 2011).

As principais medidas em termos de profilaxia que se tem até o momento estão relacionadas ao controle satisfatório dos doadores de sangue e à redução do risco de exposição ao vírus em locais de cuidados à saúde e em populações de alto risco (SILVA, et al., 2012; WHOa, 2016). Essa prevenção primária requer práticas seguras, que incluem o uso correto do preservativo e o não compartilhamento de instrumentos perfuro-cortantes e objetos de higiene pessoal, além da orientação aos pacientes sobre o risco inerente ao uso de drogas (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015). Quanto à prevenção secundária e terciária, envolvendo pessoas já infectadas pelo VHC, a OMS recomenda um melhor aconselhamento e ações educativas quanto às possibilidades do cuidado e tratamento; vacinação contra a hepatite A e B para evitar a coinfeção; tratamento adequado; e realização do diagnóstico precoce da doença (WHOa, 2016). Essas orientações devem permear todas as etapas do atendimento aos pacientes com VHC e serem repassadas aos familiares e parceiros sexuais (MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015).

A contribuição individualizada do profissional de saúde envolvido no atendimento aos infectados pelo VHC soma-se à grande perspectiva da OMS que visa a eliminação da hepatite viral como um problema de saúde pública, redução de novas infecções de hepatite viral em 90% e diminuição das mortes devido à hepatite viral em 65% até 2030. Com este propósito, a OMS apoia os países na promoção à sensibilização, estabelecimento de parcerias e mobilização de recursos, prevenção da transmissão e ampliação dos serviços de rastreio, cuidados e tratamento. A OMS estabelece, ainda, o Dia Mundial da Hepatite em 28 de julho de cada ano para uma maior conscientização e compreensão das hepatites virais (WHOa, 2016).

1.3.8 Resposta Imune

A infecção de uma célula hospedeira permite a replicação viral intensa, favorecendo o aparecimento de viremia (SOARES, 2006). Neste processo o VHC é reconhecido pelos mecanismos da resposta imune inata na tentativa de erradicar o vírus e minimizar os danos causados ao indivíduo infectado. A insuficiência da resposta imune de eliminar o vírus, conduz ao estabelecimento da infecção crônica, determinando assim o curso da doença (ZHU et al., 2003; CRUZ, 2013). A cronicidade da infecção pelo VHC e consequente prejuízo hepático não advém da destruição direta das células hepáticas pelo vírus, mas de uma resposta imunomediada que causa destruição celular e fibrose (SILVA, 2008). A escassez de modelos animais e/ou sistemas de cultura celular adequados para estudos sobre a resposta imune na infecção pelo VHC dificultam o conhecimento preciso dos componentes dessa resposta (THIO, 2008).

O evento inicial do mecanismo imunológico antiviral consiste na produção de interferon (IFN) alfa e beta e subsequente expressão de genes estimuladores de IFN (ISGs) que vão limitar a replicação do patógeno (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002; ZHU et al., 2003; SOARES, 2006; QUEIRÓZ, 2010; CRUZ, 2013). Os interferons atuam, ainda, na ativação de mecanismos protetores da infecção de células adjacentes e de substâncias com ação antiviral direta, como a proteína quinase, que inibe a síntese de proteínas, e a 2'5' oligoadenilato sintetase envolvida na degradação do genoma viral (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002).

A presença do vírus nas células induz a produção de outras citocinas que irão inibir a replicação viral, ativar as células residentes no local da infecção, recrutar células imunes inatas e ativá-las para desempenharem suas funções efetoras. A ativação e atração dessas células, incluindo neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, células natural killer (NK) e células NKT constituem a primeira linha de defesa da resposta imunológica. A ausência ou redução da atividade das células NK pode levar à maior suscetibilidade à infecção viral, sendo uma das principais contribuições a produção de IFN-gama (FREEMANN et al., 2001; AGRATI et al., 2002; SOARES, 2006; MEDZHITOV, 2007; MEDZHITOV, 2008). Esta citocina é importante para a ativação de outras células NK, macrófagos apresentadores de

antígeno e linfócitos B, assim como de elementos da imunidade adaptativa, a exemplo dos linfócitos T (SOARES, 2006).

À medida que a infecção viral progride, respostas imunes vigorosas e específicas são ativadas, com a presença de linfócitos T auxiliares, expansão de clones de células T citotóxicas e anticorpos secretados por linfócitos B (LECHNER et al., 2000; THIMME et al., 2001; CHANG, 2003; GUIDOTTI, CHISARI, 2006; SOARES, 2006). Na maioria dos pacientes, entretanto, a migração de células T para o fígado resulta na incapacidade de clarear a infecção. Como consequência, uma população de células T não-específicas é recrutada para o sítio da infecção, sendo essas as responsáveis pelas lesões crônicas (BERTOLETTI, MAINI, 2000). Outro aspecto determinante para cronicidade está em uma transição deficiente da imunidade inata para a adaptativa durante a infecção crônica pelo VHC (DOLGANIUC, SZABO, 2008).

O surgimento da resposta imune celular é detectado clinicamente através da elevação das aminotransferases séricas, constituindo a chamada lesão hepática imunomediada. O clareamento do VHC está relacionado à robusta resposta imune de células T CD4+ e CD8+, especialmente a resposta T CD4+, com liberação de citocinas Th1. Na forma crônica da doença, observa-se uma resposta fraca de células T CD4+, com baixa especificidade e pouca produção de citocinas Tipo 1 (GERLACH et al., 1999; RAY et al., 2005). A inflamação crônica é fator importante de ativação das células hepáticas estreladas, miofibroblastos e fibroblastos por citocinas, o que resulta em estímulo à fibrogênese. A perpetuação desse processo resulta, em última instância, na cirrose hepática (TAUB et al., 1999).

O fracasso do clareamento viral pode, também, ser atribuído ao escape da resposta imune inata (RAY et al., 2005). Dentre as proteínas virais associadas ao escape estão a protease NS3-4A, que bloqueia o reconhecimento de RNAs virais e inibe a produção de INF- β ; e as proteínas NS5A e E2 inibem a enzima PKR induzida pelo interferon para a resposta antiviral (TAYLOR et al., 1999; GIMENEZ-BARCONS et al., 2005; JOHNSON, GALE, 2006; QUEIRÓZ, 2010). Além das proteínas virais há, ainda, mutações de escape que têm sido relatadas em indivíduos crônicos (ERICKSON et al., 2001). Alguns epítomos reconhecidos pelo HLA (*Human Leukocyte Antigen* - Antígeno Leucocitário Humano) do hospedeiro passam a apresentar mutações de escape no momento em que é observado aumento na

carga viral no paciente, o que sugere que as células CD8⁺ promovam uma pressão seletiva nas proteínas virais, influenciando na replicação dos vírus (QUEIRÓZ, 2010). Mutações de proteínas virais imunogenicamente dominantes representam uma das principais estratégias de evasão, por dificultar o desenvolvimento de vacinas e por favorecer a persistência de infecções crônicas. Além das mutações virais e formação de quasispecies (FORNS et al., 1999; BOWEN, WALKER, 2005), os vírus podem interferir na ativação do complemento, na produção de anticorpos, na síntese de IFN-alfa e beta; podem também inibir o transporte de moléculas MHC de classe I para a membrana da célula infectada, além de codificar proteínas com homologia estrutural com receptores de superfície celular e/ou citocinas e seus receptores (SOARES, 2006)

Constata-se, portanto, que a inflamação pode representar distintos papéis no fígado infectado pelo VHC, dependendo do estágio em que a doença se encontra, aguda ou crônica. A atração de células T CD4⁺ e CD8⁺ por citocinas, contra diferentes epitópos virais, estão associadas à eliminação espontânea do VHC durante a fase aguda da infecção. Entretanto, durante a fase crônica, essas mesmas citocinas podem recrutar células inflamatórias para o fígado responsáveis por perpetuar a lesão hepática, levando à hepatite crônica com potencial fibrosante. Assim, a expressão das mesmas quimiocinas nas fases aguda e crônica da hepatite C afeta o curso da patologia (SOARES, 2006; ZEREMSKI et al., 2007).

1.3.8.1 Plaquetas e Sistema Imune

As plaquetas são fragmentos de células sanguíneas anucleadas que desempenham papel crucial como mediadores para a manutenção da hemostasia (ASSINGER, 2014; ALI et al., 2015). No entanto, as pesquisas vêm esclarecendo que as plaquetas contribuem para diversos processos imunológicos que se estendem para além da visão tradicional. Recentemente, dados demonstraram que as plaquetas são componentes efetores na resposta inflamatória, reguladores das respostas imunes inatas e adaptativas, participam da modulação da apresentação de antígeno e da intervenção contra ameaças microbianas (TRZECIAK-RYCZEK, et al., 2013; ASSINGER, 2014; ALI et al., 2015). Segundo ALI e colaboradores (2015)

as plaquetas devem ser vistas como o orquestrador subestimado do sistema imunológico.

As plaquetas interagem diretamente com leucócitos, células endoteliais e liberam mediadores inflamatórios que aumentam o recrutamento de leucócitos e desencadeia sua ativação (WEYRICH, et al., 2003; VON HUNDELSHAUSEN, WEBER, 2007; SEMPLE, et al., 2011; KARSHOVSKA, et al., 2013). Estas também expressam receptores de superfície, como lectinas, integrinas e receptores toll-like (TLR), permitindo que eles interajam diretamente com vários agentes patogênicos e, ainda, receptores Fc através dos quais podem reconhecer imunocomplexos (ASSINGER, 2014).

Infecções virais estão frequentemente associadas à trombocitopenia, representada por uma queda na contagem de plaquetas causada por redução na produção de plaquetas ou aumento da destruição plaquetária, com consequente aumento do risco de hemorragia. São inúmeras as estratégias usadas pelos vírus para reduzir os níveis de plaquetas circulantes (ASSINGER, 2014).

A via mais rápida de trombocitopenia causada por infecções virais ocorre por interação direta entre plaquetas e vírus através de uma variedade de receptores (FLAUJAC, et al., 2010; SPETH, et al., 2013). O vírus da hepatite C interage com plaquetas via receptores de colágeno GPVI. Esta interação direta frequentemente resulta na ativação plaquetária, adesão de plaquetas a leucócitos e consequente fagocitose das plaquetas (ZAHN, et al., 2006; KOUPENOVA, et al., 2014; MAUGERI, et al., 2014). A destruição de plaquetas em resposta a infecção pelo VHC pode ocorrer, ainda, devido à hipertensão na veia porta e ao aumento do sequestro de plaquetas pelo baço (ASTER, 1966). Além disso, a produção de anticorpos, que normalmente visam as glicoproteínas de superfície deste vírus, apresentam uma reatividade cruzada com integrinas de superfície de plaquetas, interferindo na sobrevivência plaquetária. Esta reatividade é denominada trombocitopenia induzida por auto-anticorpo plaquetário e foi descrita para vários outros vírus (GOEIJENBIER et al., 2012).

Em situações tardias da patologia, o dano ao tecido hepático provocado pelo VHC interfere diretamente na produção da trombopoietina (TPO), um hormônio glicoprotéico produzido pelo fígado e rins que estimula a produção e a diferenciação

de megacariócitos, células da medula óssea que se fragmentam em grandes números de plaquetas. A redução da síntese do TPO leva a um retardo no desenvolvimento de megacariócitos, resultando em trombocitopenia (AFDHA, et al., 2008). Outro mecanismo do VHC que provoca a redução do nível de plaquetas sanguíneas está associado à replicação deste vírus nos megacariócitos, o que pode aumentar a apoptose e reduzir a maturação dessas células (LI, et al., 1999; YANG, et al., 2005; FLAUJAC, et al., 2010; LUTTEKE, et al., 2010; PASSOS, et al., 2010; GIBELLINI, et al., 2013).

Sabe-se, ainda, que o VHC utiliza as plaquetas como um sistema de transporte seguro para atingir o fígado, onde a ativação plaquetária melhora a interação das plaquetas e hepatócitos, prolongando o tempo de infecção potencial do tecido hepático pelo vírus (ZAHN, et al., 2006).

As plaquetas e seus produtos liberados desempenham, portanto, um papel fundamental na retenção direta e indireta a infecção, exercendo funções imunes protetoras, mas simultaneamente sustentam a persistência do vírus e estão envolvidas em uma variedade de complicações inflamatórias em resposta à infecção viral. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão do papel das plaquetas. Esses estudos irão esclarecer se as interações vírus-plaquetas são benéficas para o hospedeiro ou para o vírus (ASSINGER, 2014; MORRELL, et al., 2014).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

As interações entre o VHC e o sistema imune do hospedeiro parecem ser determinantes para a história natural da infecção (REZENDE et al., 2008). Acredita-se, que essa associação vírus-componentes do sangue induz mecanismos de transmissão e conseqüente captação pelas células do hospedeiro. Tais aspectos, embora importantes, não são usualmente examinados em infecções virais crônicas, ainda que possam influenciar a resposta do hospedeiro frente à terapia antiviral (TEIXEIRA, MARTINS FILHO, 2005; OLIVEIRA, 2007).

O contexto dessa infecção, bem como as interações existentes entre o VHC e componentes sanguíneos em infecções crônicas e o impacto dessas associações na resposta do organismo frente ao tratamento precisam ser melhor compreendidos. Em consonância com as metas da OMS, o nosso grupo de pesquisa, em parceria com o Instituto Alfa de Gastroenterologia (IAG) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), coordenado pela Dra. Rosângela Teixeira, e com a Seção de Arbovírus do *Laboratory of Emerging Pathogens* (LEP), *Center for Biologics Evaluation and Research* (CBER), *US Food and Drug Administration* (FDA), coordenado pela Dra. Maria Rios visa melhor compreender a fisiopatologia da hepatite C, de forma a contribuir para a erradicação dessa doença, estabelecida como um grave problema de saúde pública mundial. O presente estudo propõe avaliar a cinética viral em componentes do sangue de pacientes cronicamente infectados pelo VHC, antes e durante a terapia tripla (interferon-peguilado/ribavirina e inibidor de protease). O estudo tem como hipótese que pacientes cronicamente infectados pelo VHC apresentam, à semelhança dos infectados assintomáticos avaliados por CHANCEY, et al. (2012), altas cargas virais associadas aos componentes sanguíneos. Esta associação pode estar relacionada com a falha terapêutica observada em um percentual dos pacientes. Cogita-se que a interação com componentes do sangue camufle o VHC, tornando-o imperceptível pelo sistema imune e, também, por técnicas laboratoriais que avaliem apenas amostras de soro. Esta hipótese poderia explicar resultados de carga viral negativos no início do tratamento e a repositivação próxima à 24ª semana de tratamento. A existência de carga viral em outros componentes do sangue que não o soro, indetectável por técnicas laboratoriais vigentes pode ter um destaque epidemiológico

importante. Essa carga residual pode representar um risco potencial de transmissão do VHC, visto que o paciente considerado curado poderia permanecer transmitindo o vírus sem ter consciência da sua real condição.

Espera-se, ainda, que o tratamento medicamentoso da infecção provoque uma alteração na cinética de interação do vírus com os componentes do sangue. Estes resultados irão proporcionar um entendimento maior da fisiopatologia do processo e da interação do vírus com os componentes do sangue. Esta abordagem trará uma grande contribuição para melhor compreensão da influência de mecanismos imunes associados à resposta virológica sustentada no tratamento da hepatite C crônica com a terapia tripla, até o momento não esclarecida na literatura científica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a cinética viral em componentes do sangue de pacientes sintomáticos cronicamente infectados pelo VHC, antes e durante a terapia tripla (interferon-peguilado/ribavirina e inibidor de protease).

3.2 Objetivos Específicos

Otimizar uma metodologia de PCR em tempo real *in house* para adaptação do kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA) para a execução da quantificação da carga viral de VHC em soro, sangue total, eritrócitos, plaquetas e leucócitos de pacientes com infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante terapia tripla;

Quantificar a carga viral de VHC em soro, sangue total, eritrócitos, plaquetas e leucócitos de pacientes com infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante terapia tripla;

Associar e correlacionar a carga viral de VHC com dados laboratoriais de pacientes com infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante terapia tripla.

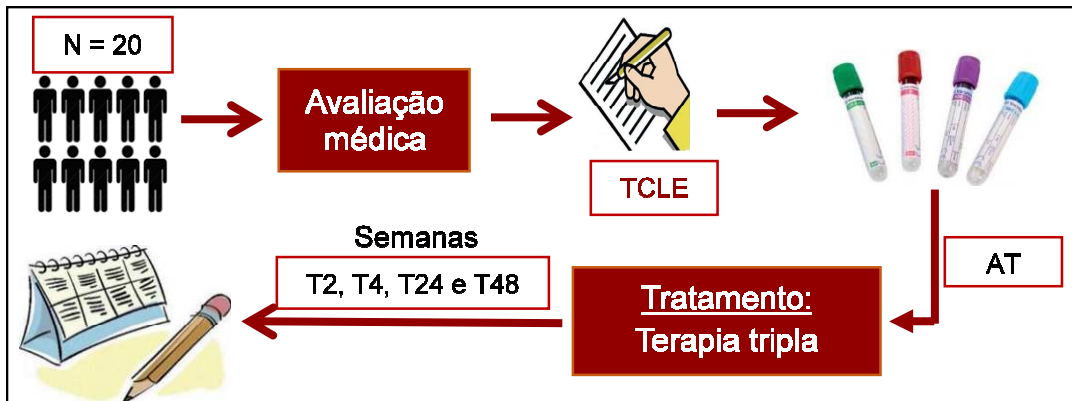
4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização da população avaliada

A população de estudo é constituída por todos os pacientes que poderiam ser submetidos ao tratamento, totalizando vinte pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica, infectados pelo VHC genótipo 1 e idade variando de 47 a 60 anos. Os pacientes foram recrutados e monitorados pelo período de 2014 a 2015, após concordarem em participar da pesquisa pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A). Os pacientes fizeram tratamento com terapia tripla: Interferon-alfa peguilado associado à ribavirina e um inibidor de protease (telaprevir ou boceprevir). Dos vinte pacientes, 16/20 (80%) usaram telaprevir e 04/20 (20%) usaram boceprevir. A definição do medicamento a ser utilizado foi realizada de acordo com os perfis dos pacientes, baseado nas regras preconizadas pelo PCDT para Hepatite Viral C e Coinfecções, sem qualquer diferença aparente entre os dois medicamentos que pudesse interferir nos resultados obtidos pelo estudo.

Estes pacientes concordaram que fossem colhidos 15 mL de sangue periférico antes do tratamento da hepatite C, realizado conforme o protocolo vigente do IAG do Hospital das Clínicas da UFMG. Outros 15 mL de sangue periférico foram coletados durante o tratamento nas seguintes semanas subsequentes ao seu início: 02^a, 04^a, 24^a e 48^a (Figura 07). Os tubos coletados foram imediatamente centrifugados conforme protocolo descrito a seguir.

Figura 07. Fluxograma das principais etapas de obtenção das amostras



Fluxograma do estudo evidenciando as principais etapas de obtenção das amostras: recrutamento dos pacientes, seguido da avaliação médica e apresentação do TCLE. Após concordar em participar do estudo através da assinatura do termo, procede-se a coleta de sangue antes de iniciar o tratamento, duas, quatro, vinte e quatro e quarenta e oito semanas após início da terapia tripla. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Procedimentos éticos

O projeto foi aprovado pelo COEP/UFMG#CAAE-15732513.0.1001.5149 (ANEXO B) com os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

4.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos vinte pacientes (n=20) com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica, através de sorologia anti-VHC positiva (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - de terceira geração) e pesquisa de RNA do VHC positiva (*Kit Abbott RealTime HCV*[®], Abbott Molecular, EUA), infectados pelo genótipo 1 do vírus. Estes exames foram realizados pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com hepatite C crônica coinfectados por outros vírus, tais como, o HIV e o HBV, bem como os pacientes que apresentassem outras formas de doença hepática crônica e cirrose hepática descompensada. Pacientes etilistas, ou seja, com consumo regular de álcool acima de 20g/dia (para o sexo feminino) e acima de 40g/dia (para o sexo masculino) também foram excluídos.

4.3 Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais

Os dados epidemiológicos e clínico-laboratoriais foram coletados dos prontuários dos pacientes. Foram obtidas informações relativas a aspectos demográficos (idade e gênero), provável modo de aquisição do vírus, tempo estimado de infecção, estadiamento da lesão hepática (grau de inflamação e estágio de fibrose hepática, número de traços portais e esteatose em ultrassonografia), aspectos virológicos (genótipo do vírus, carga viral antes e durante o tratamento), aspectos laboratoriais (hemograma e enzimas hepáticas) e de resposta terapêutica (sinais e sintomas clínicos durante o tratamento, alterações nas doses de medicações, uso de medicação estimulante de produção celular, resultado do tratamento).

4.3.1 Hemograma

Os resultados de hemograma foram obtidos através dos testes realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, utilizando-se as amostras de sangue total coletadas em EDTA. As análises foram realizadas no aparelho automático Cell-Dyn Rubi®. Foram incluídos no estudo os dados referentes à contagem global de leucócitos/mm³, contagem de hemácias/mm³, concentração de hemoglobina (g/dL) e contagem de plaquetas/mm³.

4.3.2 Dosagem de enzimas hepáticas

Os resultados de enzimas hepáticas foram obtidos através dos testes realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, utilizando-se amostras de soro. As análises foram realizadas em aparelhos automáticos da marca Vitrus® 5.1 ou Vitrus® 5.600. Foram incluídos no estudo as dosagem de alanina aminotransferase (ALT), de aspartato aminotransferase (AST) e de gama-glutamilttransferase (Gama GT) que foram expressas em UI/L.

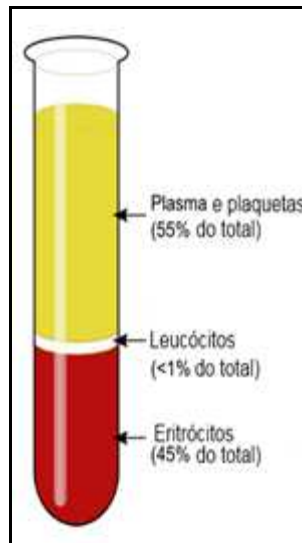
4.4 Quantificação da carga viral

4.4.1 Obtenção dos componentes sanguíneos

Para a quantificação da carga viral em soro, amostras de sangue foram coletadas em tubos sem anticoagulante, os quais foram centrifugados a 200 x g, 4°C por 20 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais). Em seguida, alíquotas de 250 µL (Pipetman Gilson, França) de soro foram transferidas para tubos livre de RNase, acrescidas de 1 mL (Pipetman Gilson, França) de Trizol LS (Liquid Samples) Reagent® (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_ls_reagent.pdf), homogeneizadas em vórtex (Scientific Industries, Nova York, EUA) e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da extração do RNA.

Para a separação dos demais componentes sanguíneos, procedeu-se o protocolo a seguir a partir do tubo contendo anticoagulante Ethylenediamine tetraacetic acid - Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Alíquotas de 250 µl (Pipetman Gilson, França) das amostras de sangue total foram transferidas para tubos livres de RNase (Ribonuclease) para a extração do RNA viral. O volume restante foi, então, centrifugado a 200 x g, 4°C por 20 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais) para a separação dos componentes do sangue: eritrócitos, plaquetas e leucócitos (Figura 08).

Figura 08. Demonstração dos componentes sanguíneos após centrifugação do sangue total



Demonstração esquemática da separação dos componentes sanguíneos após centrifugação. Fonte: <http://alunosonline.uol.com.br/biologia/plasma-sanguineo.html> (Adaptado).

O plasma obtido foi alíquotado em 250 μL (Pipetman Gilson, França) em tubos livre de RNAase. Com a finalidade de obter um concentrado de plaquetas, as alíquotas de plasma foram centrifugadas a 1500 x g, 4°C por 20 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais), obtendo-se uma fração de sobrenadante e um pellet de plaquetas. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 1500 x g, 4°C por 10 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais), obtendo-se a fração denominada Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). O pellet foi lavado com 1mL (Pipetman Gilson, França) de solução PBS (Phosphate Buffered Saline - Tampão fosfato-salino) e centrifugado 1500 x g, 4°C por 10 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais), obtendo-se, após retirada da solução, a fração Plasma Rico em Plaquetas (PRP).

O volume remanescente do sangue no tubo EDTA foi centrifugado a 1000 x g a 4°C por 10 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais) para obtenção dos leucócitos e hemácias. A fração plasmática foi armazenada, mas não avaliada neste estudo. O anel de leucócitos foi coletado com o auxílio de pipeta Pasteur de vidro e transferidos para tubos de 15 mL junto a 10 mL da solução de cloreto de amônio para a lise das hemácias remanescentes. O volume foi homogeneizado em vórtex (Scientific Industries, Nova York, EUA) seguida de

incubação em temperatura ambiente por 10 minutos e posterior centrifugação a 1400 x g, 4°C por 7 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 3 mL (Pipetman Gilson, França) de PBS, centrifugando novamente a amostra a 400 x g, 4°C por 7 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais). O sobrenadante foi desprezado e os leucócitos transferidos para tubos livre de RNAase.

Alíquotas de 250 µL (Pipetman Gilson, França) de hemácias coletadas do tubo de EDTA foram lavadas com 1 mL (Pipetman Gilson, França) de PBS e centrifugadas a 1500 x g, 4°C por 10 minutos (Thermo Electron Led GMBH, Belo Horizonte, Minas Gerais), sendo esse processo repetido por mais uma vez.

Às alíquotas de sangue total, PRP, PPP, leucócitos e hemácias foi acrescentado 1 mL (Pipetman Gilson, França) do reagente Trizol Reagent® (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf). Em seguida, as alíquotas foram homogeneizadas em vórtex (Scientific Industries, Nova York, EUA) por 20 segundos e acondicionadas em freezer a -80°C até o momento da extração do RNA. Destas frações supracitadas, apenas a fração PPP não foi avaliada neste estudo.

A distinção do uso do Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_ls_reagent.pdf) em soro ou plasma e o uso do Trizol Reagent® (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf) para os componentes celulares do sangue segue orientações da bula do reagente. Segundo o fabricante ambos reagentes apresentam composição e resultados similares. A única diferença entre estes reagentes está na concentração dos seus componentes. O Trizol LS Reagent® é mais concentrado e, por isso, recomendado para uso em amostras líquidas e aquosas, enquanto o Trizol Reagent® está recomendado para células ou tecidos.

4.4.2 Extração do RNA total

O kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA – Bula do kit disponível em: <https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv-package-insert.pdf>) é o kit preconizado pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico molecular da hepatite C. Este kit inclui outros kits que são: extração de RNA, controle e amplificação.

O ensaio padronizado pela empresa Abbott Molecular (EUA) para a extração do RNA do VHC ocorre em sistema automático e está recomendado para amostras em plasma ou soro. No entanto, o presente estudo propõe investigar a distribuição do VHC em cada um dos componentes sanguíneos e a inserção destes componentes celulares no equipamento poderia acarretar em algum prejuízo para o mesmo. Diante desta incompatibilidade, optamos por realizar a extração do RNA de todas as amostras utilizando o reagente trizol, seguindo as orientações do fabricante, mas mantendo a utilização do kit *Abbott RealTime HCV*[®] para a amplificação do RNA viral. Ao tomar esta decisão, foi necessário adaptar o preparo das amostras para a inclusão de reagentes importantes para a etapa de amplificação, como o Controle Interno (IC) e o Controle Positivo Alto (C++), mantendo o padrão de qualidade proposto pela Abbott Molecular (EUA).

O Controle Interno é um reagente presente no kit *Abbott RealTime HCV Amplification Reagent*[®] (Abbott Molecular, EUA – Bula do kit disponível em: <https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv-package-insert.pdf>) que constitui-se de uma sequência de RNA sem relação com a sequência alvo do VHC que é introduzida em cada uma das amostras no início da preparação da amostra. Esta sequência de RNA não relacionada é simultaneamente amplificada por RT-qPCR e serve de controle interno para demonstrar que o processo foi corretamente executado em cada uma das amostras. Dessa forma este reagente funciona como um elemento importante do controle de qualidade das reações e também como normalizador por apresentar amplificação constante, independente da amostra em análise.

O Controle Positivo Alto é um reagente presente no *kit Abbott RealTime HCV Control Kit*[®] (Abbott Molecular, EUA – Bula do kit disponível em:

<https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv-package-insert.pdf>) que constitui em alta concentração de RNA-VHC conhecida, solubilizada em plasma humano negativo.

Ainda quanto às recomendações da empresa Abbott Molecular (EUA), o protocolo para execução da extração do RNA estabelece um volume inicial de amostra de 1 mL. No entanto, não seria possível obter este volume de amostra para os componentes celulares propostos pelo estudo. Dessa forma, foi necessário realizar adaptações no procedimento, de forma a adequar às condições das amostras propostas. Frente a esta adequação, o volume de IC a ser acrescentado a cada amostra também foi recalculado. Todo o processo de adaptação do protocolo do kit *Abbott RealTime HCVt*[®] foi acompanhado pela assessoria científica da empresa, comunicação pessoal.

Seguindo às instruções do reagente trizol e adaptações estabelecidas, procedeu-se à execução da extração do RNA viral. A cada tubo contendo 250 µL (Pipetman Gilson, França) de amostra e 1 mL (Pipetman Gilson, França) de Trizol foram adicionados 8,5 µL (Pipetman Gilson, França) do Controle Interno (IC) e 91,5 µL (Pipetman Gilson, França) de Trizol LS Reagent[®] (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_ls_reagent.pdf).

O reagente Controle Positivo Alto (C++) também foi submetido à extração do RNA total, visto que este será utilizado para a construção da curva-padrão de diluição da RT-qPCR. Foi feita uma alíquota de 250 µL (Pipetman Gilson, França) do C++, ao qual foi acrescentado 1 mL (Pipetman Gilson, França) de Trizol LS Reagent[®] (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_ls_reagent.pdf) e uma solução contendo 102 µL (Pipetman Gilson, França) do Controle Interno (IC) e q.s.p. 200 µL (Pipetman Gilson, França) de Trizol LS Reagent[®] (Invitrogen, EUA – Bula do kit disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_ls_reagent.pdf). Em seguida, os tubos foram homogeneizados em vórtex (Scientific Industries, Nova York, EUA) e procedeu-se a extração do RNA total das amostras, de acordo com as instruções do fabricante.

A cada tubo contendo 250 µL (Pipetman Gilson, França) de amostra, 1 mL (Pipetman Gilson, França) de Trizol e 100 µL da solução de IC foram adicionados 200 µL de clorofórmio[®] (Merck, Alemanha). Os tubos foram vigorosamente homogeneizados por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 3 minutos e, a seguir, centrifugados a 16.100 x g, 4°C por 15 minutos (Eppendorf AG, Alemanha). Após centrifugação, a fração aquosa foi transferida para um novo tubo livre de RNase previamente identificado. A estes tubos foram acrescentados 500 µL (Pipetman Gilson, França) de isopropanol[®] (Merck, Alemanha) e 10 µL (Pipetman Gilson, França) de glicogênio (5 mg/mL – Ambion[™], by LifeTechnologies, EUA), que funcionará como carreador de RNA. Em seguida, os tubos foram vigorosamente homogeneizados e armazenados em freezer a -20°C *overnight*.

Após este período, os tubos foram centrifugados a 16.100 x g, 4°C por 45 minutos (Eppendorf AG, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL (Pipetman Gilson, França) de etanol[®] (Merck, Alemanha) 75% gelado. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 16.100 x g, 4°C por 15 minutos (Eppendorf AG, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem do precipitado com etanol foi repetido por mais duas vezes. Por fim, os tubos foram deixados abertos a temperatura ambiente para completa evaporação do etanol. Após esta etapa, as amostras de RNA total foram solubilizadas em 40 µL (Pipetman Gilson, França) de água livre de nucleasse (Qiagen, Alemanha) e armazenadas em freezer a -80°C.

4.4.3 PCR em Tempo Real – One Step

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando-se o *kit Abbott RealTime HCV Amplification Reagent[®]* (Abbott Molecular, EUA – Bula do kit disponível em: <https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv-package-insert.pdf>). Este kit executa a RT-qPCR em uma única etapa (One Step), utiliza o sistema de detecção TaqMan[®] (Applied Biosystems, EUA) e realiza uma reação em duplex para amplificação dos dois alvos, VHC e IC, simultaneamente na mesma reação. Como condição inerente à duplex, as sondas dos dois alvos estão marcadas com um fluoróforo diferente, permitindo assim a detecção simultânea em

cada ciclo dos produtos amplificados. As sondas do VHC estão marcadas com FAM-NFQ-MGB e as sondas IC com VIC-NFQ-MGB. Estes dados foram fornecidos pela assessoria científica da ABBOTT, comunicação pessoal.

A sequência alvo para o ensaio *Abbott RealTime HCV* encontra-se na região 5'UTR do genoma do VHC. Esta região é específica do VHC e encontra-se extremamente conservada. Os *primers* foram feitos para hibridizar na região 5'UTR com o menor número possível de não correspondências entre os genótipos 1 a 6 do VHC.

A sequência alvo do IC foi obtida a partir do gene reductase hidroxipiruvato da abóbora, *Cucurbita pepo*, e é distribuída em uma partícula de Armored RNA^{®1} diluída em plasma humano negativo.

Segundo o fabricante, Abbott Molecular (EUA), esta etapa, assim como a extração do RNA, ocorre em sistema automático próprio. No entanto, neste estudo foi utilizado equipamento disponível no Instituto René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – MG, o termociclador ViiA™ 7 System (Applied Biosystems, EUA).

Em consonância com as adaptações de redução para um quarto de amostras e reagentes realizadas no protocolo de extração RNA do VHC, foram realizados testes para igual redução no volume final da reação de RT-qPCR. Os testes incluíram volumes de 100 µL (volume indicado pelo fabricante) e de 25 µL (volume a ser utilizado na reação adaptada).

A reação foi realizada, portanto, em um volume total de 25 µL (Pipetman Gilson, França), sendo que as amostras analisadas foram processadas em duplicatas. O mix da reação foi preparado através do acréscimo de 271 µL (Pipetman Gilson, França) do reagente 1 (reagente de ativação) e 949 µL (Pipetman Gilson, França) do reagente 2 (reagente de oligonucleotídeos do VHC) ao volume presente no frasco do reagente 3 (enzima rTth polimerase termoestável). Cada reação é composta por 12,5 µL (Pipetman Gilson, França) do mix preparado e 12,5 µL (Pipetman Gilson, França) do RNA anteriormente extraído.

¹Armored RNA[®] é uma tecnologia patenteada desenvolvida em conjunto por Ambion, Inc. e Cenetron Diagnostics, LLC. Patentes norte-americanas #5.677.124, #5.919.625, #5.939.262 e patentes pendentes. Armored RNA é marca comercial registrada de Ambion, Inc.

As reações foram processadas no termociclador ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), com programa em 4 etapas para a síntese do cDNA e subsequente amplificação do material genético. A primeira etapa é composta por 1 ciclo de 59°C por 30 minutos; a segunda etapa por 4 ciclos com ciclagens de 95°C por 40 segundos e 46°C por 30 segundos; a terceira etapa por 6 ciclos com ciclagens de 92°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos; a quarta etapa composta por 37 ciclos com ciclagens de 92°C por 30 segundos, 56°C por 90 segundos e 35°C por 40 segundos. A velocidade de incremento da rampa de temperatura foi ajustada para 1,6°C.

Para a quantificação da RT-qPCR, foi construída uma curva-padrão com alíquotas de concentrações conhecidas do alvo molecular objeto do estudo. Estas alíquotas foram preparadas utilizando-se o Controle Positivo Alto presente no kit *Abbott RealTime HCV Control*® (Abbott Molecular, EUA – Bula do kit disponível em: <https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv-package-insert.pdf>). Diluições seriadas 1:10 do RNA deste controle foram realizadas para obtenção da curva-padrão composta por 6 pontos, partindo da carga viral de 1.318.257,00 UI/mL a 13,183 UI/mL, sendo este, o limite de detecção mínimo. Esta curva foi construída em triplicata em todas as corridas realizadas para análise da totalidade das amostras dos paciente em estudo.

Os resultados foram analisados com o auxílio do software QuantStudio™ Real-Time PCR, versão 1.1 (Applied Biosystems, EUA) e expressos como UI de carga viral/mL de soro, sangue total ou componentes testados. Para as amostras que a quantificação da carga viral ultrapassou o valor máximo da curva-padrão, foi realizada a diluição necessária para que o valor se enquadrasse ao valor máximo da curva-padrão e ao final, esta quantificação foi corrigida pelo fator de diluição para obtenção da real carga viral presente na amostra.

As quantificações referentes às hemácias, plaquetas e leucócitos foram ajustadas e normalizadas de acordo com a contagem de cada um dos componentes, realizada por exame de hemograma do sangue de todas as coletas dos pacientes participantes do estudo.

4.5 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Para a análise comparativa entre os grupos foi empregado teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Os dados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais antes da terapia tripla

Tabela 01. Características epidemiológicas e clínico-laboratoriais apresentadas pelos pacientes com infecção crônica pelo VHC avaliados durante o estudo, antes do início da terapia tripla

Características	Pacientes VHC
Idade (anos)	47 – 60
Sexo	
Masculino	13/20 (65,0%)
Feminino	07/20 (35,0%)
Carga Viral (UI/mL)	155.669,0 – 9.411.641,0
Genótipo	
1a	06/20 (30,0%)
1b	14/20 (70,0%)
Estágio de fibrose	
F2	04/20 (20,0%)
F3	09/20 (45,0%)
F4	04/20 (20,0%)
Ignorado	03/20 (15,0%)
Provável modo de aquisição do VHC	
Hemotransfusão	07/20 (35,0%)
Droga injetável	03/20 (15,0%)
Material médico não descartável	03/20 (15,0%)
Sexual	01/20 (5,0%)
Tatuagem	01/20 (5,0%)
Ignorado	05/20 (25,0%)
Tempo (anos) estimado de infecção pelo VHC	22,0 – 38,0 (80,0%)
Ignorado	04/20 (20,0%)

Sinais e sintomas clínicos apresentados durante
a terapia tripla

Prurido Cutâneo	8,0%
Fadiga	7,0%
Náusea	7,0%
Astenia	6,0%
Rash	6,0%
Vômitos	6,0%
Hiporexia	5,0%
Insônia	3,0%
Prurido anal	3,0%
Fraqueza	3,0%
Assintomático	12,0%

Dados epidemiológicos e clínico-laboratoriais coletados dos prontuários dos pacientes com infecção crônica pelo VHC avaliados durante o estudo, antes do início da terapia tripla. Fonte: Serviço de acompanhamento laboratorial do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas - UFMG.

A Tabela 01 mostra os dados epidemiológicos e clínico-laboratoriais de pacientes com infecção crônica pelo VHC em uso da terapia tripla, avaliados durante o estudo. No início do estudo, os pacientes possuíam idade entre 47 e 60 anos (média \pm DP de $58,5 \pm 5,7$ anos e mediana de 59,5 anos). Quanto ao sexo, a maioria dos pacientes 13/20 (65,0%) eram do sexo masculino e 07/20 (35,0%) eram do sexo feminino. A carga viral inicial variou entre 155.669,0 a 9.411.641,0 UI/mL (média \pm DP de $2.505.842,0 \pm 2.607.632,6$ UI/mL e mediana 1.452.284,5 UI/mL). Todos os pacientes incluídos no estudo possuíam o vírus de genótipo tipo 1, sendo subdivididos em 06/20 (30,0%) com genótipo 1a e 14/20 (70,0%) com o genótipo 1b. Quanto ao estágio de fibrose apresentado pelos pacientes no início da terapia tripla, observa-se que 04/20 (20,0%) apresentavam F2, 09/20 (45,0%) F3, 04/20 (20,0%) F4 e, portanto, cirrose, e 03/20 (15,0%) ignoravam esta informação.

O provável modo de aquisição da infecção pelo VHC apresentou o seguinte perfil relatado pelos pacientes do estudo: 07/20 (35,0%) por hemotransusão, 03/20 (15,0%) por uso de droga injetável, 03/20 (15,0%) por uso de material médico não

descartável, 01/20 (5,0%) por via sexual e 01/20 (5,0%) por tatuagem; em 05/20 (25,0%) não foi possível identificar o provável modo de aquisição do vírus.

O tempo estimado de infecção pelo VHC variou de 22,0 a 38,0 anos (média \pm DP de 32,1 anos e mediana de 34,0 anos); em 04/20 (20%) casos não foi possível estimar o tempo de infecção.

Ao avaliar o número de tratamentos anteriores contra o vírus VHC submetidos pelos pacientes com infecção crônica pelo vírus, observou-se que em 08/20 (40,0%) pacientes não haviam sido realizado tratamento anterior contra o VHC; 09/20 (45,0%) haviam realizado tratamento anterior e 03/20 (15,0%) já haviam realizado dois tratamentos anteriores ao atual.

Ao longo da terapia tripla, 12,0% dos pacientes permaneceram assintomáticos. Aqueles pacientes que apresentaram alguma alteração relataram em prontuário 45 (quarenta e cinco) tipos diferentes de sinais e sintomas clínicos. Os dez sinais e sintomas mais frequentes foram prurido cutâneo (8,0%), fadiga e náusea (7,0% cada um), astenia, *rash* e vômitos (6,0% cada um), hiporexia (5,0%), insônia (3,0%), prurido anal e fraqueza (3,0% cada um).

A Tabela 02 apresenta os valores laboratoriais, em mediana, dos pacientes com infecção crônica pelo VHC em uso da terapia tripla, avaliados durante o estudo. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos.

Tabela 02. Aspectos laboratoriais apresentados pelos pacientes com infecção crônica pelo VHC em uso de terapia tripla

Parâmetro laboratorial	AT	T2	T4	T24	T48
Global de Leucócitos (/mm ³)	4.980	4.500	3.020*	2.400*	2.500*
Hemácias (milhões/mm ³)	5,14	4,49	3,75*	3,58*	3,30*
Hemoglobina (g/dL)	15,35	13,60	11,30*	11,50*	10,55*
Plaquetas (/mm ³)	137.000	110.000	88.000*	87.000*	79.000*
ALT (U/L)	83,0	45,5	42,5*	28,5*	28,0*
AST (U/L)	74,5	49,5	40,5*	34,0*	33,0*
Gama GT (U/L)	73,2	54,0	64,0	53,0	27,0*

Aspectos laboratoriais apresentados pelos pacientes com infecção crônica pelo VHC em uso de terapia tripla. Os valores dos parâmetros laboratoriais estão em mediana. As medianas foram obtidas a partir dos valores coletados dos prontuários dos pacientes em uso da terapia tripla, do Serviço de acompanhamento laboratorial do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em tratamento em relação ao grupo antes do tratamento estão representadas por asteriscos. Valores de referência: Global de Leucócitos - Valor de referência: 4.000 a 10.000/mm³; Hemácias - Valor de referência: Masculino: 4,5 a 6,5 milhões/mm³, Feminino: 3,9 a 5,6 milhões/mm³; Hemoglobina - Valor de referência: Masculino: 13,5 a 18g/dL Feminino: 11,5 a 16,4g/dL; Plaquetas - Valor de referência: 150.000 a 450.000/mm³; ALT - Valor de referência: Masculino: até 41U/L, Feminino: até 31U/L; AST - Valor de referência: Masculino: até 38U/L, Feminino: até 32U/L; Gama GT - Valor de referência: Masculino: 11 a 50UI/L, Feminino: 7 a 32UI/L. Fonte: BELO HORIZONTE. Secretaria Municipal de Saúde. Manual de exames laboratoriais da rede SUS-BH. Belo Horizonte: Secretaria Municipal de Saúde, 2016. 201 p.

A análise das contagens da global de leucócitos, número absoluto de hemácias e de plaquetas e o nível de hemoglobina demonstraram uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento.

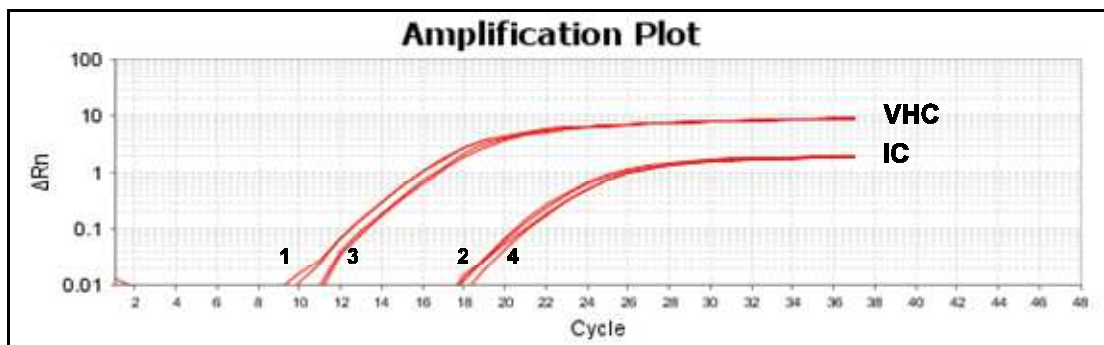
As análises dos níveis de ALT e de AST demonstraram uma redução significativa desse parâmetro nas semanas 4 a 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento. Já a análise dos níveis de Gama GT) demonstrou uma redução significativa desse parâmetro apenas na semana 48 após o início do tratamento, quando comparado aos valores antes do tratamento.

5.2 Teste de adequação do kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA)

Previamente à realização do protocolo com as amostras dos pacientes em estudo utilizando o kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA), foram necessários testes de verificação de conformidade das adaptações no procedimento de execução do citado kit.

Inicialmente, seria importante verificar se a redução do volume de amostra de 1 mL para 250 μ L, mantendo as proporções de reagentes e a amostra em soro propostos pelo fabricante, resultaria em uma boa amplificação do material genético do VHC. Este teste responderia, ainda, se haveria boa amplificação do Controle Interno utilizado e se a amplificação teria boa efetividade diante da alteração do processo de extração do RNA. Concomitantemente, foi verificado se a redução proporcional dos reagentes de amplificação para um quarto do volume final da reação de RT-qPCR, proposta pelo fabricante, acarretaria em prejuízos quali/quantitativos. Os resultados provenientes deste teste estão esboçados no Gráfico 01.

Gráfico 01. Curva de amplificação do material genético do VHC e Controle Interno



As curvas identificadas por 1 e 3 representam as duplicatas da amplificação do material genético do VHC, proveniente do Controle Positivo Alto, com volumes de 100 μ L e 25 μ L respectivamente. As curvas 2 e 4 representam as duplicatas da amplificação do Controle Interno, com volumes de 100 μ L e 25 μ L respectivamente.

Os testes foram realizados com alíquotas do Controle Positivo Alto, em duplicata, sendo a duplicata identificada pelo número 1 correspondente à amplificação do material genético do VHC, com volume final de reação RT-qPCR de

100 µL. A duplicata identificada como 2 corresponde ao Controle Interno das reações 1, realizada em duplex. A duplicata identificada pelo número 3 corresponde à amplificação do material genético do VHC, com volume final de reação RT-qPCR de 25 µL. A duplicata identificada como 4 corresponde ao Controle Interno das reações 3, realizada em duplex. Na Tabela 03 estão apresentados os principais dados referentes a estas reações, as quais apresentaram, idealmente, desvio padrão inferior à 0,5.

Tabela 03. Dados da amplificação das reações teste de adequação do kit Abbott RealTime HCV® (Abbott Molecular, EUA)

Identificação da reação	Volume final da reação (µL)	Alvo	Ct das duplicatas	Ct Médio
1	100	VHC	15,992	16,060
			16,128	
2	100	IC	22,093	22,156
			22,219	
3	25	VHC	15,315	15,292
			15,268	
4	25	IC	21,714	21,620
			21,525	

A tabela apresenta os valores de Ct das duplicatas e o Ct médio das reações teste de adequação do kit Abbott RealTime HCV® (Abbott Molecular, EUA).

A Tabela 03 apresenta os resultados das quantificações teste para adequação do kit Abbott RealTime HCV® (Abbott Molecular, EUA). Neste teste, cuja curva de amplificação está exposta pelo Gráfico 01, foram avaliados os alvos VHC e IC, com volumes finais de 100 µL, como proposto pelo fabricante, e de 25 µL na

tentativa de otimizar o kit citado. O Ct médio da amplificação de VHC com volume final de 100 μ L foi 16,060 e o Ct médio deste mesmo alvo com volume final de 25 μ L foi 15,292. O Ct médio da amplificação de IC com volume final de 100 μ L foi 22,156 e o Ct médio deste mesmo alvo com volume final de 25 μ L foi 21,620.

Observa-se que a redução do volume de amostra inicial de 1 mL para 250 μ L foi adequada à detecção do material genético viral, visto que as médias dos Cts das duplicatas dos dois avlos apresentaram valores adequados, considerando um total de 37 ciclos de amplificação. Para o IC obteve-se média de Ct de 22,156, também considerado um valor adequado. A amplificação satisfatória do IC demonstrou que todo o processo, desde a extração do RNA até a amplificação do material genético, foi corretamente executado. Esta constatação consolida a utilização do reagente trizol como uma boa opção para a extração do RNA-VHC presente nas amostras.

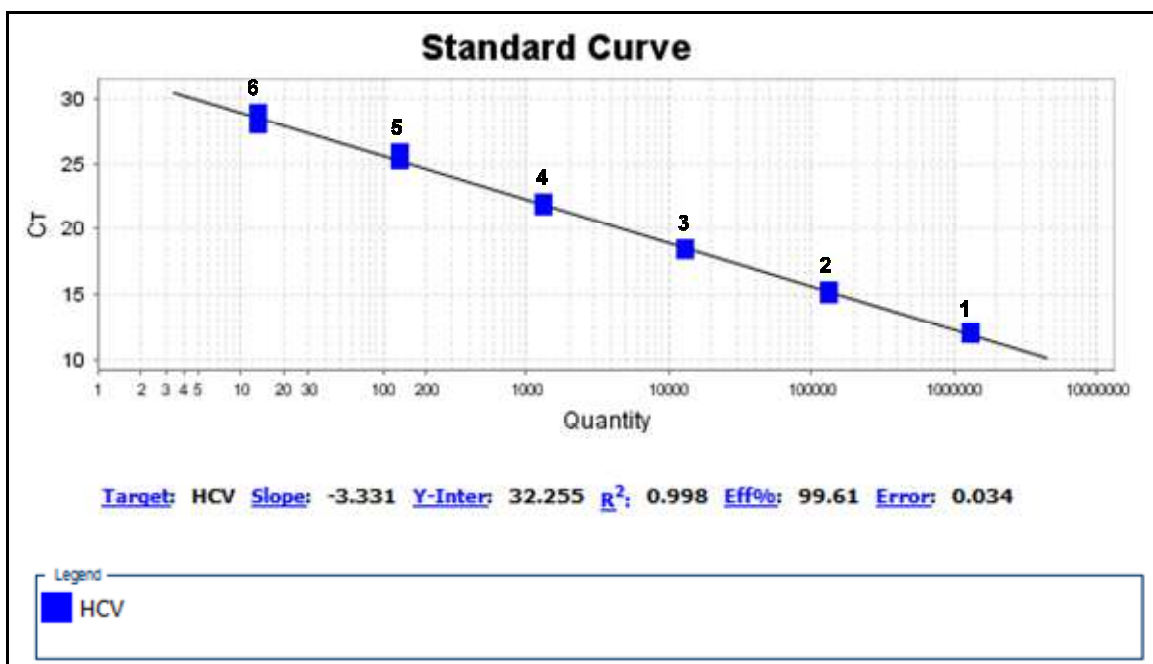
Neste mesmo teste, foi verificado se a redução proporcional dos reagentes de amplificação para um quarto do volume final da reação de RT-qPCR, proposta pelo fabricante, acarretaria em prejuízos quali/quantitativos. A análise comparativa das curvas de amplificação (Gráfico 01) dos alvos VCH e IC com volume final de reação de 100 μ L, identificadas pelos números 1 e 2, com as curvas dos mesmos alvos com volume de reação de 25 μ L, identificadas pelos números 3 e 4, permite a visualização da semelhança entre elas. A constatação desta similaridade se dá pela comparação dos valores de Ct apresentados na Tabela 03. A duplicata das reações de volume 100 μ L apresentou Ct médio de 16,060 para VHC e de 22,156 para IC, enquanto a duplicata das reações de volume 25 μ L apresentou Ct médio de 15,292 para VHC e de 21,620 para IC. Ao comparar estes valores observa-se diferença menor que 1 Ct tanto para VHC quanto para IC, o que leva à conclusão de que a redução do volume de amostra para 250 μ L não acarretou em prejuízos quali/quantitativos na detecção da amplificação dos alvos em estudo.

5.3 Curva-padrão

Para a quantificação da RT-qPCR, foi construída uma curva-padrão com alíquotas de concentrações conhecidas do alvo molecular objeto do estudo,

utilizando-se o Controle Positivo Alto presente no kit *Abbott RealTime HCV Control*[®] (Abbott Molecular, EUA – Bula do kit disponível em: <https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/realtime-hcv-package-insert.pdf>). Esta curva foi construída e amplificada por RT-qPCR com reações em triplicata e composta por 6 pontos. Para todas as amplificações das reações com as amostras dos pacientes em estudo, foi construída e amplificada, concomitantemente, uma curva-padrão. Uma das curvas-padrão obtidas está apresentada pelo Gráfico 02. Todas as demais curvas-padrão apresentaram perfis semelhantes.

Gráfico 02. Curva-padrão obtida pela diluição seriada (1:10) do Controle Positivo Alto presente no kit *Abbott RealTime HCV Control*[®] (Abbott Molecular, EUA), composta por 6 pontos, em triplicata



O gráfico apresenta a curva-padrão do VHC utilizando o Controle Positivo alto presente no kit Abbott RealTime HCV[®] (Abbott Molecular, EUA). A curva demonstra quantificação x Ct, é composta por 6 pontos em triplicata, com concentração de carga viral de 1.318.257,00 UI/mL a 13,183 UI/mL, em diluição seriada 1:10.

A curva-padrão (Gráfico 02) apresenta os resultados obtidos por quantificação versus Cycle Threshold (Ct). O Ct representa o ponto em que a linha de amplificação da amostra cruza com o limiar de detecção, o threshold. Este ponto determina o

número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo.

Os 6 pontos das diluições seriadas 1:10 do RNA-VHC da curva padrão (Gráfico 02) estão identificados pelos números 1 a 6, sendo que o número 1 indica o ponto de maior concentração, com carga viral de 1.318.257,000 UI/mL e o número 6 o de menor concentração, com carga viral de 13,183 UI/mL, sendo este, o limite de detecção mínimo. O gráfico apresenta, ainda, informações importantes como o coeficiente angular da reta (*slope*), o coeficiente de correlação (R^2), a eficiência de amplificação e erro da curva de amplificação. Na Tabela 04 estão apresentados os principais dados referentes à amplificação da curva-padrão.

Tabela 04. Dados da curva-padrão – VHC

Identificação do ponto na curva	Quantificação da carga viral (UI/mL)	Ct médio da triplicata	Desvio Padrão
1	1.318.257,000	11,939	0,093
2	131.825,700	15,096	0,133
3	13.182,570	18,457	0,060
4	1.318,257	21,899	0,134
5	131,826	25,381	0,348
6	13,183	28,399	0,467

A tabela apresenta os valores de Ct médio das triplicatas da curva-padrão do VHC e do desvio padrão, correspondentes às diluições seriadas 1:10, que variaram de 1.318.257,000 UI/mL a 13,183 UI/mL.

A Tabela 04 apresenta os valores de Ct médio das triplicatas e do desvio padrão de cada um dos 6 pontos para obtenção da curva-padrão. O ponto de maior concentração da carga viral (1.318.257,000 UI/mL) teve Ct de 11,939 e desvio padrão de 0,093. O ponto de menor concentração da carga viral (13,183 UI/mL) teve Ct de 28,399 e desvio padrão de 0,467.

5.4 Análise dos dados da quantificação da carga viral

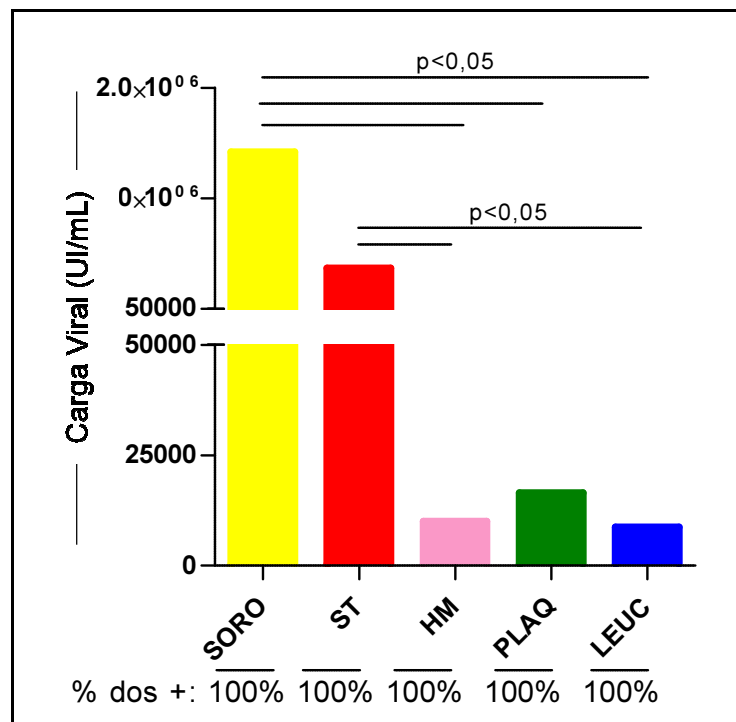
A análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C será apresentada sob quatro vertentes distintas, que são:

- ✓ Abordagem por tempo;
- ✓ Abordagem por componente sanguíneo;
- ✓ Abordagem por nível da carga viral;
- ✓ Abordagem por desfecho clínico.

5.4.1 Abordagem por tempo

A análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes do tratamento, pela variável tempo, foi realizada considerando valores das medianas de cada um dos componentes sanguíneos (Figura 09). A estratificação das cargas virais em altas e baixas foram definidas com base no valor da mediana global dos componentes sanguíneos. Para a obtenção da mediana global foi calculada a mediana de todos os dados obtidos em cada um dos tempos de tratamento dos cinco componentes sanguíneos avaliados neste estudo. Ao final obteve-se, portanto uma mediana com os dados de antes de iniciar a terapia, outra com os dados da segunda semana de tratamento e assim sucessivamente até a quadragésima oitava semana. Os valores acima das medianas globais foram considerados altos e os valores abaixo considerados baixos.

Figura 09. Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes de iniciar o tratamento – abordagem por tempo



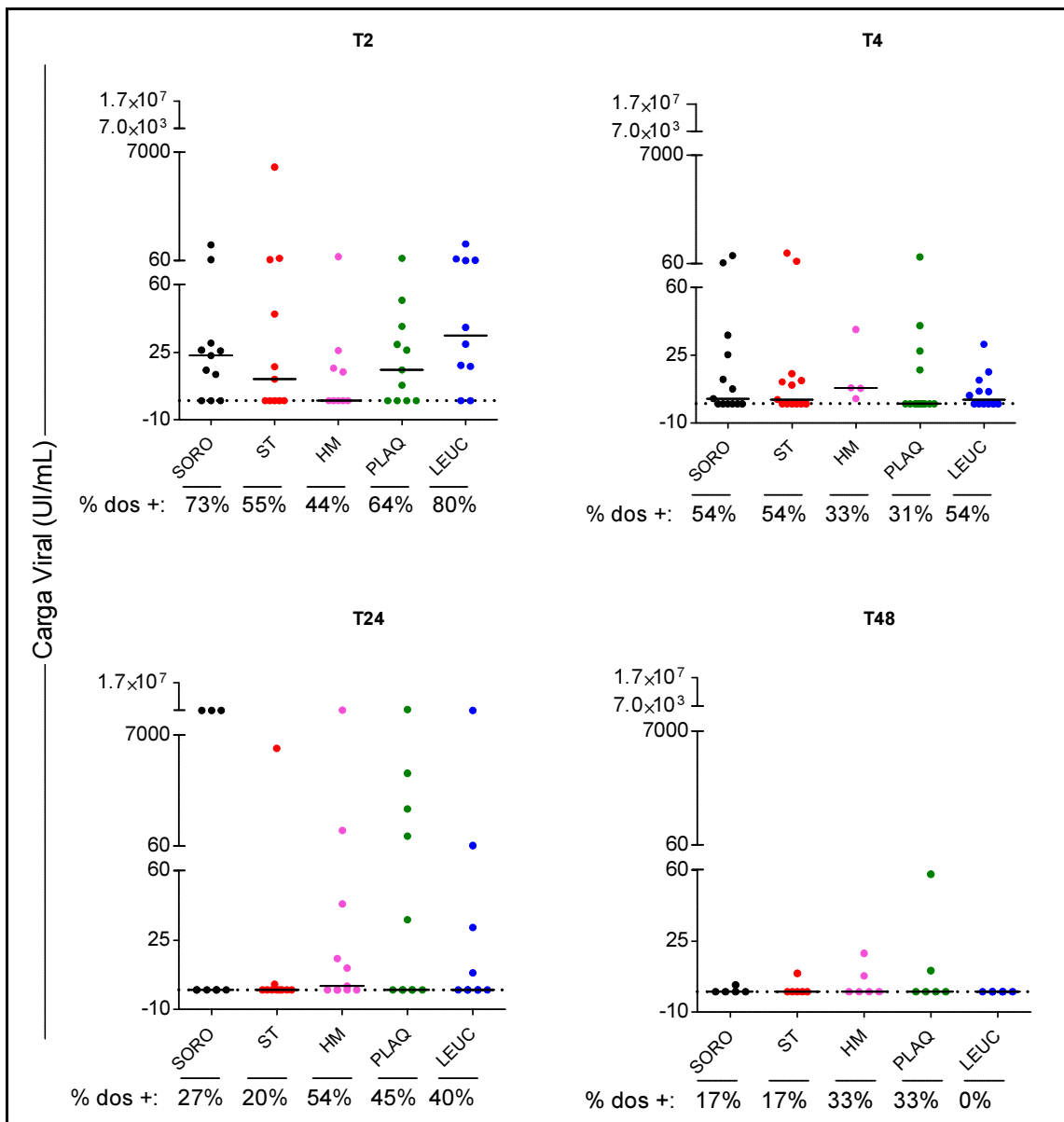
Análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total (ST), hemácias (HM), plaquetas (PLAQ) e leucócitos (LEUC) de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C antes de iniciarem o tratamento com a terapia tripla. Os resultados representam os valores da mediana da carga viral em UI/mL em formato de gráficos em barras. Abaixo dos gráficos estão os percentuais de representatividade das amostras positivas para VHC. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas por linhas.

Os resultados demonstraram que, antes de iniciar a terapia tripla (Figura 09), o grupo de pacientes apresentava cargas virais elevadas em todos os componentes do sangue. O soro e o sangue total foram as frações com cargas virais maiores, apresentando medianas acima de $1,0 \times 10^6$ e 400.000 UI/mL respectivamente. As demais frações: hemácias, plaquetas e leucócitos apresentaram medianas de cargas virais em torno de 10.000, 16.000 e 9.000 UI/mL, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar as quantificações das cargas virais do soro com hemácias, soro com plaquetas, soro com leucócitos, sangue total com hemácias e sangue total com leucócitos.

A partir da segunda semana após início do tratamento os dados de abordagem por tempo serão apresentados em gráficos de dispersão, sendo cada ponto representando um paciente (Figura 10). As barras cheias nos gráficos

representam a mediana de cada um dos componentes do sangue no respectivo tempo de tratamento. Os valores acima de cada uma das medianas foram considerados altos e os valores abaixo considerados baixos.

Figura 10. Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta das semanas 2, 4, 24 e 48 de tratamento – abordagem por tempo



Análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total (ST), hemácias (HM), plaquetas (PLAQ) e leucócitos (LEUC) de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C na 2^a semana (T2), 4^a semana (T4), 24^a semana (T24) e 48^a semana (T48) de tratamento com a terapia tripla. Os resultados apresentam os valores absolutos da carga viral em UI/mL em formato de gráficos de dispersão. Cada ponto representa um paciente, cada cor um componente sanguíneo e os traços cheios marcam a mediana das cargas. Não houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos apresentados.

Na segunda semana (T2) (Figura 10) de tratamento a carga viral teve uma queda brusca em todos os componentes sanguíneos, quando comparado aos valores de antes do início da terapia. A maioria dos pacientes apresentaram níveis de cargas virais abaixo de 2.000 UI/mL em todos os componentes. Apenas um paciente teve carga viral acima de 6.000 UI/mL no sangue total. Os componentes que tiveram maior mediana de carga viral foram os leucócitos, seguido do soro, plaquetas, sangue total e a menor mediana nas hemácias, os quais apresentaram medianas superiores a 33 UI/mL, 23 UI/mL, 15 UI/mL, 11 UI/mL e nula, respectivamente. Observou-se que 80% dos pacientes apresentaram positividade de VHC nos leucócitos, 73% apresentavam positividade no soro, 64% nas plaquetas, 55% no sangue total e 44% nas hemácias.

Após quatro semanas do início do tratamento (T4) (Figura 10) houve redução das cargas virais dos componentes sanguíneos, quando comparado à segunda semana de tratamento, apresentando nível máximo de carga viral abaixo de 1.000 UI/mL. Nas hemácias, no entanto, observou-se aumento da mediana da carga viral. Houve redução da positividade de pacientes em todos os componentes sanguíneos sendo que 54% dos pacientes apresentaram positividade de VHC no soro, 54% apresentavam positividade no sangue total, 33% nas hemácias, 31% nas plaquetas e 54% nos leucócitos.

Após vinte e quatro semanas do início da terapia tripla (T24) (Figura 10) as medianas das cargas virais se tornaram nulas nos componentes do sangue, exceto nas hemácias. A referida nulidade da carga viral refere-se a uma depuração viral sérica pelo sistema imune dos pacientes infectados pelo VHC. Esta constatação evidencia que a maioria dos pacientes apresentaram cargas virais nulas neste momento da terapia em todos os componentes sanguíneos. Um grupo de pacientes, no entanto, obtiveram aumento da carga viral para níveis de 2.000 UI/mL. Dentre esses pacientes, está um dos pacientes que apresentou Resposta Viroológica Parcial, o qual apresentou aumento nos níveis de cargas virais no soro e nas hemácias e plaquetas. Mas há também pacientes que atingiram RVS. Quanto aos percentuais de positividade dos pacientes, observou-se aumento nas hemácias de 33% para 54% e nas plaquetas de 31% para 45%. Nos demais componentes observou-se

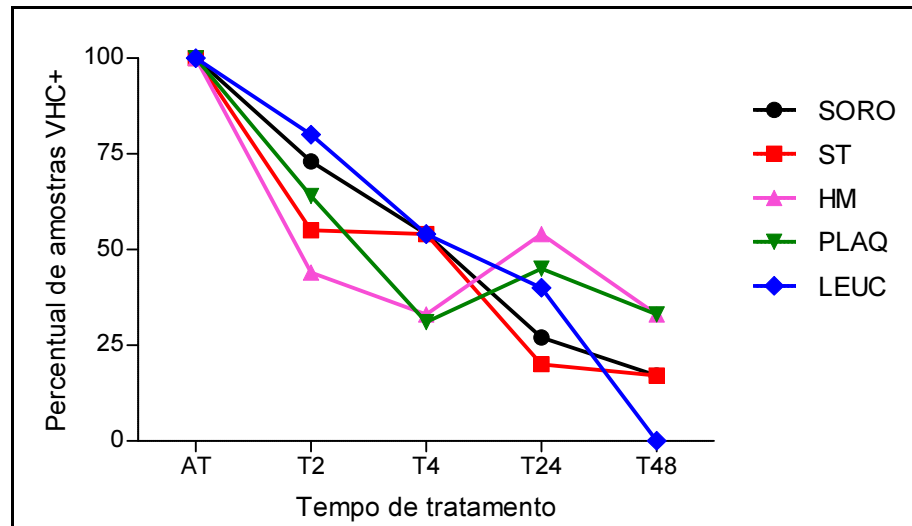
redução dos percentuais, sendo 27% no soro, 20% no sangue total e 40% nos leucócitos.

Na quadragésima semana de tratamento (T48) (Figura 10) as medianas de todos os componentes sanguíneos tornaram-se nulas. No entanto alguns pacientes apresentaram carga viral detectável. O percentual de positividade foi de 17% no soro e no sangue total e de 33% nas hemácias e plaquetas. Apenas nos leucócitos todos os pacientes apresentaram cargas virais nulas.

5.4.2 Abordagem por componente sanguíneo

A análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta pela vertente componente sanguíneo foi realizada ao avaliar este aspecto em função dos percentuais de representatividade das amostras positivas para o VHC (Figura 11). Esta Figura reforça os dados apresentados nas Figuras 09 e 10, constatando-se a presença de carga viral residual no soro, sangue total, hemácias e plaquetas na 48ª semana, sendo que apenas nos leucócitos não foram identificados VHC no final da terapia tripla. Esta abordagem demonstrou, também em conformidade com a abordagem por tempo, que a terapia tripla levou a uma redução contínua dos percentuais de amostras positivas para VHC em todos os componentes do sangue, exceto nas hemácias e plaquetas. Nestes componentes houve elevação do percentual de pacientes com VHC na vigésima quarta semana após início do tratamento.

Figura 11. Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta – abordagem por componente sanguíneo em função dos percentuais de representatividade das amostras positivas para o VHC



Análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total (ST), hemácias (HM), plaquetas (PLAQ) e leucócitos (LEUC) de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C antes de iniciarem o tratamento (AT), 2 semanas (T2), 4 semanas (T4), 24 semanas (T24) e 48 semanas (T48) após iniciarem o tratamento com a terapia tripla. Os resultados representam os percentuais de representatividade das amostras positivas para o VHC de cada componente do sangue em função do tempo.

A visualização da Figura 11 indica, empiricamente, que o percentual de amostras positivas para VHC e o tempo de tratamento apresentam relação inversa, quanto maior o tempo de tratamento, menor a carga viral constatada nos exames dos pacientes. A análise estatística dos dados confirmou este indício que está exposto na Tabela 05.

Tabela 05. Correlação estatística entre as variáveis carga viral e tempo de tratamento com a terapia tripla

Componente sanguíneo	r	p
Soro	- 0,8084	<0,0001
Sangue Total	- 0,8381	<0,0001
Hemácia	- 0,6781	<0,0001
Plaqueta	- 0,5792	<0,0005
Leucócito	- 0,6298	<0,0001

Análise estatística da correlação entre as variáveis carga viral e tempo de tratamento para todos os componentes sanguíneos expressa através do coeficiente de correlação (r) e do coeficiente de correlação populacional (p).

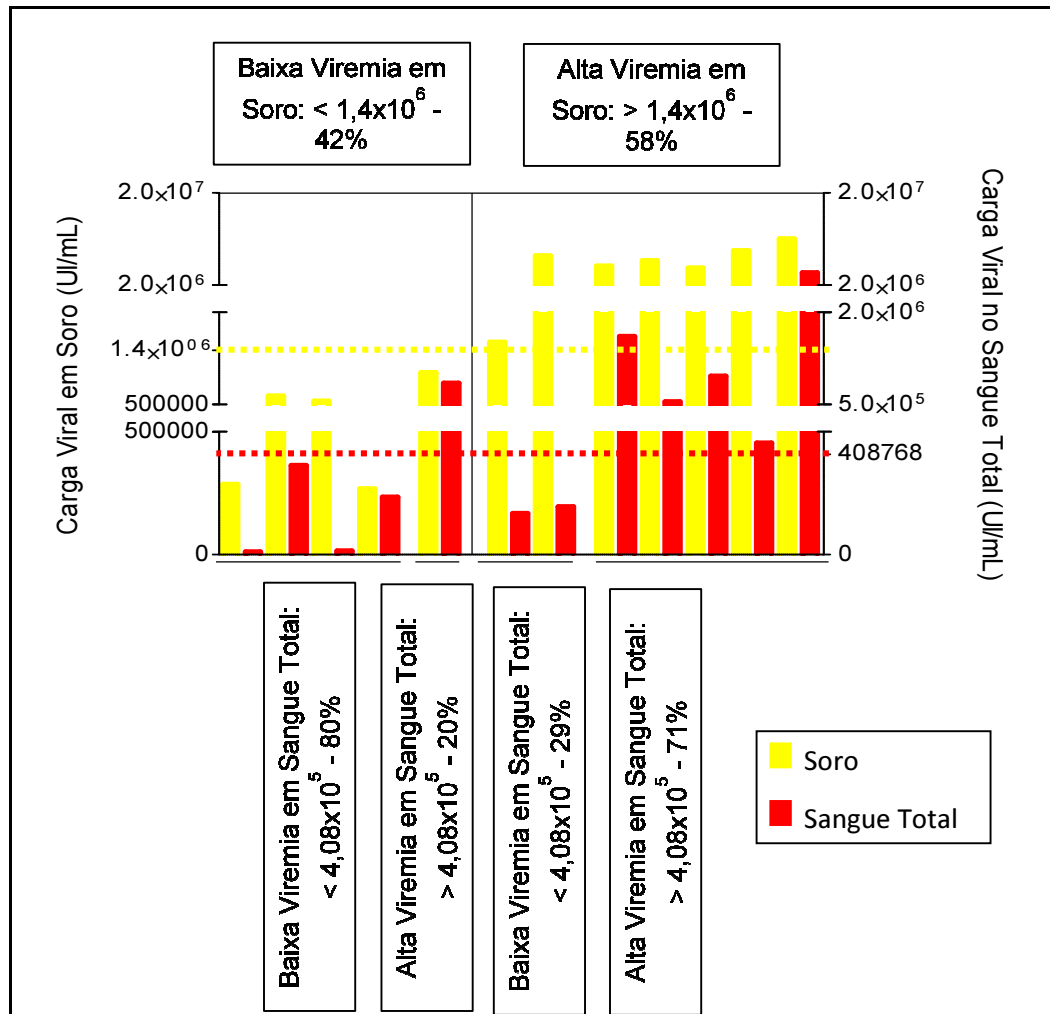
Verificou-se que para todos os componentes sanguíneos avaliados a carga viral se correlacionou negativamente com o tempo de tratamento. Esta correlação é constatada pelos valores negativos do coeficiente de correlação (r) obtidos na análise do conjunto de dados deste estudo, como demonstrado pela Tabela 05. Este coeficiente é uma estimativa para o coeficiente de correlação populacional (p), através do qual verifica se a correlação encontrada na amostra analisada pode ser expandida para a população. Estatisticamente, valores inferiores a 5% referem-se a existência de correlação entre as variáveis. Na Tabela 5 foram demonstrados também os valores de p. Para todos os componentes sanguíneos avaliados foi verificada correlação populacional entre as variáveis carga viral e tempo de tratamento.

5.4.3 Abordagem por magnitude da carga viral

A análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta pela vertente magnitude da carga viral foi realizada através da comparação de dois componentes sanguíneos de um mesmo paciente antes da terapia tripla. As comparações foram realizadas sempre entre o soro e os demais componentes do sangue em virtude do soro ser o componente preconizado pelo Ministério da Saúde para a realização da

quantificação da carga viral de VHC. A comparação da distribuição da carga viral no soro e no sangue total está demonstrada na Figura 12.

Figura 12. Análise da distribuição da carga viral no soro e no sangue total antes da terapia tripla



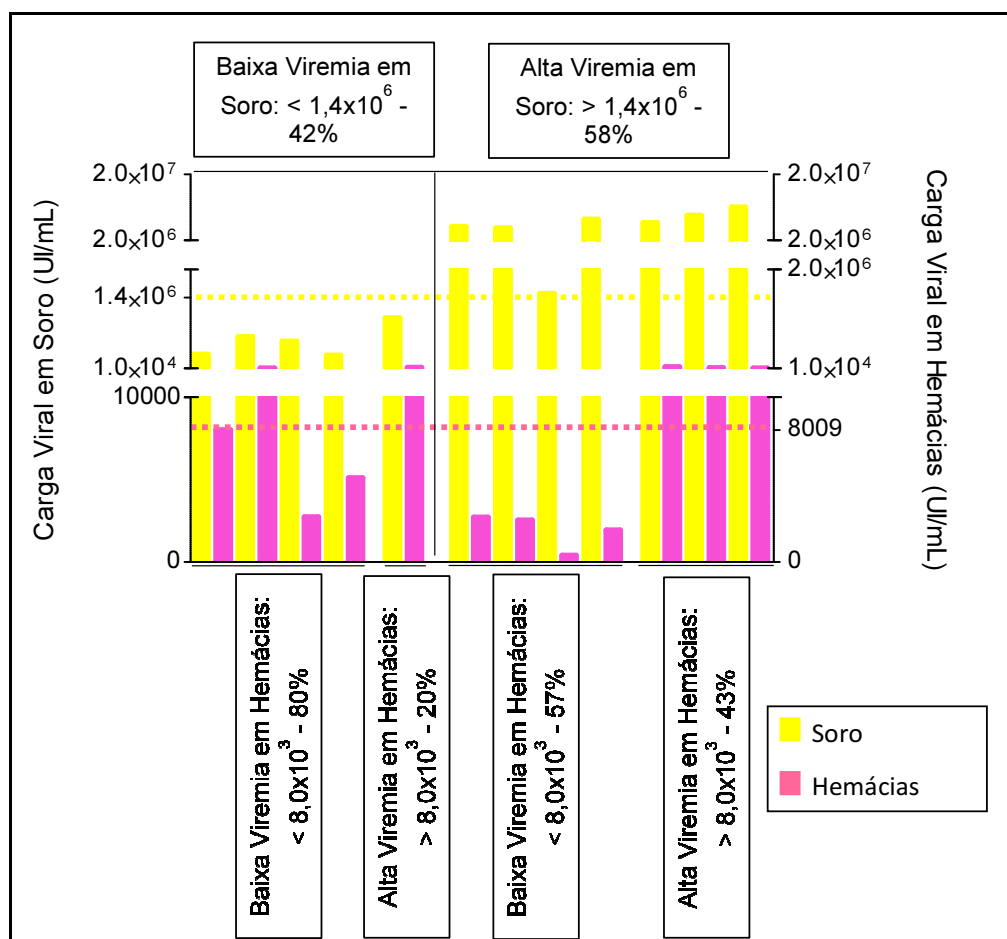
A análise da distribuição viral nos componentes soro e sangue total está apresentada em forma de barras, sendo as barras amarelas representando o soro e as barras vermelhas representando o sangue total. Estas barras representam a quantificação da carga viral, antes da terapia tripla, de cada paciente avaliado. A linha pontilhada amarela indica a mediana da carga viral encontrada no soro e a linha vermelha no sangue total. O gráfico à esquerda apresenta pacientes com baixa carga viral no soro e o lado direito, pacientes com alta carga viral no soro, ambos seguidos das suas respectivas cargas virais no sangue total.

Observou-se que o soro apresenta sempre carga viral mais elevada que no sangue total. Além disso, ao segregar os níveis de carga viral, de acordo com a mediana de cada componente, em baixa ($<1,43 \times 10^6$) e alta ($>1,43 \times 10^6$) no soro e

carga viral em baixa ($<4,08 \times 10^5$) e alta ($>4,08 \times 10^5$) no sangue total, verificou-se que 58% dos pacientes apresentaram alta viremia no soro. Observou-se, ainda, que a maioria dos pacientes que apresentaram carga viral alta no soro apresentaram também carga alta no sangue total e os que apresentaram carga baixa, apresentaram esta carga baixa nos dois componentes. 29% dos pacientes apresentaram carga alta no soro e carga baixa no sangue total e 20% apresentaram carga baixa no soro e carga alta no sangue total.

A comparação da distribuição da carga viral no soro e nas hemácias está demonstrada na Figura 13.

Figura 13. Análise da distribuição da carga viral no soro e nas hemácias antes da terapia tripla



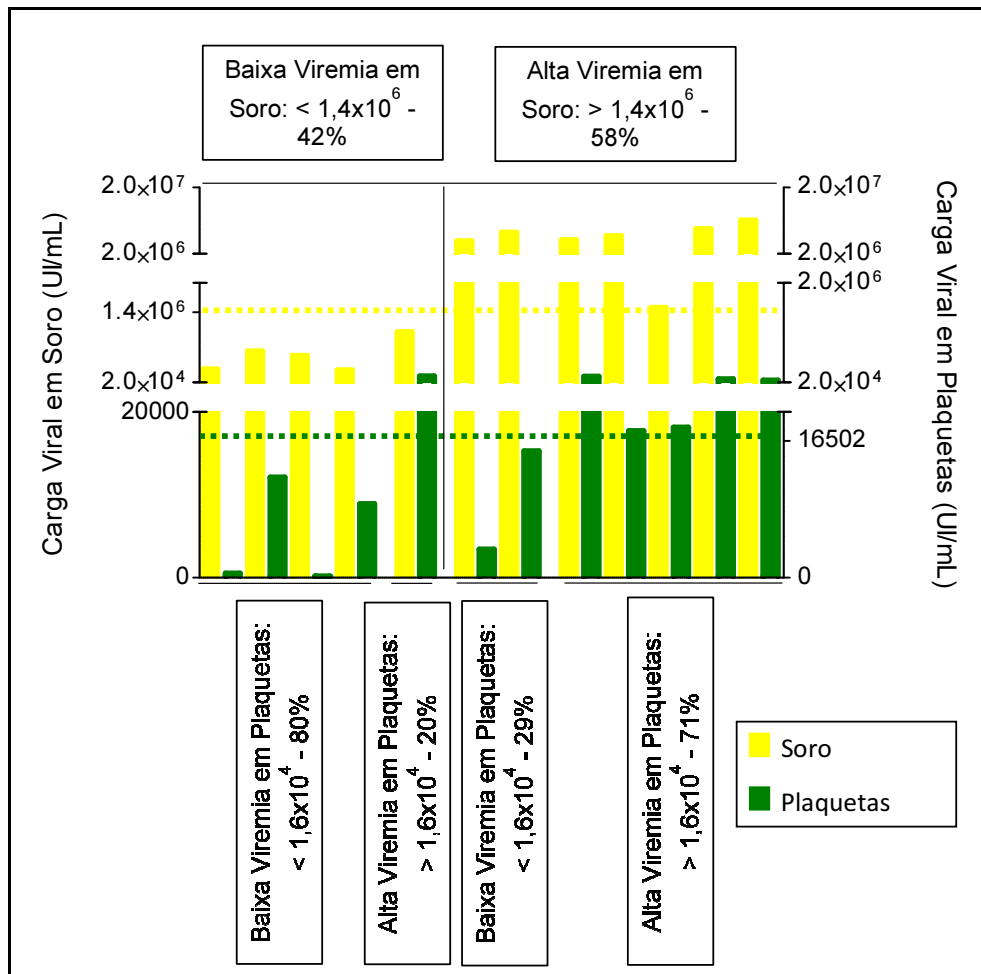
A análise da distribuição viral nos componentes soro e hemácias está apresentada em forma de barras, sendo as barras amarelas representando o soro e as barras rosas representando as hemácias. Estas barras representam a quantificação da carga viral, antes da terapia tripla, de cada paciente avaliado. A linha pontilhada amarela indica a mediana da carga viral encontrada no soro e a

linha rosa nas hemácias. O gráfico à esquerda apresenta pacientes com baixa carga viral no soro e o lado direito, pacientes com alta carga viral no soro, ambos seguidos das suas respectivas cargas virais nas hemácias.

Na análise da distribuição da carga viral no soro e nas hemácias observou-se que o soro apresenta, em todos os pacientes avaliados, viremia mais elevada que nas hemácias. Ao segregar os níveis de carga viral, de acordo com a mediana de cada componente, em baixa ($<1,43 \times 10^6$) e alta ($>1,43 \times 10^6$) no soro e carga viral em baixa ($<8,01 \times 10^3$) e alta ($>8,01 \times 10^3$) nas hemácias, verificou-se que 58% dos pacientes apresentaram alta viremia no soro. Observou-se que 57% dos pacientes que apresentaram alta viremia no soro apresentaram viremia baixa nas hemácias. 43% dos pacientes apresentaram, igualmente, viremia alta nas hemácias. Quanto à carga viral baixa no soro, notou-se que a maioria dos pacientes também apresentaram carga baixa nas hemácias. Apenas 20% dos pacientes apresentaram carga baixa no soro e carga alta nas hemácias.

A comparação da distribuição da carga viral no soro e nas plaquetas está demonstrada na Figura 14.

Figura 14. Análise da distribuição da carga viral no soro e nas plaquetas antes da terapia tripla



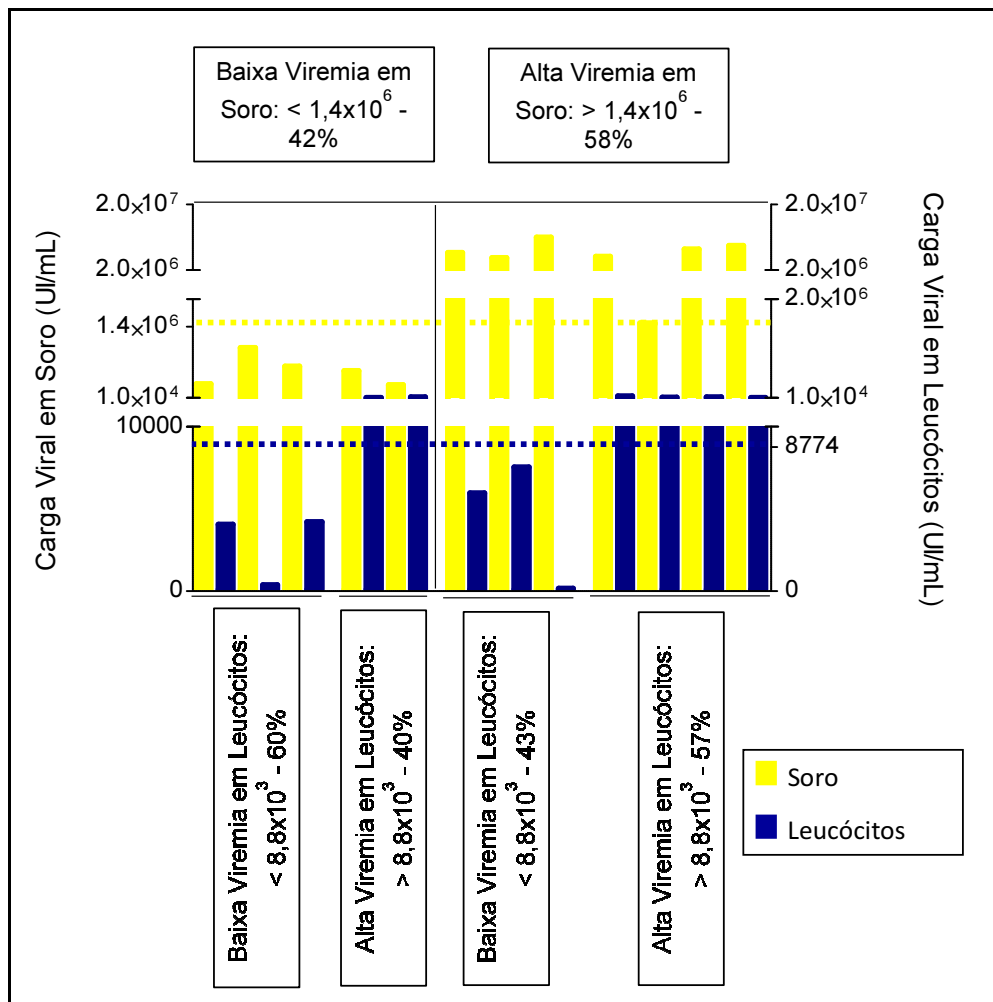
A análise da distribuição viral nos componentes soro e plaquetas está apresentada em forma de barras, sendo as barras amarelas representando o soro e as barras verdes representando as plaquetas. Estas barras representam a quantificação da carga viral, antes da terapia tripla, de cada paciente avaliado. A linha pontilhada amarela indica a mediana da carga viral encontrado no soro e a linha verde nas plaquetas. O gráfico à esquerda apresenta pacientes com baixa carga viral no soro e o lado direito, pacientes com alta carga viral no soro, ambos seguidos das suas respectivas cargas virais nas plaquetas.

Na análise da distribuição da carga viral no soro e nas plaquetas observou-se que o soro apresenta, em todos os pacientes avaliados, viremia mais elevada que nas hemácias. Além disso, ao segregar os níveis de carga viral, de acordo com a mediana de cada componente, em baixa (<1,43x10⁶) e alta (>1,43x10⁶) no soro e carga viral em baixa (<1,65x10⁴) e alta (>1,65x10⁴) nas plaquetas, verificou-se que 58% dos pacientes apresentaram alta viremia no soro. Observou-se que a maioria dos pacientes que apresentaram carga viral alta no soro apresentaram também

carga alta nas plaquetas e os que apresentaram carga baixa, apresentaram esta carga baixa nos dois componentes. 29% dos pacientes apresentaram carga alta no soro e carga baixa nas plaquetas e 20% dos pacientes apresentaram carga baixa no soro e carga alta nas plaquetas.

A comparação da distribuição da carga viral no soro e nos leucócitos está demonstrada na Figura 15.

Figura 15. Análise da distribuição da carga viral no soro e nos leucócitos antes da terapia tripla

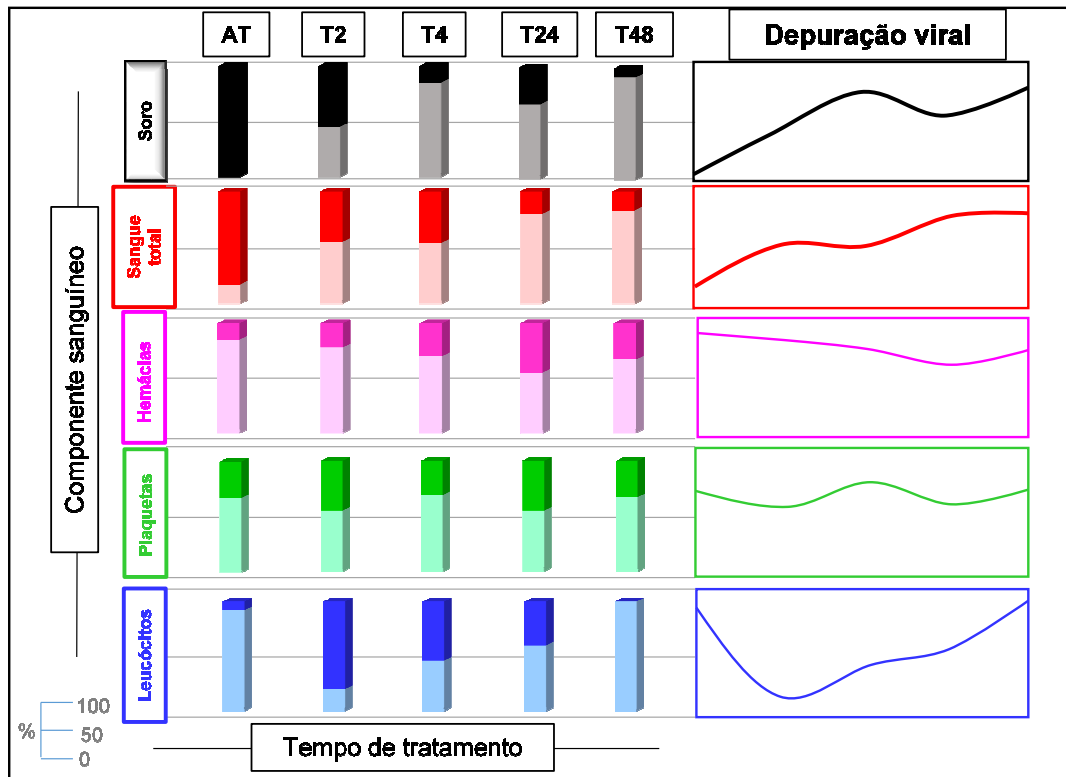


A análise da distribuição viral nos componentes soro e leucócitos está apresentada em forma de barras, sendo as barras amarelas representando o soro e as barras azuis representando os leucócitos. Estas barras representam a quantificação da carga viral, antes da terapia tripla, de cada paciente avaliado. A linha pontilhada amarela indica a mediana da carga viral encontrado no soro e a linha azul nos leucócitos. O gráfico à esquerda apresenta pacientes com baixa carga viral no soro e o lado direito, pacientes com alta carga viral no soro, ambos seguidos das suas respectivas cargas virais nos leucócitos.

Na análise da distribuição da carga viral no soro e nos leucócitos observou-se que o soro apresenta, em todos os pacientes avaliados, viremia mais elevada que nos leucócitos. Ao segregar os níveis de carga viral, de acordo com a mediana de cada componente, em baixa ($<1,43 \times 10^6$) e alta ($>1,43 \times 10^6$) no soro e carga viral em baixa ($<8,77 \times 10^3$) e alta ($>8,77 \times 10^3$) nos leucócitos, verificou-se que 58% dos pacientes apresentaram alta viremia no soro. Observou-se que 57% dos pacientes apresentaram viremia alta no soro e alta nos leucócitos e 43% apresentaram viremia alta no soro e baixa nos leucócitos. Quanto à carga viral baixa no soro, notou-se que 60% dos pacientes também apresentaram carga baixa nos leucócitos e 40% dos pacientes apresentaram carga baixa no soro e carga alta nos leucócitos.

Uma segunda maneira de abordar a magnitude da carga viral, foi realizada através de um compilado dos dados da quantificação da carga de VHC antes dos pacientes iniciarem a terapia tripla e dos dados das variações das cargas virais dos componentes sanguíneos ao longo do tratamento (Figura 16).

Figura 16. Diagrama bidimensional da cinética de magnitude da carga viral nos componentes sanguíneos durante a terapia tripla



A análise da cinética da magnitude da carga viral nos componentes sanguíneos durante a terapia tripla está apresentada por um diagrama bidimensional que mostra componente sanguíneo x tempo de tratamento. Os gráficos são demonstrados em forma de barras a esquerda do diagrama e em forma de linhas a direita do diagrama. As barras e linha pretas representam o soro, as barras e linha vermelhas o sangue total, as barras e linha rosas as hemácias, as barras e linha verdes as plaquetas e as barras e linha azuis os leucócitos, sendo que as cores escuras representam altas cargas virais e as cores claras baixas cargas virais. A classificação em alta ou baixa foi obtida pela definição da mediana global dos componentes do sangue avaliados. As linhas cinzas superiores representam 100%, as intermediárias 50% e as inferiores 0%.

A avaliação da cinética da magnitude da carga viral durante a terapia tripla (Figura 16) foi realizada com a estratificação das cargas virais em altas e baixas, as quais foram definidas com base no valor da mediana global dos componentes sanguíneos. Para a obtenção da mediana global foi calculada a mediana de todos os dados obtidos em cada um dos tempos de tratamento dos cinco componentes sanguíneos avaliados neste estudo. Ao final obteve-se, portanto uma mediana com os dados de antes de iniciar a terapia, outra com os dados da segunda semana de tratamento e assim sucessivamente até a quadragésima oitava semana.

Na análise do diagrama bidimensional da cinética da magnitude da carga viral durante a terapia tripla observou-se perfis distintos entre os componentes sanguíneos avaliados. Houve redução do percentual de carga viral alta no soro, exceto na vigésima quarta semana de tratamento, na qual observou-se aumento deste percentual. No sangue total houve redução contínua do percentual de carga viral alta. Inversamente, as hemácias apresentaram aumento do percentual de carga viral alta até a vigésima quarta semana de tratamento, o qual demonstrou redução na quadragésima oitava semana. O perfil dos percentuais de carga viral nas plaquetas mostrou flutuação, houve aumento do percentual na segunda e vigésima quarta semanas. Nos leucócitos observou-se baixo percentual de carga viral alta no início do tratamento, a segunda semana apresentou o maior percentual, o qual reduziu com o avanço da terapia tripla.

5.4.4 Abordagem por desfecho clínico

Tabela 06: Desfecho clínico após terapia tripla de pacientes com infecção crônica pelo VHC, avaliados durante o estudo

Desfecho Clínico	Percentual (%) / n pacientes
Resposta virológica sustentada (RVS)	86,0 (12/14)
Tratamento suspenso por efeitos adversos	25,0 (5/20)
Não Responder parcial	14,0 (2/14)
Recidiva	5,0 (1/20)

Percentuais dos pacientes de acordo com o desfecho clínico após terapia de pacientes com infecção crônica pelo VHC, avaliados durante o estudo.

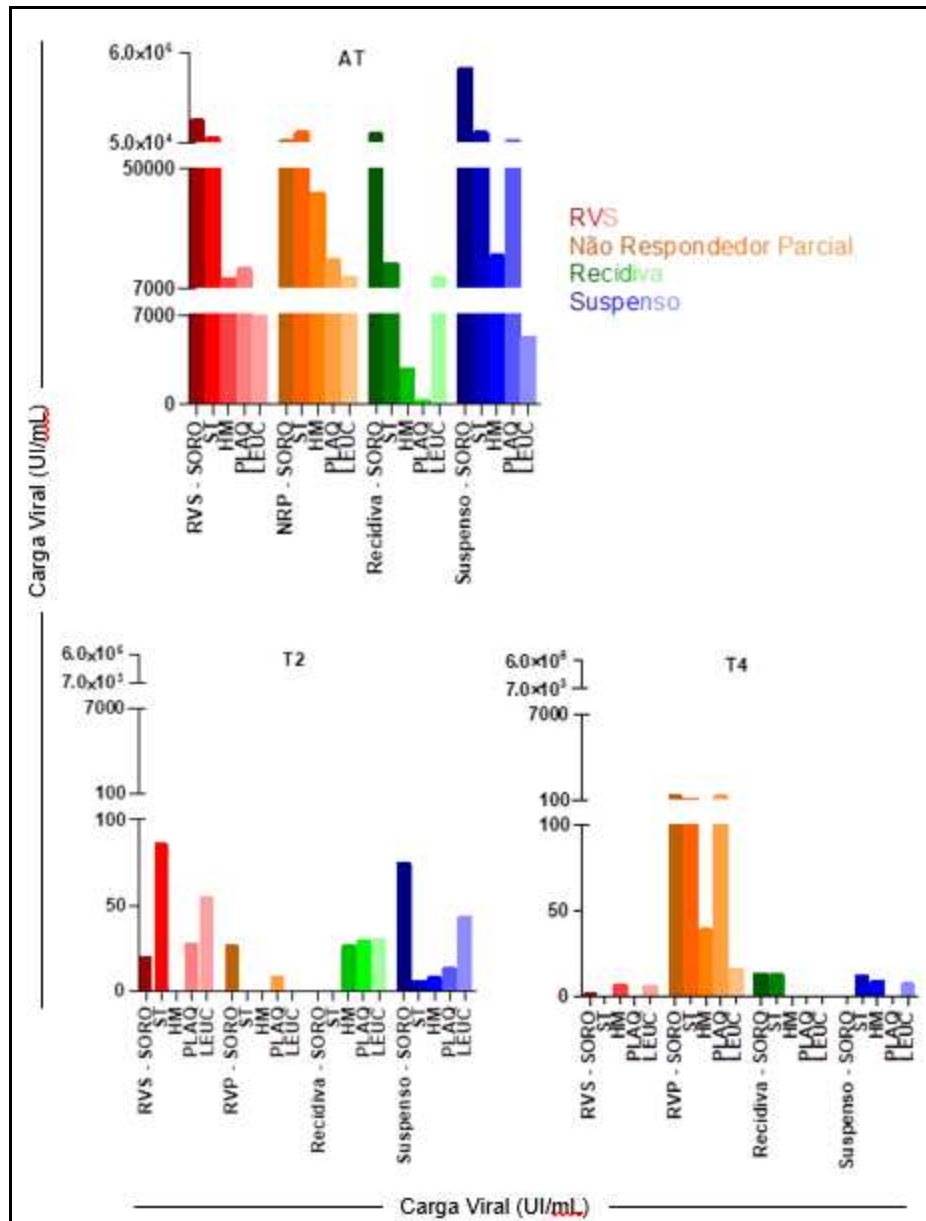
A Tabela 06 apresenta o desfecho clínico pós terapia tripla de pacientes com infecção crônica pelo VHC avaliados durante este estudo. Partindo de um total de vinte pacientes, cinco deles, o que representa 25% da população avaliada, foram suspensos do tratamento por apresentarem eventos adversos como plaquetopenia, neutropenia, febre, perda de peso acentuada, diarreia persistente, astenia, vômitos, mal-estar geral, palidez cutânea e intolerância medicamentosa. Em todos os casos

de suspensão, o medicamento administrado era o telaprevir. Dois dos pacientes foram suspensos na oitava semana de tratamento. Um paciente foi suspenso na décima segunda semana. E os outros dois pacientes foram suspensos do tratamento na vigésima quarta semana devido à persistência de eventos adversos mesmo após inúmeras tentativas de redução dos medicamentos ribavirina e interferon.

Um paciente apresentou recidiva, o que representa 5% dos pacientes, tendo que interromper o tratamento. Após estas interrupções na terapia, permaneceram 14 pacientes até o final do tratamento, dos quais 12 atingiram resposta virológica sustentada e 2 obtiveram resposta virológica parcial, apresentando carga viral positiva na 24^a semana de tratamento. Portanto, de um total de 14 pacientes que finalizaram o tratamento, 86,0% (12/14) tiveram RVS e 14,0% (2/14) responderam parcialmente à terapia tripla.

A partir dos dados expostos na Tabela 06, foi obtido o gráfico apresentado na Figura 17.

Figura 17. Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes de iniciar a terapia tripla, na 2ª e 4ª semanas após início do tratamento – abordagem por desfecho clínico



Análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total (ST), hemácias (HM), plaquetas (PLAQ) e leucócitos (LEUC) de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C quanto ao desfecho clínico do paciente ao final do tratamento. Os resultados demonstram o perfil da carga viral existente antes dos pacientes iniciarem o tratamento (AT), 2 semanas (T2) e 4 semanas (T4) após iniciarem o tratamento com a terapia tripla quando comparado aos desfechos clínicos: Resposta Virológica Sustentada (RVS), Não Responder Parcial (NRP), Recidiva ou Suspensão do tratamento devido a efeitos adversos. Os resultados estão apresentados como valor absoluto da mediana da carga viral em UI/mL em formato de gráficos em barras. O valor máximo da escala foi mantido para os três tempos analisados, sendo alterado apenas os valores intermediários para possibilitar a visualização dos dados.

Ao analisar a quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta pela variável desfecho clínico (Figura 17) há evidências de que o grupo que, ao final da terapia tripla, atingiu resposta virológica sustentada houve considerável e contínua redução da carga viral, em todos os componentes do sangue, até a quarta semana de tratamento.

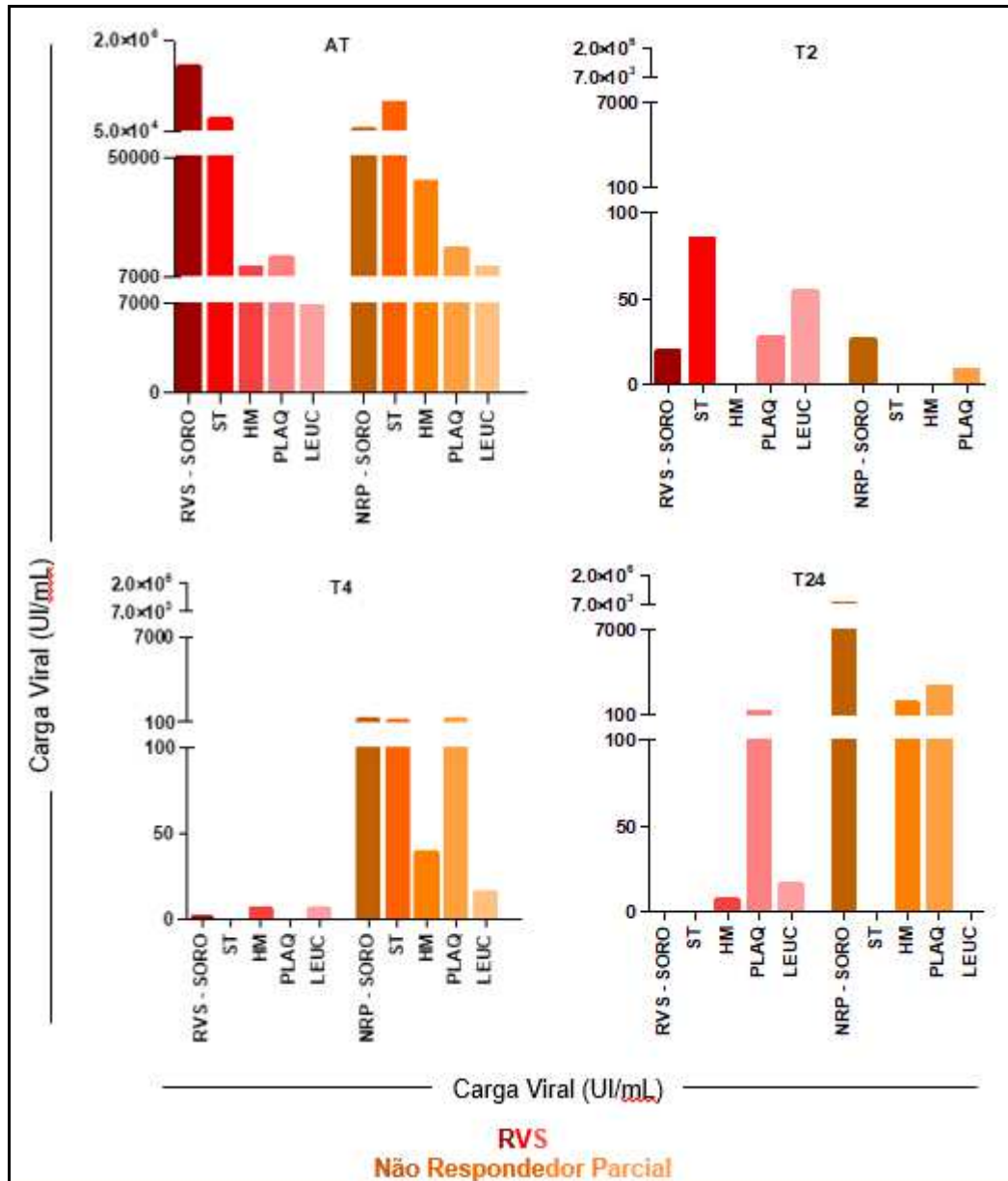
No grupo que apresentou resposta virológica parcial houve redução da carga viral em todos os componentes sanguíneos, quando comparado à segunda semana de tratamento. No entanto, na quarta semana, há aumento dessa carga viral em todos os componentes avaliados.

No grupo que houve recidiva, observou-se redução da carga viral em todos os componentes sanguíneos até a quarta semana de tratamento. Sendo que, nesta semana, os pacientes permaneceram com carga viral no soro e sangue total e mediana nula nas hemácias, plaquetas e leucócitos.

No grupo em que houve suspensão da terapia tripla, observou-se redução da carga viral em todos os componentes sanguíneos até a quarta semana de tratamento. Sendo que, nesta semana, os pacientes permaneceram com carga viral no sangue total, hemácias e leucócitos e mediana nula no soro e nas plaquetas.

A análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta pela variável desfecho clínico para os grupos RVS, não respondedor parcial, recidiva e suspensão foi realizada apenas até a quarta semana após início do tratamento. Análise semelhante foi realizada até a semana 24 após início do tratamento apenas para os pacientes que apresentaram RVS e que responderam parcialmente (Figura 18), visto que os demais pacientes apresentaram recidiva na vigésima quarta semana ou foram suspensos na oitava, décima segunda e vigésima quarta semanas de tratamento devido à persistência de eventos adversos. Estes pacientes não foram avaliados nas semanas 24 e 48 após início da terapia tripla devido à interrupção do tratamento.

Figura 18. Análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta antes de iniciar a terapia tripla, na 2^a, 4^a e 24^a semanas após início do tratamento – comparação dos grupos com RVS e Não Respondedor Parcial – abordagem por desfecho clínico



Análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total (ST), hemácias (HM), plaquetas (PLAQ) e leucócitos (LEUC) de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C quanto ao desfecho clínico do paciente ao final do tratamento. Os resultados demonstram o perfil da carga viral existente antes dos pacientes iniciarem o tratamento (AT), 2 semanas (T2) 4 semanas (T4) e 24 semanas (T24) após iniciarem o tratamento com a terapia tripla quando comparado aos desfechos clínicos: Resposta Virológica Sustentada (RVS) e Não Respondedor Parcial (NRP). Os resultados estão apresentados como valor absoluto da mediana da carga viral em UI/mL em formato de gráficos em barras. O valor máximo da escala foi mantido para os quatro tempos analisados, sendo alterado apenas os valores intermediários para possibilitar a visualização dos dados.

Ao analisar a quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta pela variável desfecho clínico comparando os grupos de pacientes que atingiram RVS com o grupo que não responderam parcialmente ao tratamento (Figura 18) observa-se que os pacientes que apresentaram resposta virológica sustentada tiveram considerável e contínua redução da carga viral, em todos os componentes do sangue, até a quarta semana de tratamento, com pequeno aumento da carga viral nas plaquetas e leucócitos.

No grupo que apresentou resposta virológica parcial houve redução da carga viral em todos os componentes sanguíneos, quando comparado à segunda semana de tratamento. No entanto, na quarta semana, há aumento dessa carga viral em todos os componentes avaliados. Na vigésima quarta semana a mediana da carga viral no sangue total e leucócitos tornaram-se nulas, mas os níveis de carga viral no soro, hemácias e plaquetas elevaram ainda mais quando comparados com a quarta semana de tratamento. A carga viral no soro atingiu níveis superiores a 7.000 UI/mL. A simples detecção de carga viral na vigésima quarta semana os classificam como respondedores parciais à terapia tripla.

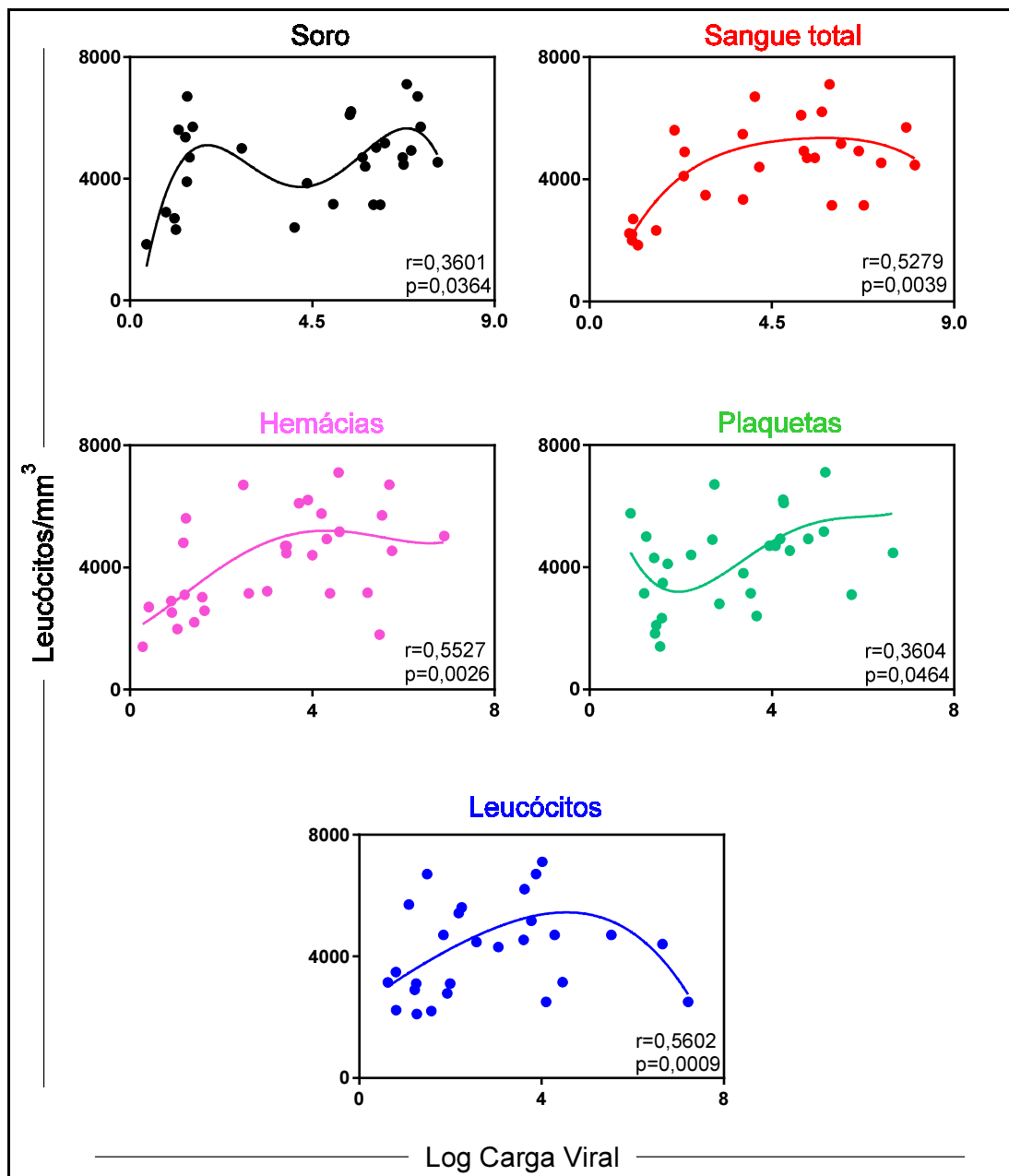
Não foi realizada análise da quantificação da carga viral por RT-qPCR absoluta pela variável desfecho clínico da semana 48 pois os pacientes que apresentaram resposta virológica parcial tiveram o tratamento interrompido e os pacientes com RVS apresentaram mediana nula para todos os componentes sanguíneos avaliados.

5.4.5 Correlação entre a carga viral e aspectos laboratoriais

Com a finalidade de conhecer o relacionamento entre duas variáveis, sendo elas a carga viral para VHC e um aspecto laboratorial, foram calculados os coeficientes de correlações, os quais indicam como as variáveis variam conjuntamente. Nesta análise foram avaliadas as cargas virais presentes nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos em função dos aspectos laboratoriais: nível da global de leucócitos (Figura 19), de hemácias (Figura 20), hemoglobina (Figura 21), plaquetas (Figura 22) e das enzimas

ALT (Figura 23), AST (Figura 24) e Gama GT (Figura 25). Todos os parâmetros foram avaliados compreendendo o período antes e durante o uso dos medicamentos da terapia tripla.

Figura 19. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de leucócitos nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla

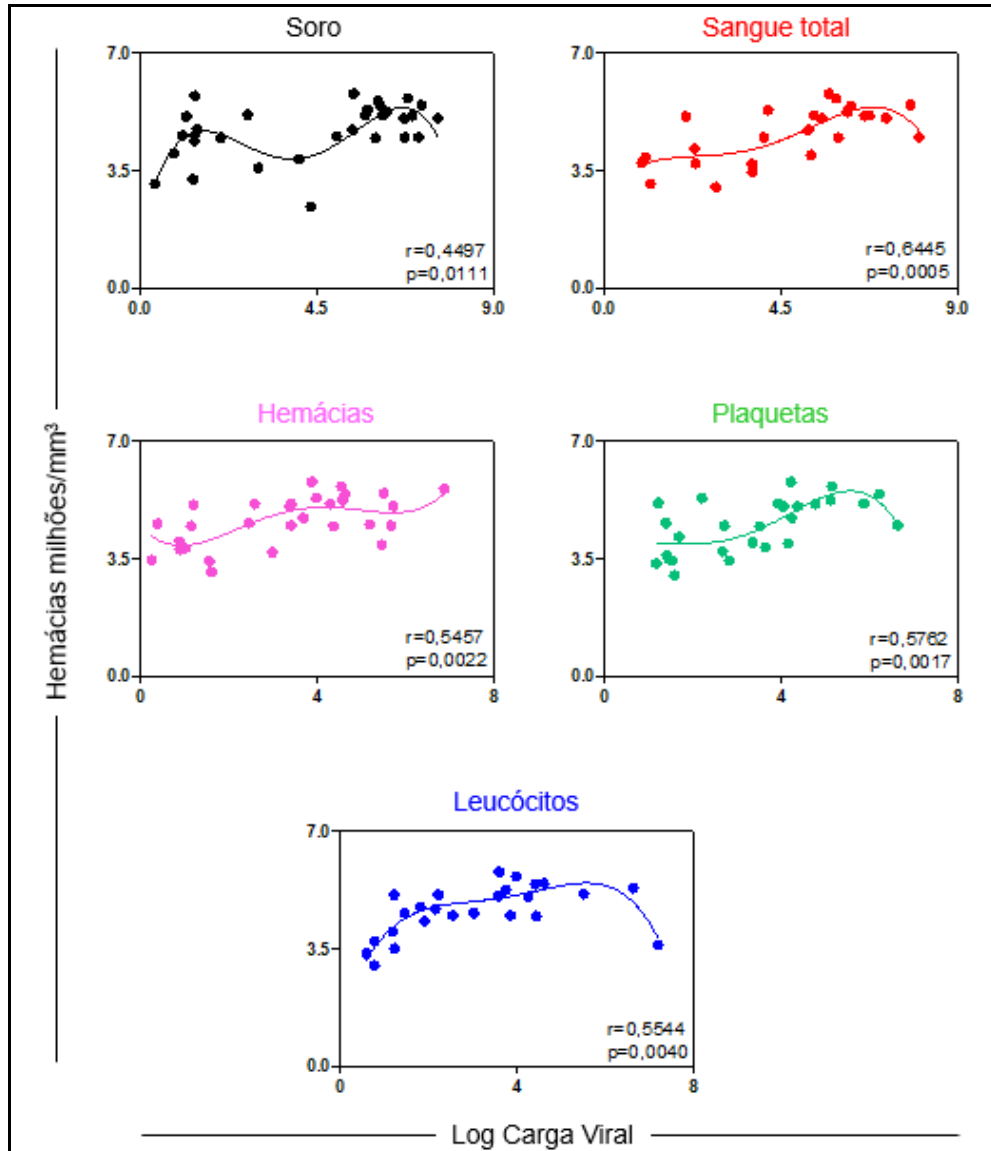


Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de leucócitos nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de

leucócitos/mm³ em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

A avaliação da correlação entre a carga viral e os níveis de leucócitos permite verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de leucócitos. Esta correlação é constatada pelos valores positivos do coeficiente de correlação (r) obtidos na análise do conjunto de dados deste estudo, como demonstrado pela Figura 19. Isso indica que quanto menor a carga viral, menores os níveis de leucócitos. A expansão desta inferência para a população é dada através do coeficiente de correlação populacional (p). Estatisticamente, valores inferiores a 5% referem-se a existência de correlação entre as variáveis. A Figura 19 demonstra que para todos os componentes sanguíneos avaliados foi verificada correlação populacional entre as variáveis carga viral e nível de leucócitos.

Figura 20. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de hemácias nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla

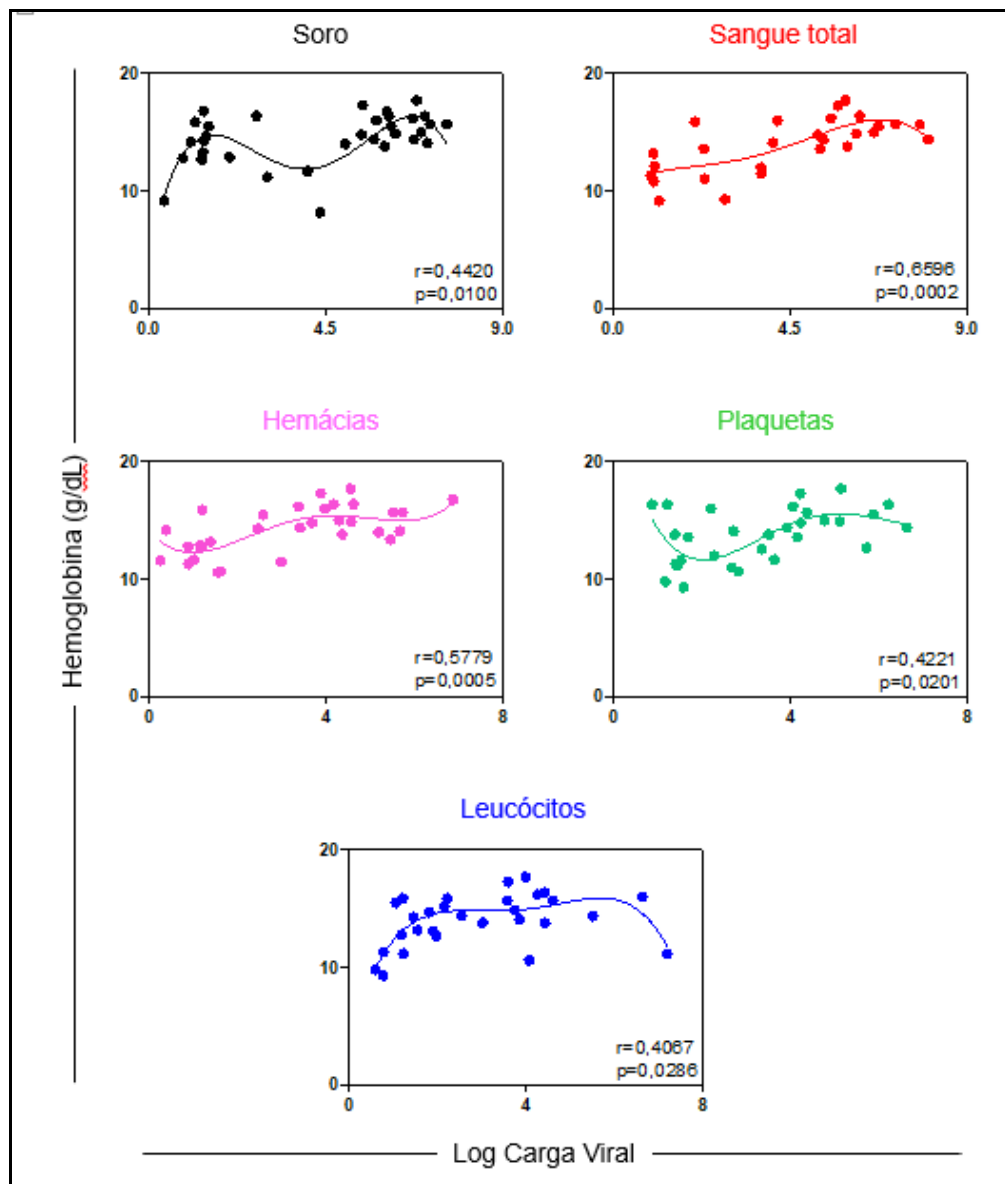


Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de hemácias nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de hemácias milhões/mm³ em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

Os valores positivos do coeficiente de correlação (r) para a relação entre carga viral e os níveis de hemácias permitiu verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de hemácias, como demonstrado pela Figura 20. Isso indica que quanto menor a carga

viral, menores os níveis de hemácias. Esta inferência pode ser expandida para a população, visto que todos os valores de p obtidos nesta análise apresentaram-se menores que 5%. A Figura 20 demonstra que para todos os componentes sanguíneos avaliados foi verificada correlação populacional entre as variáveis carga viral e nível de hemácias.

Figura 21. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de hemoglobina nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla

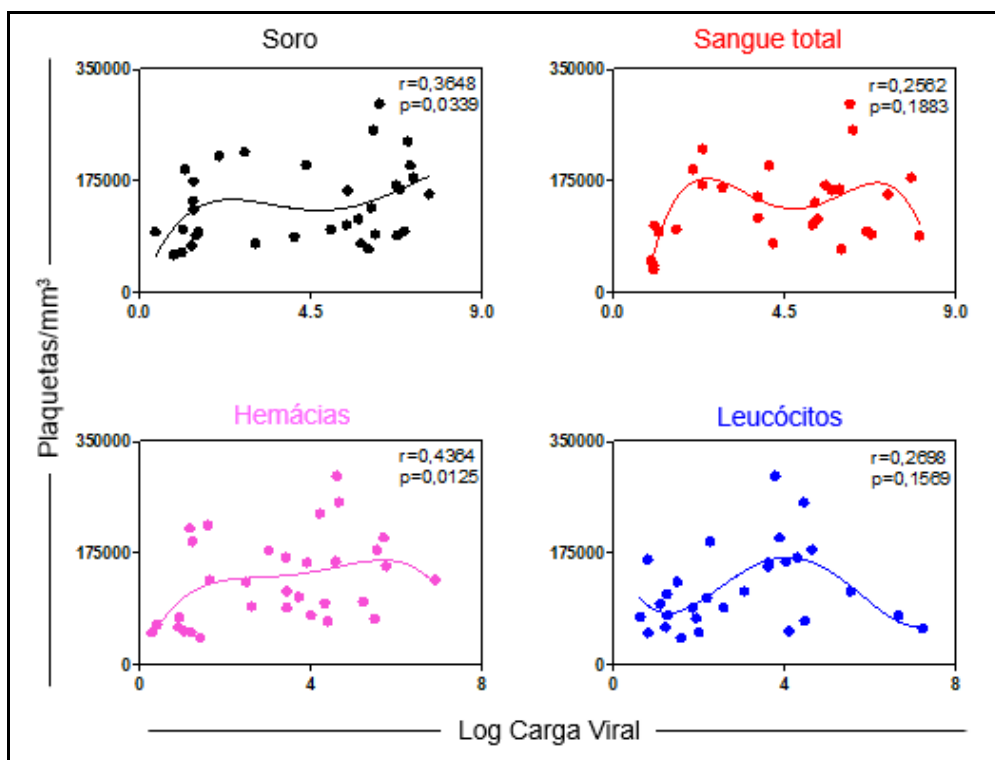


Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de hemoglobina nos pacientes cronicamente infectados

pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de hemoglobina (g/dL) em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

Os valores positivos do coeficiente de correlação (r) para a relação entre carga viral e os níveis de hemoglobina também permitiu verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de hemoglobina, como demonstrado pela Figura 21. Isso indica que quanto menor a carga viral, menores os níveis de hemoglobina. Esta inferência pode ser expandida para a população, visto que todos os valores de p obtidos nesta análise apresentaram-se menores que 5%. A Figura 21 demonstra que para todos os componentes sanguíneos avaliados foi verificada correlação populacional entre as variáveis carga viral e nível de hemoglobina.

Figura 22. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de plaquetas nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla



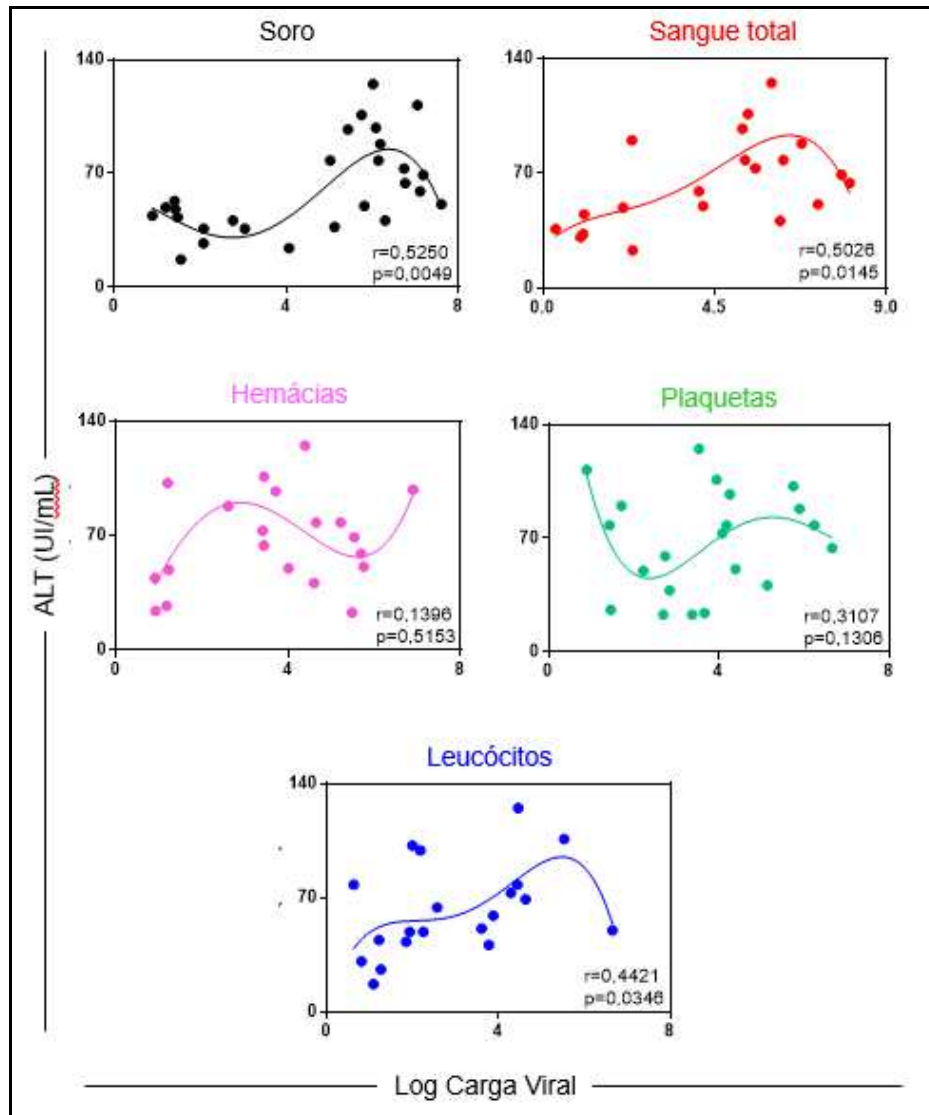
Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de plaquetas nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de

plaquetas/mm³ em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

Os valores positivos do coeficiente de correlação (r) para a relação entre carga viral e os níveis de plaquetas também permitiu verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de plaquetas, como demonstrado pela Figura 22. Isso indica que quanto menor a carga viral nos componentes sanguíneos avaliados, menores os níveis de plaquetas. Esta inferência pode ser expandida para a população, no entanto, apenas para o soro e para as hemácias, os quais apresentaram valores de p inferiores a 5%.

Foi inexistente, portanto, qualquer correlação entre os níveis de plaquetas e a carga viral no sangue total e nos leucócitos. A Figura 22 demonstra que os valores de p foram 18,83% para sangue total e 15,69% para leucócitos. Estes valores indicam que o resultado estatístico foi obtido apenas por acaso, devido a flutuações probabilísticas dos eventos que foram medidos, e não devido a um efeito real que cause o resultado.

Figura 23. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de ALT nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla



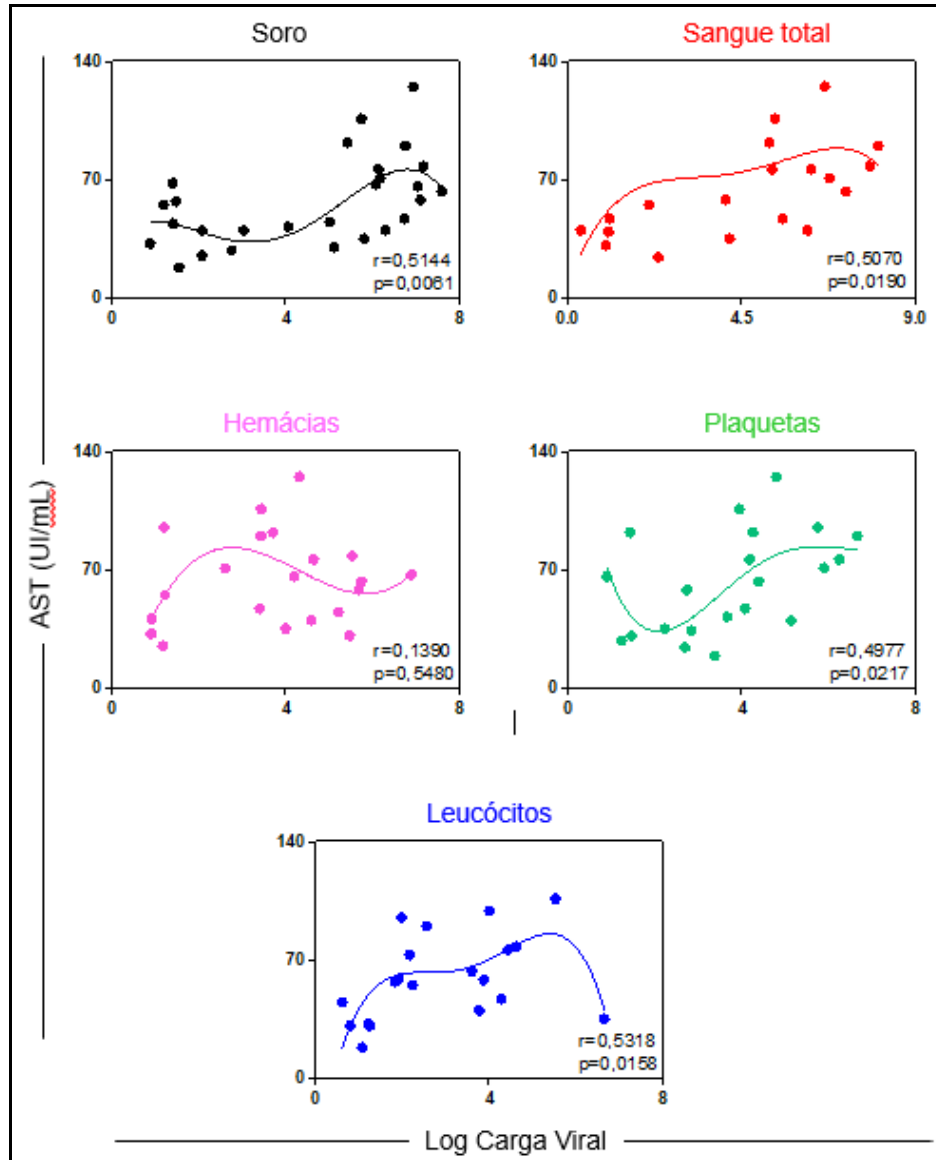
Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de ALT nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de ALT (UI/mL) em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

Os valores positivos do coeficiente de correlação (r) para a relação entre carga viral e os níveis de ALT também permitiu verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de ALT, como demonstrado pela Figura 23. Isso indica que quanto menor a carga viral, menores os níveis de ALT para estes componentes. Esta inferência pode ser

expandida para a população, no entanto, apenas para o soro, para o sangue total e para os leucócitos, os quais apresentaram valores de p inferiores a 5%.

Foi inexistente, portanto, qualquer correlação entre os níveis de ALT e a carga viral nas hemácias e nas plaquetas. A Figura 23 demonstra que os valores de p foram 51,53% para hemácias e 13,06% para plaquetas. Estes valores indicam que o resultado estatístico foi obtido apenas por acaso, devido a flutuações probabilísticas dos eventos que foram medidos, e não devido a um efeito real que cause o resultado.

Figura 24. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de AST nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla



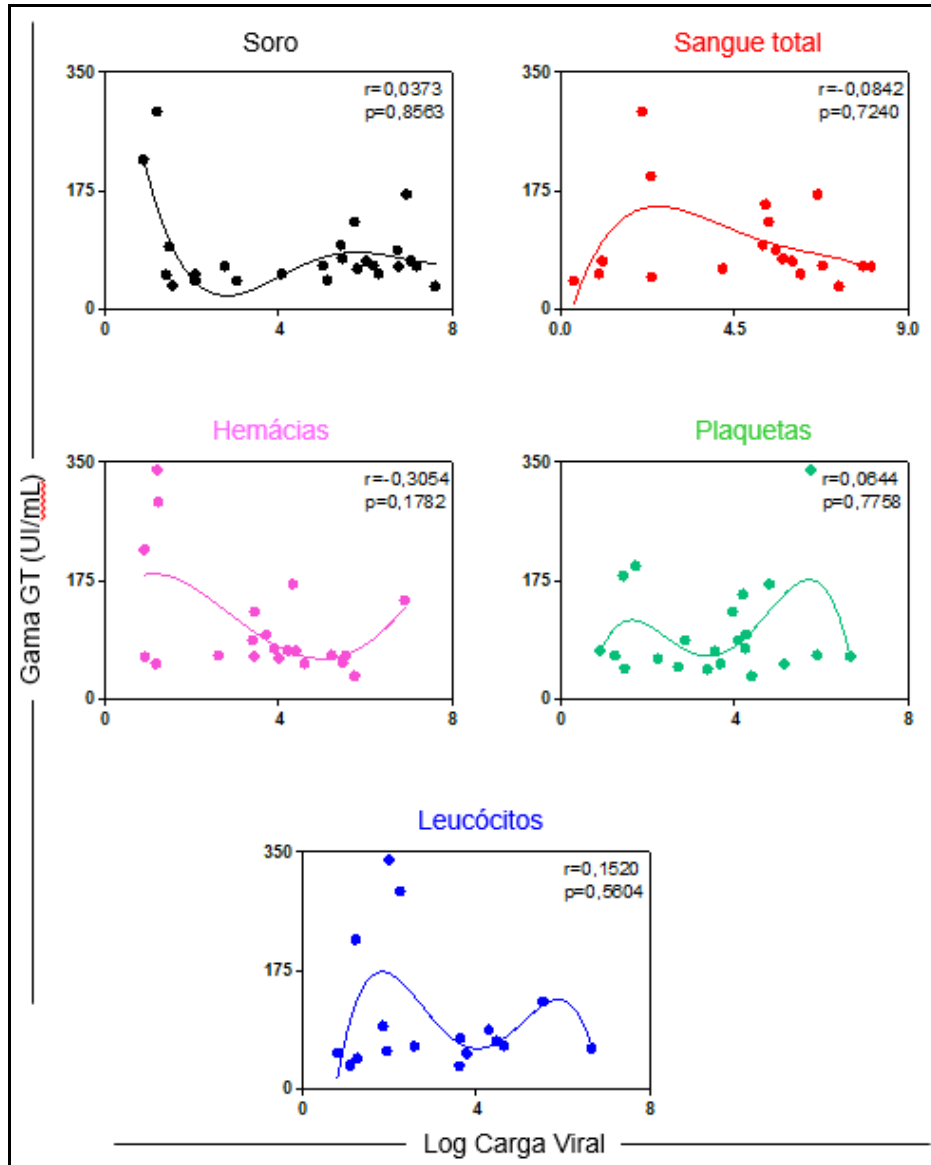
Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de AST nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de AST (UI/mL) em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

Os valores positivos do coeficiente de correlação (r) para a relação entre carga viral e os níveis de AST também permitiu verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de AST, como demonstrado pela Figura 24. Isso indica que quanto menor a carga

viral, menores os níveis de AST para estes componentes. Esta inferência pode ser expandida para a população para o soro, para o sangue total, para as plaquetas e para os leucócitos, os quais apresentaram valores de p inferiores a 5%.

Foi inexistente, portanto, qualquer correlação entre os níveis de AST e a carga viral nas hemácias. A Figura 24 demonstra que os valores de p para este componente foi 54,80%. Este valor indica que o resultado estatístico foi obtido apenas por acaso, devido a flutuações probabilísticas dos eventos que foram medidos, e não devido a um efeito real que cause o resultado.

Figura 25. Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos e o nível de Gama GT nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla



Análise da correlação entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos e o nível de Gama GT nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, durante terapia tripla. Os resultados estão apresentados como valor absoluto dos níveis de Gama GT (UI/mL) em função do log da carga viral (UI/mL). Os valores de r correspondem ao coeficiente de correlação e os valores de p correspondem ao coeficiente de correlação populacional.

Os valores positivos do coeficiente de correlação (r) para a relação entre carga viral e os níveis de gama GT também permitiu verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o

nível de gama GT, apesar de ser baixa a correlação devido aos baixos valores de r , como demonstrado pela Figura 25.

Esta baixa correlação refletiu na inexistência de qualquer correlação entre os níveis de gama GT e a carga viral em todos os componentes sanguíneos. A Figura 25 demonstra que os valores de p foram 85,63% para o soro, 72,40% para o sangue total, 17,82% para hemácias, 77,58% para plaquetas e 56,04% para os leucócitos. Estes elevados valores de p indicam que o resultado estatístico foi obtido apenas por acaso, devido a flutuações probabilísticas dos eventos que foram medidos, e não devido a um efeito real que cause o resultado.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo pretendeu otimizar uma metodologia de PCR em tempo real *in house* para adaptação do kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA) para a execução da quantificação da carga viral de VHC em soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos de pacientes com infecção crônica pelo vírus VHC, antes e durante terapia tripla. Em seguida, quantificar a carga viral de VHC nos componentes sanguíneos propostos. E por fim, associar e correlacionar esta carga viral com dados laboratoriais destes pacientes avaliados durante o estudo. Os resultados dessa análise proporcionaram um entendimento maior da fisiopatologia do processo e da cinética de interação do vírus com os componentes do sangue.

O perfil epidemiológico dos pacientes que participaram deste estudo assemelha-se ao descrito na literatura. Eles possuíam faixa etária de 47 a 60 anos e tempo estimado de infecção pelo VHC de 22 a 38 anos (Tabela 01). Conhecendo-se a fisiopatologia da hepatite C, sabe-se que é uma doença que, majoritariamente, evolui para a forma crônica e a maioria dos pacientes apresentam-se assintomáticos, o diagnóstico ocorre de forma tardia, o que poderia explicar faixa etária e de tempo estimado mais altas (MARTINS, et al, 2011).

A maior porcentagem de pacientes do sexo masculino em comparação com os do sexo feminino também encontra-se em concordância com estudos que demonstram uma maior prevalência da hepatite C em homens (MALACRIDA et al., 2016). A carga viral encontrada entre os pacientes do estudo, antes do tratamento, apresentou variação de 155.669,0 a 9.411.641,0 UI/mL. Os testes para obtenção desses níveis foram realizados com amostras de soro, pelo serviço de acompanhamento laboratorial do HC e encontram-se em boa concordância com os dados de carga viral no soro obtidos, por este estudo, nos ensaios realizados no Instituto René Rachou (IRR). Todos os pacientes possuíam o genótipo tipo 1, e a subdivisão entre 1a em 30% e 1b em 70% dos pacientes (Tabela 01), foi similar ao observado em outros estudos (CAMPIOTTO et al., 2005). O provável modo de aquisição do VHC (Tabela 01) foi, predominantemente, hemotransusão, representando 35,0% dos pacientes avaliados, o que também está de acordo com os dados da literatura (MARTINS, et al, 2011).

Os principais sinais clínicos e sintomas relatados pelos pacientes ao longo do tratamento (prurido cutâneo, fadiga, náusea, astenia, rash, vômito, hiporexia, insônia, prurido anal e fraqueza), já eram esperados, já que são descritos como possíveis efeitos colaterais na bula das medicações utilizadas (Tabela 01) (MERCK, 2011).

Para a análise e discussão dos dados apresentados na Tabela 02 utilizou-se os valores de referência padronizados pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG. A contagem global de leucócitos (Tabela 02) apresentou declínio durante o tratamento nas semanas 4 a 48 em comparação aos dados antes do tratamento. Esses níveis podem ser explicados como um dos efeitos colaterais do uso da terapia com interferon-alfa peguilado. Os interferons efetuam sua ligação aos receptores específicos presentes na superfície celular, iniciando um caminho complexo de sinalização intracelular e rápida ativação da transcrição gênica. Os genes estimulados pelo interferon modulam muitos efeitos biológicos, incluindo a inibição da replicação viral em células infectadas, inibição da proliferação celular e imunomodulação, o que poderia explicar a queda do número destas células em pacientes que utilizaram filgrastim. O uso desse medicamento não interferiu nas análises dos leucócitos, já que não foram encontradas diferenças significativas nas análises, quando excluídos ou não os pacientes que fizeram uso dessa medicação (04/20 - 20%) (MERCK, 2011; PRICE et al., 2014; SMOLIĆ et al., 2013).

A contagem de hemácias e os níveis de hemoglobina (Tabela 02) de todos os pacientes antes do tratamento, apresentava-se acima do valor mínimo de referência, uma das condições para o seu início. No decorrer do tratamento, a taxa apresentou diminuição em relação aos valores antes do tratamento a partir da quarta semana de tratamento. Esta queda já era esperada, devido a eventos adversos do uso da ribavirina. A ribavirina é absorvida por via oral e distribui-se no organismo, concentrando, principalmente, nas hemácias. Este fato provoca a anemia hemolítica frequentemente observada em pacientes usuários do medicamento. A dosagem da ribavirina foi diminuída de acordo com os valores de hemoglobina, esperando-se um retorno dos valores de hemoglobina a concentrações similares às aquelas apresentadas antes do tratamento. Nos casos em que os valores de hemoglobina permaneciam reduzidos mesmo com a diminuição da dosagem de ribavirina foi utilizada a eritropoetina, que é uma glicoproteína que apresenta como função a

regulação da eritropoese. O uso desse medicamento não interferiu nas análises da hemoglobina, já que não foram encontradas diferenças significativas nas análises, quando excluídos ou não os pacientes (05/20 - 25%) que utilizaram eritropoetina durante o tratamento (MERCK, 2011; PRICE et al., 2014; SMOLIĆ et al, 2013).

A contagem de plaquetas (Tabela 02) apresentou um declínio a partir da semana 4 de tratamento em comparação aos valores encontrados antes do tratamento. A redução do número de plaquetas também pode ser explicada devido aos efeitos colaterais das medicações (ROCHE, 2014).

As aminotransferases ALT e AST (Tabela 02), marcadores padrão de lesão hepática. A Gama GT é uma enzima encontrada em vários órgãos, dentre eles, o fígado. É marcador sanguíneo muito sensível a alterações da função hepática, estando aumentada na maioria das doenças que causam danos agudos ao fígado e vias hepatobiliares (hepatites agudas e crônicas, cirrose, colestases e pancreatites). Os três parâmetros citados estavam em níveis elevados antes do tratamento e apresentaram declínio progressivo ao longo do tratamento, chegando a níveis dentro dos valores de referência ao término do tratamento. Este achado sugere que o clareamento viral tenha contribuído para amenizar os danos hepáticos causados pela presença e multiplicação do VHC nos hepatócitos (MERCK, 2011; PRICE et al., 2014; SMOLIĆ et al., 2013).

Em estudo do nosso grupo de pesquisa, RIBEIRO (2015) apresenta dados que contribuem para uma melhor compreensão da cinética de biomarcadores imunológicos ao longo da terapia tripla, sua importância na monitoração terapêutica e no alcance da RVS pelos pacientes ao término do tratamento. As análises provenientes deste estudo mostraram que houve um declínio dos níveis de quimiocinas e da frequência de micropartículas derivadas de eritrócitos, células endoteliais, plaquetas, leucócitos e suas subpopulações no decorrer do tratamento. Estes resultados sugerem que o tratamento e a redução ou eliminação do VHC promovem um ambiente imunomodulador com retomada da resposta imunológica dentro dos padrões esperados na ausência da infecção viral. Para grande maioria dos pacientes que terminaram o tratamento esse panorama está associado ao alcance de resposta virológica sustentada e, conseqüentemente, ao sucesso da terapia tripla (RIBEIRO, 2015). Os dados de Ribeiro (2015) estão de acordo com os

obtidos por este estudo, que demonstraram queda progressiva da carga viral em todos os componentes sanguíneos ao longo do tratamento.

Quanto à análise dos resultados obtidos na otimização do kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA), sabe-se que a metodologia qPCR baseia-se na detecção e quantificação da intensidade de fluorescência, que aumenta em proporção direta com a quantidade do produto amplificado na reação de PCR. Ao final da reação, é estabelecido o limiar de detecção denominado *threshold*. O número de ciclos necessários para que a curva de amplificação do material genético intercepte o *threshold* é denominado Ct (*Cycle threshold*). Os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucléico presente na amostra.

Os resultados referentes ao teste realizado para verificar a conformidade das adaptações no procedimento de execução do kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA) demonstraram amplificação adequada de ambos alvos: VHC e IC. Observou-se adequação da redução do volume de amostra inicial quanto à detecção dos alvos avaliados, sem afetar a qualidade da reação. Obteve-se, ainda, uma amplificação satisfatória do IC em todo o processo, que inclui desde a extração de RNA até a amplificação do material genético. Esta constatação consolida a utilização do reagente Trizol como uma boa opção para a extração do RNA-VHC. A adequação da utilização do Trizol para extração do RNA das amostras apresentou vantagens quando comparado com o kit preconizado pela empresa *Abbott*, o qual utiliza beads para a extração. A extração com Trizol apresentou menor custo, por utilizar reagentes comuns de laboratório. Como desvantagens da extração do RNA com Trizol estão a necessidade de um operador especializado, maior risco de contaminação cruzada e uso de reagentes tóxicos como o próprio trizol e o clorofórmio (PILLO, 2010).

A otimização da metodologia *in house* adaptou o kit *Abbott RealTime HCV*[®] (Abbott Molecular, EUA) para detecção do RNA viral do VHC para condições de pesquisa. Além desta contribuição, a otimização levou à redução do volume de RNA utilizado, possibilitando a quantificação da carga viral em outros componentes sanguíneos e não apenas em soro ou plasma, como sugerido pelo kit. Contribuiu, ainda, com o aumento do número de reações previstas para o kit. Inicialmente, o volume final de reação preconizado pelo kit é de 100 µL, enquanto que os testes realizados por este estudo demonstraram que a redução para um volume final de 25

μL não acarretou em prejuízos quali/quantitativos para os resultados de quantificação da carga viral. Desta forma, os testes otimizaram o kit em 4 vezes, o que indica uma economia considerável em termos financeiros. Segundo Oliveira (2015), o desenvolvimento de técnicas “*in house*” contribuem minimizando os elevados custos com kits comerciais.

Realizado o teste de otimização e as adequações das alterações necessárias, iniciou-se os experimentos para quantificação da carga viral por PCR em tempo real nas amostras dos pacientes em estudo. Esta quantificação, denominada reação quantitativa absoluta, baseia-se na análise de uma curva-padrão construída a partir de concentrações conhecidas do alvo molecular objeto de estudo. A partir destas, o software do termociclador de qPCR efetua a quantificação do material genético-alvo nas amostras em teste (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). A curva-padrão fornece, também, o coeficiente angular da reta (*slope*), o coeficiente de correlação (R^2) e a eficiência de amplificação

Uma alta eficiência está associada a uma inclinação de, aproximadamente, 3,32 para cada diluição de 10 do alvo (TOO, 2003; APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). *Slope* de -3,32 relaciona-se a uma eficiência de 100%, indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da qPCR (KUBISTA et al., 2006). No entanto, consideram-se eficientes as reações que apresentam variação entre 90% e 110%, com *slope* entre -3,6 e -3,1, além de coeficientes R^2 com valores maiores que 0,99, garantindo assim, pequena variação entre as triplicatas. *Slopes* mais negativos que -3,33 indicam reações pouco eficientes e os *slopes* menos negativos podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem (CARNIELLI, 2014).

Os resultados apresentados no Gráfico 02 mostram que a curva-padrão obtida apresentou eficiência de 99,61%, com *slope* de -3,331 e R^2 de 0,998. Estes são considerados ótimos valores pela literatura científica e indicam bons parâmetros para uma quantificação de carga viral confiável (TOO, 2003; APPLIED BIOSYSTEMS, 2005; KUBISTA et al., 2006; CARNIELLI, 2014). Além destes parâmetros, avaliou-se ainda os valores de Ct médio das triplicatas. Observa-se que o Ct médio do ponto de maior concentração da carga viral foi de 11,939 e o de menor concentração de 28,399, que aponta serem resultados adequados para os limites de detecção máximo e mínimo. Esta adequação se baseia em valores que não são muito baixos, como Ct abaixo de 5, que poderia indicar amplificação de

produtos inespecíficos e, quanto ao limite máximo, não estar próximo ao 37º ciclo, o último ciclo de amplificação, o que indicaria carga viral muito baixa. Quanto aos desvios-padrão, todas as triplicatas apresentaram desvios inferiores a 0,5. Semelhantes à esta curva-padrão, as demais curvas construídas para servir de base para a quantificação da carga viral presentes em todas as amostras dos pacientes também apresentaram perfis que se enquadraram nos critérios estabelecidos pela literatura científica. Estes critérios estão associados a reprodutibilidade e especificidade do teste devido à não detecção de sinal nos controles negativos adicionados em cada corrida, nos quais não havia moléculas alvo (BUSTIN *et al.*, 2009).

A análise da quantificação da carga viral, por RT-qPCR absoluta, no soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos de pacientes com infecção crônica pelo VHC foi realizada por quatro variáveis, sendo elas: tempo de tratamento, componente sanguíneo, magnitude da carga viral e desfecho clínico. Em todas essas abordagens observa-se que, antes de iniciar a terapia tripla, os pacientes apresentavam elevadas cargas do VHC nos cinco componentes do sangue analisados: soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos. O soro apresentou cargas virais entre 10^4 e 10^8 UI/mL antes do tratamento. A carga viral na hepatite C tem por função monitorar o tratamento mas não serve de avaliação da gravidade da doença. Estudos que avaliaram pacientes em tratamento com PEG-IFN α associado à RBV demonstraram que a carga viral pode influenciar na possibilidade de sucesso com o tratamento e estimar antecipadamente a possibilidade de recidiva do vírus após o tratamento. Os autores observaram que a carga viral de 400.000 UI/mL possui um poder estatístico muito superior para prognosticar a possibilidade de cura de um paciente e, ainda, estimar a possibilidade de recidiva do vírus após um tratamento aparentemente bem sucedido nos pacientes infectados com o genótipo 1 do vírus da hepatite C (VARALDO, 2006). No presente estudo, no entanto, não foi verificado pior prognóstico para os pacientes que apresentaram carga viral superior à 400.000 UI/mL antes de iniciar o tratamento. A maioria dos pacientes avaliados apresentavam carga viral superior à 10^5 UI/mL antes do tratamento e também a maioria obtiveram RVS ao final da terapia. A discordância dos resultados estão atrelados, possivelmente, às diferenças existentes entre as terapias analisadas.

Ao comparar os níveis de carga viral entre os componentes sanguíneos avaliados, constata-se que o soro é o componente que apresentou maior concentração de RNA-VHC e as hemácias, a menor carga viral. Estes resultados estão em consonância com o estudo realizado por CHANCEY e colaboradores (2012), no qual investigou-se a distribuição do VHC em diferentes componentes sanguíneos de doadores de sangue assintomáticos infectados pelo VHC. No entanto, no estudo citado, não foram avaliadas cargas virais no sangue total e nas plaquetas. Apesar de não terem avaliado as plaquetas, os autores do estudo a reconhecem como um importante componente do sangue capaz de concentrar partículas virais (ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; PUGLIESE et al., 2004; SCHMIDT et al., 1995; TORRES et al., 2000).

No presente estudo as diferenças nas concentrações das cargas virais antes de iniciar o tratamento são significativas entre soro e os componentes celulares do sangue, não havendo, no entanto, diferença significativa entre soro e sangue total. Encontra-se diferença significativa, ainda, entre sangue total e hemácias e entre sangue total e leucócitos. Durante a terapia tripla não se observa diferenças significativas nos níveis de cargas virais entre os componentes do sangue em nenhum dos tempos avaliados.

Na análise pela variável magnitude da carga viral em que foi avaliada a distribuição viral no soro comparada à distribuição no sangue total (Figura 12), nas hemácias (Figura 13), nas plaquetas (Figura 14) e nos leucócitos (Figura 15) observou-se que, em concordância com outras análises, o soro apresentou sempre carga viral mais elevada antes do início da terapia tripla. Diferentemente dos resultados obtidos para o VHC, Lustig e colaboradores (2016) observaram níveis de RNA do WNV superiores em sangue total em relação à quantificação de todas as amostras testadas, dentre elas soro e plasma. Outro estudo envolvendo o WNV, realizado por Rios e colaboradores (2007), demonstrou que as cargas virais nas hemácias excederam a carga no plasma correspondente. A comparação dos resultados obtidos por Lustig e colaboradores (2016) e por Rios e colaboradores (2007) com os resultados do presente estudo permite apontar que apesar do VHC e do WNV interagirem com os componentes do sangue, esta interação ocorre com distribuição e intensidade distintas com cada um dos componentes avaliados.

Observa-se uma maior distribuição do VHC no soro, enquanto que o WNV encontra-se predominantemente ligados às hemácias.

Os resultados analisados pelas variáveis tempo de tratamento demonstraram que a carga viral apresenta queda brusca em todos os componentes na segunda semana de tratamento, atingindo nível máximo de 7.000 UI/mL e com boa parte dos pacientes atingindo carga nula, ou seja, carga indetectável de acordo com a sensibilidade apresentada pelo kit de quantificação utilizado. Na quarta semana essas cargas de VHC reduziram, quando comparadas aos valores da segunda semana. Nesta fase do tratamento, a carga viral máxima foi de 1.000 UI/mL, indicando boa resposta à terapia tripla.

Na 24^a semana de tratamento observou-se que há um aumento dos percentuais de pacientes com hemácias e plaquetas positivas para VHC. Ariede e colaboradores (2015) também demonstraram que em indivíduos infectados com VHC, o RNA viral encontra-se associado a plaquetas. Embora os resultados tenham demonstrado uma menor concentração do RNA em plaquetas do que no plasma, assim como constatado pelo presente estudo, foi observado que o RNA viral está mais preservado da degradação ao longo do tempo, sugerindo que o vírus pode persistir por mais tempo no corpo quando associado a plaquetas. Estes achados sugerem que as plaquetas exerçam o papel de transportadoras do vírus em circulação, funcionando como compartimento biológico de reserva importante para o vírus.

Hamaia, Li e Allain (2001) sugeriram que, além da possibilidade de moléculas de superfície específicas que medeiam a ligação do VHC às plaquetas, a morfologia destes componentes podem resultar na adsorção não específica do vírus à superfície das plaquetas. Esta hipótese, evidencia que provavelmente valores maiores de carga viral poderiam estar associados à detecção de RNA de VHC em plaquetas. Segundo De Almeida e colaboradores (2007) a associação do VHC à plaquetas é presumivelmente um dos mecanismos patogênicos implicados na trombocitopenia associada à hepatite C. Para Alter e Houghton (2001) essa interação poderia ainda contribuir para a persistência e escape viral do sistema imunológico do hospedeiro, que pode ter um impacto na eficiência da terapia antiviral.

No trabalho realizado por De Almeida e colaboradores (2009) foi detectado RNA do VHC no soro e nas plaquetas de pacientes tratados com PEG-IFN α associado à ribavirina nos tempos pré-tratamento, fim de tratamento e 24 semanas após a conclusão da terapia. Segundo os autores, curiosamente, o VHC foi detectado em plaquetas de dois pacientes com ALT normal e RNA-VHC sérico indetectável no final do tratamento. Este níveis recaíram após 24 semanas de seguimento. O estudo sugere que os pacientes com persistência de VHC em plaquetas no final do tratamento parecem estar em risco aumentado de infecção recorrente por VHC. Resultados semelhantes foram obtidos pelo presente estudo, diferindo em alguns quesitos como a terapia, o tempo da terapia em que houve maior detecção de RNA viral nas plaquetas e também nas consequências desse aumento, visto que nosso trabalho não demonstrou maior risco de infecção recorrente.

Observa-se ainda que há um grupo de pacientes que apresentam elevação das cargas virais em todos os componentes sanguíneos. Dentre esses pacientes, está o paciente que apresentou resposta virológica parcial, o qual apresentou aumento nos níveis de cargas virais no soro e nas plaquetas. Mas há também pacientes que atingiram RVS, dentre os quais um apresentou aumento dos níveis de cargas virais no soro e nas hemácias, outro apresentou este aumento no soro e no sangue total, outro apresentou nas plaquetas e leucócitos e outro apresentou aumento apenas nas plaquetas.

Estes resultados evidenciam uma mudança no perfil de distribuição de RNA viral entre os componentes sanguíneos avaliados frente ao avanço na terapia tripla. No início do tratamento, observou-se que níveis de RNA viral estava em maior concentração no soro do que nos demais componentes sanguíneos. Ao final da terapia observou-se uma alteração da distribuição do RNA entre os componentes de diferentes pacientes. Uma possível explicação para este fato poderia estar associada às variações individuais no potencial de ligação do VHC a componentes sanguíneos neste momento da terapia. No estudo realizado por Chancey et al. (2012) os autores levantaram como possível explicação para as diferenças nas concentrações de carga viral entre os componentes sanguíneos de diferentes doadores de sangue a variação no potencial de ligação do VHC a hemácias e leucócitos. No entanto, assim como no presente estudo, uma avaliação mais

aprofundada desta observação ultrapassa o escopo proposto. Como possível suposição, sugere-se a possibilidade de que a terapia tripla poderia interferir no potencial de ligação do VHC a cada um dos componentes sanguíneos.

Já na 48^a semana estes valores voltaram a cair, o que indica que a 24^a semana do tratamento é uma semana crítica para obtenção da cura da hepatite C, quando em uso da terapia tripla. Esta criticidade é reforçada pelo PCDT para Hepatite Viral C e Coinfecções (2013) ao preconizar reavaliação clínica-laboratorial neste momento da terapia e ser também a semana de definição quanto à resposta ao tratamento. De acordo com este documento o paciente é considerado respondedor parcial se apresentar VHC-RNA detectável na 24^a semana de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A constatação de que na 48^a semana, 17% dos pacientes permanecem com carga viral no soro e no sangue total, 33% permanecem positivos para VHC nas hemácias e plaquetas e que apenas nos leucócitos não foram identificados VHC no final da terapia tripla. Diferente do que foi observado neste estudo, Radkowski e colaboradores (2014) verificaram que baixo nível de RNA do VHC pode persistir nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC - peripheral blood mononuclear cell) após o tratamento bem sucedido da hepatite C crônica com IFN peguilado e ribavirina. Segundo os autores, as consequências desse fenômeno não foram claras, mas não alterou a condição de RVS dos pacientes. Torres e colaboradores (2000) também observaram que o desaparecimento do genoma viral no soro, um critério de resposta ao tratamento, não é necessariamente seguido pelo seu desaparecimento do RNA de VHC nas PBMC de pacientes em tratamento com IFN α . Possivelmente a divergência do achado de carga residual de VHC em linfócitos e monócitos se justificam na diferença existente entre os arsenais terapêuticos utilizados, os quais apresentam mecanismos de ação distintos. À partir da observação da presença de RNA de VHC nas PBMC de pacientes em tratamento com IFN α , Torres e colaboradores (2000) sugeriram que a determinação conjunta de VHC por técnica de PCR sérico e em células sanguíneas deve ser usada como um instrumento particular com cada paciente.

No estudo realizado por Hofstra e colaboradores (2014), um grupo de pacientes infectados com HIV e submetidos à terapia antirretroviral combinada há mais de um ano apresentaram viremia residual (carga viral <50 cópias/mL). Esta

carga residual foi associada ao desenvolvimento de baixos níveis de carga viral (carga viral persistente de 50 a 1.000 cópias/mL), possivelmente, em virtude de replicação viral com risco subsequente de seleção de variantes resistentes aos medicamentos.

Outro fator relevante associado à carga viral residual foi previamente estabelecida na hipótese deste estudo. Esta refere-se à possibilidade de que a carga remanescente poderia ser um risco potencial de transmissão do VHC, visto que o paciente considerado curado permaneceria transmitindo o vírus sem ter consciência da sua real condição.

Nagaharu e colaboradores (2017) descreveram um relato de caso em que o paciente se infectou por PVB19 em decorrência de uma transfusão de hemácias. Exames realizados detectaram baixos níveis de DNA de PVB19 em um dos doadores de sangue. Um teste de homologia de DNA da PVB19 mostrou identidade genômica completa entre o vírus no doador e no paciente do estudo. Segundo os autores este caso demonstra que a infecção persistente por PVB19 pode ser transmitida através da transfusão de hemácias mesmo que este componente apresente um baixo título do DNA PVB19, ainda que inferior à outros componentes sanguíneos.

A associação de vírus a componentes sanguíneos foi descrita, também, por Williamson e colaboradores (2017) no estudo publicado sobre os primeiros casos de doadores de sangue dos EUA infectados pelo vírus Zika. Nesta publicação os autores descreveram que o potencial de transmissão deste vírus por transfusão de componentes sanguíneos tem sido uma preocupação crescente devido à detecção recente de RNA viral em doadores de sangue saudáveis. Os cinco doadores avaliados no estudo apresentaram baixos níveis de RNA viral no plasma, mas moderados níveis do RNA foram detectados associados às hemácias. Segundo os autores estes resultados estão em conformidade com dados publicados sobre uma pequena série de casos de viajantes infectados por vírus Zika (WILLIAMSON, *et al.*, 2017, apud MURRAY, *et al.*, 2017 e LUSTIG, *et al.*, 2016) e semelhantes ao que foi documentado em estudos de acompanhamento de doadores infectados com o WNV (WILLIAMSON, *et al.*, 2017, apud LANTERI, *et al.*, 2014).

Os achados de RNA residual observados no soro, sangue total, hemácias e plaquetas é um resultado surpreendente do presente estudo, visto que 86,0% dos pacientes obtiveram RVS, a qual se caracteriza por RNA de VHC indetectável na 24^a semana de seguimento após o término do tratamento. A análise dos dados, no entanto, esclarece que, apesar de positivos, as cargas virais dos respectivos componentes sanguíneos se mantêm baixas e que esse percentual corresponde a pacientes que atingiram a RVS. Diante desta constatação questiona-se, portanto, a capacidade infecciosa desta carga remanescente, sendo necessário outros ensaios que saem do escopo do presente trabalho. Avaliação semelhante foi realizada por Rios e colaboradores (2007) no estudo sobre a aderência do WNV às hemácias. Neste trabalho, a certificação de que a aderência do WNV às hemácias estaria associada à transmissão deste vírus por transfusão, mesmo em casos de carga viral muito baixa no plasma, foi obtida através de ensaios de infecção em células Vero. Foi observado que os vírus ligados às hemácias eram capazes de infectar estas células quando colocados em cultura, sugerindo que o vírus vinculado é infeccioso.

A realização do ensaio que avalia a capacidade de infecção da carga residual encontrada torna-se necessária, mas ciente das dificuldades de cultivo existentes para o VHC. Na ausência destes testes e diante dos resultados de manutenção da RVS, portanto, a princípio foram descartadas as possibilidades do desenvolvimento de resistência aos medicamentos, como relatado no estudo realizado por HOFSTRA e colaboradores (2014) e da transmissão da carga residual por transfusão sanguínea, como exposto pelos autores Nagaharu e colaboradores (2017), Williamson e colaboradores (2017) e Rios e colaboradores (2007).

Suspeita-se que, mesmo frente ao término do tratamento, o organismo consiga depurar estes vírus remanescentes, principalmente nas hemácias e plaquetas, apesar de não terem sido realizados experimentos que comprovem esta suposição. Este fenômeno poderia ser explicado pelos resultados obtidos por Ribeiro (2015), os quais mostraram o declínio de marcadores de agressão hepática, dos níveis de quimiocinas e da frequência de micropartículas no decorrer do tratamento. A redução destes aspectos sugere que a terapia tripla promove um ambiente favorável para a resposta imune mais eficaz contra o VHC, que está associado com o desencadeamento de mecanismos imunomoduladores que prevalecem ao final do tratamento (RIBEIRO, 2015). A presença deste ambiente

imunomodulador e a retomada da resposta imunológica do paciente após o tratamento podem ser os responsáveis pela depuração de vírus remanescentes ao final do tratamento.

Em concordância com o trabalho de Ribeiro (2015), no estudo da avaliação de carga viral residual em PBMC, Radkowski e colaboradores (2014) observaram que a quantificação de vários transcritos de citocinas e quimiocinas em PBMC revelou níveis de IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e de proteína 1b inflamatória de macrófagos significativamente maiores em pacientes VHC positivos, quando comparados com indivíduos VHC negativos. Diante destes achados os autores associaram a persistência do RNA do VHC em PBMC de pacientes com RVS à ativação imune.

Outra hipótese do presente estudo seria de que a existência de carga viral residual em componentes do sangue que não o soro, indetectável por técnicas laboratoriais vigentes, poderia ter um destaque epidemiológico importante. A partir desta hipótese surge o questionamento se seria necessário substituir o soro por sangue total como amostra para realização dos testes de diagnóstico da hepatite C. Substituição semelhante foi sugerida no trabalho desenvolvido por Rios e colaboradores (2007) mediante a observação de que partículas infecciosas do WNV se associavam a hemácias em uma unidade de ordem de magnitude superior à encontrada no plasma correspondente. A estratégia sugerida pelos autores seria o desenvolvimento de métodos que utilizassem sangue total como amostra de teste e permitissem a extração dos vírus ligados aos componentes celulares do sangue. Esta sugestão poderia, ainda, reduzir o risco residual de transmissão do WNV através da transfusão. A comparação dos resultados obtidos por Rios e colaboradores (2007) com os resultados observados no presente estudo indica diferenças de distribuição e intensidade de ligação do WNV e do VHC com os componentes sanguíneos avaliados. Neste estudo com o VHC não houve evidências concretas que levassem à necessidade de substituição do soro por sangue total como amostra-teste para quantificação do RNA viral. Não encontrou-se diferença significativa dos níveis de cargas virais entre os componentes do sangue avaliados durante a terapia tripla. Quanto aos casos de VHC associado ao componente sanguíneo no final do tratamento observou-se que foram achados pontuais, não determinantes para que o paciente não atingisse RVS.

Ao analisar o estudo pela variável desfecho clínico, observa-se que a taxa de RVS encontrada no estudo, 86,0%, concorda com a maior parte da literatura científica, que aponta para taxas na faixa de 80% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). As análises das cargas, ainda que avaliadas apenas até a quarta semana, apresentam resultados semelhantes aos discutidos anteriormente. Apenas os dados do grupo em que, ao final da terapia, teve Resposta Parcial discordaram do que foi observado nas demais abordagens. Neste grupo, houve aumento da carga viral em todos os componentes sanguíneos na quarta semana de tratamento. Este aumento, no entanto, não alterou a mediana nas demais variáveis pelo fato da maioria dos pacientes terem apresentado redução da carga viral.

No presente estudo foram verificadas as correlações da carga viral presente no soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos em função do tempo de tratamento e dos aspectos laboratoriais como global leucócitos, hemácias, hemoglobina, plaquetas, ALT, AST e gama GT antes e durante o uso dos medicamentos da terapia tripla.

Frente ao objetivo primordial do tratamento da hepatite C: a erradicação do vírus (SILVA, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDEa, 2015), os resultados obtidos das análises de correlação existentes entre a carga viral presente nos componentes sanguíneos avaliados e o tempo de tratamento foram de uma correlação negativa. Esta constatação confirma o sucesso terapêutico obtido pela maioria dos pacientes participantes do estudo.

A avaliação da correlação entre a carga viral e os níveis de leucócitos permite verificar que a carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados se correlacionou positivamente com o nível de leucócitos. Teixeira, Martins-Filho e Oliveira (2005) demonstraram que o aumento da viremia resultou na elevação dos níveis de linfócitos T auxiliares e citotóxico. E que a ao longo do curso da infecção pelo VHC, o controle da viremia levou à consequente redução dessas duas populações celulares.

Observou-se correlação positiva também para a relação entre carga viral em todos os componentes sanguíneos avaliados com os níveis de hemácias, hemoglobina, plaquetas, ALT, AST e gama GT. As correlações positivas referentes às hemácias, hemoglobina e plaquetas estão diretamente relacionadas com os

efeitos adversos dos medicamentos que compõem a terapia tripla (MERCK, 2011; ROCHE, 2014) e não à uma condição patológica associada à hepatite C.

O tratamento antiviral para hepatite C apresenta como principais objetivos a redução da progressão da doença, a prevenção das complicações da cirrose e a redução do risco de carcinoma hepatocelular. O acompanhamento bioquímico dos pacientes deve ser realizado através da avaliação hepática (AST, ALT, GGT, fosfatase alcalina, bilirrubinas, TAP e albumina), função renal (ureia e creatinina), hemograma, glicemia de jejum, sódio e potássio. Estes exames têm sido utilizados como parâmetros para inferir a probabilidade de benefícios da terapêutica a longo prazo, visto que a supressão da replicação viral de maneira sustentada e a redução da atividade histológica diminuem o risco de cirrose e de hepatocarcinoma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). As correlações positivas referentes às enzimas ALT, AST e gama GT inferem que o clareamento viral tenha contribuído para amenizar os danos hepáticos causados pela presença e multiplicação do VHC nos hepatócitos.

Como principal limitação do estudo destaca-se o tamanho reduzido da amostra, justificado pelos critérios restritivos de inclusão dos pacientes na terapia antiviral com os inibidores de protease, o que, possivelmente, reflete a população submetida à esta terapia na vida real. Outra limitação é que o tratamento da hepatite C crônica com estes medicamentos já foi substituído pelos novos agentes antivirais de ação direta, mas o entendimento da evolução da terapia antiviral em seus diversos aspectos como a interação do VHC com componentes sanguíneos e fenômenos imunes envolvidos se mantém pertinente.

A abordagem deste estudo apresentou, de forma panorâmica, a quantificação cinética da carga viral em cinco componentes do sangue de pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C e suas variações no decorrer da terapia tripla.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo comprovaram a presença de altas cargas virais associadas aos componentes sanguíneos. Este achado poderá ser utilizado como estudo base para a verificação de mecanismos imunes envolvidos nesta associação. Acredita-se, que essa associação vírus-componentes do sangue induz mecanismos de transmissão e consequente captação pelas células do hospedeiro.

A observação de que a 24^a semana da terapia tripla é uma semana crítica para obtenção da cura da hepatite C, devido ao aumento dos percentuais de pacientes com hemácias e plaquetas positivas para VHC, precisa ser melhor compreendida. A possível explicação de que este aumento poderia estar associado às variações individuais no potencial de ligação do VHC a componentes sanguíneos neste momento da terapia, necessita de uma avaliação mais aprofundada.

Quanto à observação da presença de baixas cargas virais no soro, sangue total, hemácias e plaquetas na 48^a semana da terapia tripla, sugere-se outros estudos para avaliação da cinética da carga viral, após o término da terapia tripla. Estudo semelhante poderia ser realizado para a avaliação da terapia preconizada atualmente, o tratamento utilizando os medicamentos antivirais diretos, sem uso concomitante de interferon.

8 CONCLUSÃO

A concretização deste estudo demonstra que, à semelhança dos pacientes infectados assintomáticos avaliados por Chancey *et al* (2012), pacientes infectados pelo VHC cronicamente apresentam altas cargas virais associadas aos componentes sanguíneos, em conformidade com a hipótese do estudo. O vírus da hepatite C está presente, além do soro e sangue total, como esperado, em outros componentes do sangue, como hemácias, plaquetas e leucócitos.

Observou-se, ainda, que o tratamento medicamentoso da infecção provocou uma alteração na cinética de interação do vírus com os componentes do sangue. Embora cargas virais altas tenham sido detectadas em todos os componentes do sangue avaliados, antes do tratamento dos pacientes cronicamente infectados pelo VHC, a terapia tripla foi eficiente e efetiva. Este tratamento foi capaz de reduzir substancialmente a carga viral em todos os componentes sanguíneos ao longo das 48 semanas, condição associada ao alcance de uma RVS na maioria dos pacientes que receberam a terapia tripla.

Os resultados demonstraram também que a 24^a semana da terapia tripla é uma semana crítica para obtenção da cura da hepatite C. Recomenda-se, assim, a atenção dos profissionais da saúde para os resultados dos exames de pacientes que estejam nesta fase do tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afdha LN, MC Hutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, et al. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol*. 2008. 48:1000–7. doi:10.1016/j.jhep.2008.03.009

Agrati C, Nisii C, Oliva A, et al. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. v.50, n.5, p.307-16, 2002.

Ali RA, Wuescher LM, Worth RG. Platelets: essential components of the immune system. *Curr Trends Immunol*. 2015; 16: 65–78.

Almeida AJ de, Campos-de-Magalhaes M, Brandao-Mello CE, et al. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. *Hepatogastroenterology* 2007; 54:964–968.

Almeida AJ de, Campos-de-Magalhaes M, Brandao-Mello CE, et al.: Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. *Hepatogastroenterology* 2009; 56:429–436.

Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australiaantigen-positive hepatitis. *Lancet* 1971; II: 1225.

Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321:1494.

Alter JJ, Houghton M. Clinical Medical Research Award Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med* 6:1082-1086; 2001.

Applied Biosystems. Real time PCR systems. Absolute quantification getting started guide. Atlanta, 2005.

Ariede, JR *et al*. Platelets can be a biological compartment for the Hepatitis C Virus. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 2, 627-629; 2015.

Asfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Viol. J.* 11, 161-171, 2011.

Assinger, Alice. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection during anti-platelet therapy. *Frontiers in Immunology, Inflammation.* 2014, Volume 5, Article 649, 1.

Aster RH. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia. *J ClinInvest.* 1966. 45:645–57.doi:10.1172/JCI105380

Athar, et al. Rapid detection of HCV genotyping 1a, 1b, 2a, 3a, 3b and 6a in a single reaction using two-melting temperature codes by a real-time PCR-based assay. *Journal of Virological Methods;* 222; 85–90; 2015.

Bandiera S, Pfeffer S, Baumert TF, Zeisel MB. miR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of Hepatology* 2015 vol. 62 j 448–457.

Bartenschlager R, Kaul A, Sparacio S. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiv Res. V.* 60(1), p.91-102, 2003.

Beck Z, Brown BK, Wieczorek L, Peachman KK, Matyas GR, Polonis VR, Rao M, Alving CR. Human erythrocytes selectively bind and enrich infectious HIV-1 virions. *PloS One.* 2009 Dec 14; 4(12):e8297.

Bedossa, Pierre e Poynard, Thierry, for the Metavir Cooperative Study Group Hepatology. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. Vol. 24, No. 2, 1996.

Beeson PB. The growth of knowledge about a disease: hepatitis. *Am J Med* 1979; 67: 366.

Bertoletti A, Maini MK. Protection or damage: a dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:403-408.

Bezerra, Cristianne Sousa. Estudo molecular do vírus da hepatite C isolado de pacientes atendidos em hospital de referência em Fortaleza, Ceará [dissertação].

Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica; 2006.

Blumberg BS, Melartin L, Guinto RA, Werner B. Family studies of a Human Serum Isoantigen System (Australia Antigen). *Am J Human Genet* 1966; 18: 594.

Boonstra A, Laan LJW, Vanwollegghem T, Janssen HLA. Experimental models for hepatitis C viral infection. *Hepatology*. 2009; 5(50):1646-55.

Bowen DG, Walker CM. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? *J Hepatol*, v.42, n.3, p.408-417, Mar. 2005.

Bung C, Bochkaeva Z, Terenin I, Zinovkin R, Shatsky IN, Niepmann M. Influence of the hepatitis C virus 3' - untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Letters*. 2010; 584(4):837-42.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. *J Viral Hepat* 2007; 14 Suppl 1:64-7.

Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.*, 15, pp. 41–63, 1995.

Busek S, Oliveira GC. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genet Mol Res*, v. 2, n.1, p.117-123, Mar. 2003.

Bustin SA, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55:4; 611–622; 2009.

Campiotto et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, p. 1,41-49, 2005.

Carnielli, Lorena. Detecção molecular de *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro [dissertação]. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; 2014.

Chancey C, Winkelman V, Foley JB, Silberstein E, Teixeira-Carvalho A, Taylor DR, Rios M. Distribution of hepatitis C virus in circulating blood components from blood donors. *Vox Sang*, 103, 99-106, 2012.

Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*, v.7, n.1, p.89-105, Feb. 2003.

Cholongitas E, Papatheodoridis GV, Vangeli M, Terreni N, Patch D, Burroughs AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 22 (11-12): 1079–89. Dec 2005.

Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.

Coelho, Nivaldo. Novos medicamentos para hepatite C começam a ser distribuídos. Sistema único de Saúde – SUS. Portal da saúde. Cidadão. Agência Saúde. Outubro, 2015 [acesso em 08 de outubro de 2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20305-novos-medicamentos-para-hepatite-c-comecam-a-ser-distribuidos>.

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e coinfeções – Relatório de recomendação. Brasília: Ministério da Saúde. Nº xxx. Junho/2015.

Conte, Vinício Paride. Hepatite crônica por vírus C. Parte 1. Considerações gerais. V. 37 - no. 3 - jul./set. 2000. *Arq Gastroenterol*.

Costa, Vanessa Duarte da. Mutações na região NS3 do genoma do vírus da hepatite C associadas à resistência aos inibidores de protease [dissertação]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical; 2016.

Cruz, Soriane de Souza. Avaliação da resposta imune e frequência do polimorfismo de TNF- A- 308 em pacientes com hepatite C [dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas; Instituto de Ciências Biológicas; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada; 2013.

Dammacco F, Sansonno D, Piccoli C, Tucci FA, Racanelli V. The cryoglobulins: an overview. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 628–38.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; I: 695.

De Almeida AJ, Campos-De-Magalhães M, Brandão-Mello CE, De Oliveira RV, Yoshida CF, Lampe E. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to viral and host factors. *Hepatogastroenterology*. 2007. 54, 964-8.

De Almeida AJ, et al. Detection of hepatitis C virus in platelets: evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. *Hepatogastroenterology*. 2009 Mar-Apr;56(90):429-36.

Dolganiuc A, Szabo G. T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84:614-622.

Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology* 2014 vol. 61 j S3–S13.

Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol*. 2007;13(17):2406-15.

Egger D, Wölk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002; 76(12):5974-84.

Einav S, Sobol HD, Gehrig E, Glenn JS. The hepatitis C virus (HCV) NS4B RNA binding inhibitor clemizole is highly synergistic with HCV protease inhibitors. *J Infect Dis* 2010; 202(1):65-74.

Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, Mckinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 15:883–95; 2001.

Escutenaire S, Cerullo V, Diaconu I, Ahtiainen L, Hannuksela P, *et al.* In vivo and in vitro distribution of type 5 and fiber-modified oncolytic adenoviruses in human blood compartments. *Ann Med*. 2011 Mar;43(2):151-63. Epub 2011 Jan 25.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New Engl J Med* 1975; 292: 767-770.

Flaujac C, Boukour S, Cramer-Borde E. Platelets and viruses: an ambivalente relationship. *Cell Mol Life Sci.* 2010. 67:545–56.doi:10.1007/s00018-009-0209-x

Fonseca, José Carlos Ferraz da. Histórico das hepatites virais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(3):322-330, mai-jun, 2010.

Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol*, v.7, n.10, p.402-410, Oct. 1999.

França, Divânia Dias da Silva. Infecção pelo vírus da hepatite C em profissionais do sexo em Goiânia, Goiás [dissertação]. Goiás: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem; 2011.

Freemann AJ, Marinos G, Ffrench RA et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol*, v.79, n.6, p.515-536, Dec. 2001.

Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol.* 2001; 75(24):12047-57.

Friebe P, Boudet J, Simorre JP, Bartenschlager R, Kissing-Loop. Interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol.* 2005;79(1):380–92.

Gale MJ, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature.* 2005; 436: 939-945.

Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-941.

Gibellini D, Clo A, Morini S, Miserochi A, Ponti C, Re MC. Effects of human immunodeficiency virus on the erythrocyte and megakaryocyte lineages. *World J Virol.* 2013. 2:91–101.doi:10.5501/wjv.v2.i2.91

Gimenez-Barcons M, Wang C, Chen M, Sanchez-Tapias JM, Saiz JC, Gale MJ. The oncogenic potential of hepatitis C virus NS5A sequence variants is associated with PKR regulation. *J Interferon Cytokine Res.* 25:152–64; 2005.

Goeijenbier M, Van Wissen M, Vande Weg C, Jong E, Gerdes VE, Meijers JC, et al. Review: viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. *J Med Virol*. 2012. 84:1680–96.doi:10.1002/jmv.23354.

Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathology* 2006;1:23-61.

Hamaia S, Chengyao L, Jean-Pierre A. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood* 27, 2293-2300, 2012.

Hamaia S, Li C, Allain JP. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood* 98:2293-2300; 2001.

Harrison TJ. Hepatitis E virus - an update. *Liver* 1999; 19: 171.

Haydon GH, Jarvis LM, Blair CS, Simmonds P, Harrison DJ, Simpson KJ, Hayes PC. Clinical significance of intrahepatic hepatitis C virus levels in patients with chronic HVC infection. *Gut* 1998; 42:570-5.

Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schüttler CG, Fehr C, et al. MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 2008; 27: 3300–3310.

Hofstra, Laura Marije et al. Residual Viremia Is Preceding Viral Blips and Persistent Low-Level Viremia in Treated HIV-1 Patients. *Plos One*, Volume 9, Issue 10, e110749, October 2014.

Hoofnagle JH, Gerety RJ, Tabor E, Feinstone SM, Barker LF, Purcell RH. Transmission of non-A, non-B hepatitis. *Ann Int Med* 1977; 87:14-20.

Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan S-L. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication. *J Virol* 2007; 364: 1-9

Iwarson S, Norkrans G, Wejstal R. Hepatitis C: Natural history of a unique infection. *Clin Infect Dis*. 1995;20:1361–70.

Janeway JR, CA, Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, v.20, p.197- 216, Apr. 2002.

Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 2010;84: 6615–6625.

Johnson CL, Gale MJ. CARD games between virus and host get a new player. *Trends Immunol*. 27:1–4; 2006.

Joseph ML, et al. Hepatitis C Virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell* 160, 1099–1110, March 12, 2015.

Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes Infect*. 2010;12(4):263-71.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309:1577–1581.

Karshovska E, Weber C, Von Hundelshausen P. Platelet chemokines in health and disease. *Thromb Haemost*. 2013. 110:894–902.doi:10.1160/TH13-04-0341

Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterol* 1975; 69: 1278-1285.

Kolykhalov AA, Feinstone SM, Rice CM. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996; 70(6):3363-71.

Koskinas J, Mcfarlane BM, Nouri-Aria KT, Tibbs CJ, Mizokami M, Donaldson PT, Mcfarlane IG, Williams R. Cellular and humoral immune reactions against autoantigens and hepatitis C viral antigens in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107: 1436-1442 [PMID: 7523226 DOI: 10.1016/0016-5 085(94)90547-9].

Koupenova M, Vitseva O, Mackay CR, Beaulieu LM, Benjamin EJ, Micke, et al. Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood*. 2014. 124:791–802. doi:10.1182/blood-2013-11-536003

Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious Hepatitis. Evidence for two distinctive clinical epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200: 365.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125.

Lachgar A, Jaureguiberry G, Le Buenac H, et al. Binding of HIV-1 to RBCs involves the Duffy antigen receptors for chemokines (DARC). *Biomed Pharmacother*, 1998, vol. 52 (pg. 436-9).

Lanteri MC, et al. West Nile virus nucleic acid persistence in whole blood months after clearance in plasma: implication for transfusion and transplantation safety. *Transfusion*; 54:3232–41, 2014.

Lauer, GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345:41-52.

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-1512.

Levada, Patrícia Martinez et al. Hibridização reversa e sequenciamento na genotipagem do vírus da hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - SBMT*, v. 43, n. 2, p. 135-138, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/11530>>.

Levinson, Warren. *Microbiologia médica e imunologia*. 13ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. 788 p., il. ISBN 9780071818117.

Li X, Jeffers LJ, Garon C, Fischer ER, Scheffel J, Moore B, et al. Persistence of hepatitis C virus in a human megakaryoblastic leukaemia cell line. *J Viral Hepat*. 1999. 6:107–14. doi:10.1046/j.1365-2893.1999.00140.x

Li YP, Ramirez S, Mikkelsen L, Bukh J. Efficient Infectious Cell Culture Systems of the Hepatitis C Virus (HCV) Prototype Strains HCV-1 and H77. *Journal of Virology*. January 2015, Volume 89, Number 1.

Linnen J, Wages JR J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease associated with hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271:505-508.

Lustig Y, et al. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Euro Surveill*; 21, 2016.

Lustig Y et al. Superiority of West Nile Virus RNA Detection in Whole Blood for Diagnosis of Acute Infection. *J Clin Microbiol*. 2016 Sep;54(9):2294-7.

Lutteke N, Raftery MJ, Lalwani P, Lee MH, Giese T, Voigt S, et al. Switch to high-level virus replication and HLA class I upregulation in differentiating megakaryocytic cells after infection with pathogenic hantavirus. *Virology*. 2010. 405:70–80.doi:10.1016/j.virol.2010.05.028

Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 50 terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3193–3198.

Madan V, Bartenschlager R. Structural and Functional Properties of the Hepatitis C Virus p7 Viroporin. *Viruses* 2015, 7, 4461-4481; doi:10.3390/v7082826.

Malacrida, Miyamoto, Menezes, Santos Neta e Bertolini. Prevalência dos genótipos do vírus da hepatite C na macrorregião noroeste do estado do Paraná, Brasil. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 9, n. 2, p. 381-388, maio/ago. 2016 - ISSN 1983-1870 - e-ISSN 2176-9206.

Marques, Brunna Lemos Crespo. Otimização de protocolos de testes moleculares para detecção e quantificação do vírus da hepatite C em sangue coletado em papel de filtro [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

Martins T, Narciso-Schiavon JL, Schiavon, LL. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57(1):107-112.

Maugeri N, Cattaneo M, Rovere-Querini P, Manfredi AA. Platelet clearance by circulating leukocytes: a rare event or a determinant of the “immunecontinuum”? *Platelets*. 2014. 25:224–5.doi:10.3109/09537104.2012.763116

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454: 428–435, 2008.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449: 819–826, 2007.

Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda, 2011. Bula da Ribavirina.

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 144 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 144 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções: manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 de HCV e fibrose avançada / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 52 p.: il. Suplemento nº1 do Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções: manejo do paciente infectado cronicamente pelo genótipo 1 de HCV e fibrose avançada. ISBN 978-85-334-2017-5

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Suplemento 2 do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Hepatite Viral C e Coinfeções - Genótipo 1 do HCV e fibrose avançada / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais; Coordenação de Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. (BRASIL, 2013 – suplemento 2)

Ministério da Saúde (a) (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfeções/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

Ministério da Saúde (b) (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. O Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 68 p. : il.

Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das DST, Aids e Hepatites Virais (DDAHV). Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. Ano V - nº 01. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest*. 1996; 98(3):706–14. doi: 10.1172/JCI118842.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Jun;5(6):453-63. Epub 2007 May 8. Review.

Moreira, Leandro Marcio (organizador). Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 p: il.

Murphy DG, Chamberland J, Dandavino R, Sablons E. A new genotype of hepatitis C virus originating from Central Africa. *Hepatology*. 2007;46(4):623A-4A.

Murray, et al., 2017 et al. Prolonged detection of Zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg Infect Dis*; 23:99–101, 2017.

Morrell, CN, et al.. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014 May 1; 123(18): 2759-2767.

Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80: 646-658.

Nagaharu K, et al.. Persistent symptomatic parvovirus B19 infection with severe thrombocytopenia transmitted by red blood cell transfusion containing low parvovirus B19 DNA levels. *Transfusion*; 57; 1414–1; 2017.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Bioch Biophys Res Com* 1997; 241: 92-97.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 60: 167-177, 1990.

Oliveira CP. Caracterização molecular do vírus da Hepatite C em indivíduos co-infectados com HIV-1 [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular; 2007.

Oliveira, Renato Souza de. Otimização e utilização da técnica da PCR em tempo real quantitativa (qPCR) na detecção e quantificação de infecção ativa causada pelos betaherpesvírus em amostras de plasma de pacientes transplantados de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2015.

Pang OS, Jankowsky E, Planet PJ, Pyle AM. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. 2002 EMBO; 21:1168-1176.

Passos AM, Treitinger A, Spada C. An overview of the mechanisms of HIV-related thrombocytopenia. *Acta Haematol.* 2010. 124:13–8. doi:10.1159/000313782

Paul D, Romero-Brey I, Gouttenoire J, Stoitsova S, Krijnse-Locker J, Moradpour D, et al. NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional HCV replication complexes. *J Virol* 2011; 85: 6963-6976.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology.* 2004 Jan;39(1):5-19.

Perone C, Castilho DM del, Pereira GL, Carvalho NO, Januário JN, Teixeira R. Alta prevalência do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(3):238-242, mai-jun, 2008.

Perone, Carlos. Perfil genotípico do HCV em portadores de hepatite C em Belo Horizonte, Minas Gerais-Brasil [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, na área de concentração Propedêutica Complementar; 2007.

Pillo, FD. Imunocaptura do vírus de influenza aviária para diagnóstico em RT-PCR em tempo real [dissertação]. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal; 2010.

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, De Jong YP, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 2009; 457(7231):882-6.

Popescu CI, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, et al. NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly. *PloS Pathog* 2011; 7: 1-20.

Price, JC et al. Effectiveness of Telaprevir and Boceprevir Triple Therapy for Patients with Hepatitis C Virus Infection in a Large Integrated Care Setting. *Digestive Diseases and Sciences*. December 2014, Volume 59, Issue 12, pp 3043-3052.

Prince AM. Relation of Australia and SH antigens. *Lancet* 1968; II: 462.

Queiroz, Artur Trancoso Lopo de. Seleção natural no vírus da hepatite C: A influência do sistema imune na resposta ao tratamento [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, 2010.

Radkowski, Marek et al. Evidence for immune activation in patients with residual hepatitis C virus RNA long after successful treatment with IFN and ribavirin. *Journal of General Virology*, 95, 2004–2009; 2014.

Ray SC, Fanning L, Wang XH, Netski DM, Kenny-Walsh E, Thomas DL. Divergent and convergent evolution after a common-source outbreak of hepatitis C virus. *J Exp Med* 2005;201:1753-1759.

Rehermann B. Interaction between the hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 127–41.

Reuben A. Landmarks in hepatology: the thin red line. *Hepatology*, 2002; 36:770-773.

Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-1339.

Rezende C, Malta RCG, Custódio FL, Ferreira DJ. Hepatite C: Inimigo silencioso. *Ciência e Cultura - Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB*. Novembro de 2008;3(2):57-70.

Ribeiro, Isabela Gomes. Aspectos Clínico-Laboratoriais, Perfil de Quimiocinas e Micropartículas Circulantes em Pacientes Portadores da Infecção Crônica pelo VHC Antes e Durante a Terapia Tripla [dissertação]. Belo Horizonte: Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na área de concentração de Doenças infecciosas e parasitárias; 2015.

Rios M, Daniel S, Chancey C, Hewlett IK, Stramer SL. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin Infect Dis*. 2007 Jul 15;45(2):181-6.

Rizzetto M, Canese MG et al. Immunofluorescence detection of a new antigenantibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in sérum of HbsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997.

Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, Wychowski C, Helle F, Pillez A, et al. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One*. 2008;3(4):e1866.

Roche. Bula do interferon peguilado. 2014.

Roingard P, Hourieux C, Blanchard E, Brand D, Ait-Goughoulte M. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 2004; 96:103-108.

Romano KP, Laine JM, Deveau LM, Cao H, Massi F, Schiffer CA. Molecular mechanisms of viral and host-cell substrate recognition by HCV NS3/4A protease. *J Virol* 2011; 377-311.

Rosen HR, Gretch DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Molecular Medicine Today* 5:393-399, 1999.

Sabroza, Paulo Chagastelles; WALTNER-TOEWS, David. Doenças emergentes, sistemas locais e globalização. Editorial. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(Suplemento):4-5, 2001.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell, RH, Bukh J. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally

important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 11646–11651.

Saraceni, Claudia Patara. *Vigilância das hepatites virais: a experiência de Vargem Grande Paulista, 1997-1999*. São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública].

Schmid R. History of viral hepatitis: a tale of dogmas and misinterpretations. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 718.

Schmidt WN, Klinzman D, Labrecque DR, et al. Direct detection of hepatitis C virus (HCV) RNA from whole blood, and comparison with HCV RNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1995; 47:153–160.

Schmidt WN, Wu P, Han JQ, et al. Distribution of hepatitis C virus (HCV) RNA in whole blood and blood cell fractions: plasma HCV RNA analysis underestimates circulating virus load. *J Infect Dis* 1997; 176:20–26.

Semple JW, Italiano JE JR, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011. 11:264–74.doi:10.1038/nri2956

Sharma, SD. Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res*. 2010;131:17-34.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 558–67.

Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SM. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 30 of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *J Virol* 2012;86:7372–7383.

Silva AL, Vitorino RR, Esperidião-Antonio V, Santos ET, Santana LA, Henriques BD, Gomes AP. Hepatites virais: B, C e D: atualização. *Rev Bras Clin Med*. São Paulo, 2012 mai-jun;10(3):206-18.

Silva, Allan Peres da. *Mutações nos genes não estruturais do vírus da hepatite C associadas à resistência aos novos antivirais [tese]*. Rio de Janeiro: Ministério da

Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária; 2014.

Silva, Denise Rossato. Prevalência de Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Faculdade de Medicina; Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas; 2008.

Silva, L. C. da. Conceito, tipos de hepatites por vírus e evolução dos conhecimentos. In: Silva, L. C. da. Hepatites agudas e crônicas. São Paulo: SARVIER, 1995.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. J Gen Virol. 2004;85(Pt 11):3173-88.

Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. Hepatology 21: 570-583, 1995.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology. 2005;42(4):962-73.

Simmonds P, Mcomish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. J Gen Virol. 1993;74(Pt 4):661-8.

Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. Nature Med 1995; 1:564-569.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Hepatites Virais. Junho, 2016. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/hepatites-virais>. Acesso em: 08 de outubro de 2016.

Smith, et al. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. Hepatology, Vol. 59, No. 1, 2014.

Smolić M, Smolić R, Vcev A. Management of side effects induced by antiviral therapy for chronic hepatitis infection. Acta Med Croatica. 2013 Oct;67(4):383-7.

Soares, Eric Bassetti. Aspectos fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa em portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Gastroenterologia; 2006.

Speth C, Loffler J, Krappmann S, Lass-Flörl C, Rambach G. Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol.* 2013. 8:1431–51. doi:10.2217/fmb.13.104

Stapleton JT, Klinzman D, Schmidt WN, et al. Prospective comparison of whole-blood- and plasma-based hepatitis C virus RNA detection systems: improved detection using whole blood as the source of viral RNA. *J Clin Microbiol* 1999; 37:484–489.

Strauss, Edna. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34(1):69-82, jan-fev, 2001.

Sultan MT, Rahman MM, Begum S. Epidemiology of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *J Bangladesh Coll Phys Surg.* 2009;27(3):160-5.

Suzuki R, et al. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2007;42(6):411-23.

Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, et al. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct,* 2004; 22:353–358.

Tampaki M, Koskinas J. Extrahepatic immune related manifestations in chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol,* 2014 September 21; 20(35): 12372-12380.

Tanaka T, Kato N, Cho MJ, Sugiyama K, Shimotohno K. Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome. *J Virol* 1996; 70(5):3307-12.

Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, et al. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and relationship to TTV family. *J Inf Dis* 2001, 183: 359-367.

Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in the liver regeneration. *Semin Liver Diseases* 1999;19:117-127.

Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MMC. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by the HCV E2 protein. *Science*. 285:107–10; 1999.

Te HS, Jensen DM. Epidemiology of Hepatitis B and C Viruses: A Global Overview. *Clin Liver Dis*. 2010;14(1):1-21.

Teixeira, Rosângela; Martins-Filho, Olindo Assis; Oliveira, Guilherme Corrêa de. Hepatite C: aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. Belo Horizonte/Rio de Janeiro: COOPMED/Ed. FIOCRUZ, 2005. 192 p. il., tab. ISBN 85-85002-80-0.

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 2005; 435(7040):374-9.

Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 2001;194:1395-1406.

Thio, C. Host genetic factors and antiviral immune responses to HCV. *Clin Liver Diseases* 2008;12(3):713-727.

Too, HP. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research*, Amsterdam 2003;114:146-154.

Torres B, Martin JL, Caballero A, et al.. HCV in serum, peripheral blood mononuclear cells and lymphocyte subpopulations in C-hepatitis patients. *Hepatol. Res* 2000; 18:141–151.

Torres-Puente M, Cuevas JM, Jiménez-Hernández N, Bracho MA, García-Robles I, Wrobel B, et al. Using evolutionary tools to refine the new hypervariable region 3 within the envelope 2 protein of hepatitis C virus. 2008. *Infect Genet Evol*. 2008;8(1):74-82.

Trzeciak-Ryczek A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Platelets--an important element of the immune system. *Pol J Vet Sci.* 2013;16(2):407-13.

Tsai W-C, Hsu S-D, Hsu C-S, Lai T-C, Chen S-J, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2012;122:2884–2897.

Universidade de Pernambuco. Núcleo de Pós-Graduação. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Brasil: 2010.

Van Der Meer AJ, Farid WRR, Sonneveld MJ, De Ruiter PE, Boonstra A, Van Vuuren AJ, et al. Sensitive detection of hepatocellular injury in chronic hepatitis C patients with circulating hepatocyte-derived microRNA-122. *J Viral Hepat* 2013;20:158–166.

Varaldo, Carlos. Carga Viral abaixo de 400.000 é excelente prognostico de cura da hepatite C. Nov. 2006. Disponível em: http://hepato.com/p_carga_viral/004_cargaviral_port.php.

Verdegem D, Badillo A, Wieruszeski JM, Landrieu I, Leroy A, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G, Hanouille X. Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A. *J Biol Chem* 2011; 286(23):20441-54.

Vieira, Deusilene Souza. Padronização de uma técnica molecular para quantificação do vírus da hepatite C em amostras de pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPEM [tese]. Porto Velho: UNIR - Universidade Federal De Rondônia, IPEPATRO – Instituto De Pesquisas Em Patologias Tropicais, CEPEM – Centro De Pesquisa Em Medicina Tropical De Rondônia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental; 2010.

Von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2007. 100:27–40.doi:10.1161/01.RES.0000252802.25497.b7

Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost.* 2003. 1:1897–905.doi:10.1046/j.1538-7836.2003.00304.x.

WHOa - World Health Organization. Hepatitis C – 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acesso em: 05 outubro 2016.

WHOb - World Health Organization. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021 - Towards ending viral hepatitis. Geneva, 2016.

Williamson, Phillip C. et al. First cases of Zika virus–infected US blood donors outside states with areas of active transmission. *TRANSFUSION*; 57; 770–778; 2017.

Wilson JA, Zhang C, Huys A, Richardson CD. Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation. *J Virol* 2011;85:2342–2350.

Wodewotzky, Thaila Isabel. Padronização da técnica de PCR em tempo-real na avaliação da pluripotência de células-tronco mesenquimais caninas [Trabalho de Conclusão de Curso]. – Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Departamento de Microbiologia/Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Botucatu, SP, Bacharelado – Ciências Biológicas; 2010.

Wozniak AL, Griffin S, Rowlands D, Harris M, Yi M, Lemon SM, et al. Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production. *PLoS Pathog* 2010; 6(9):e1001087.

Yang M, Ng MH, Li CK. Thrombocytopenia in patients with severe acute respiratory syndrome (review). *Hematology*. 2005 10:101–5.doi:10.1080/10245330400026170

Yeh CH, Chen TC, Chang ML, Hsu CW, Yeh TS, Lee WC, et al. Identification of NV-F virus in hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2002; 79: 92-96.

Yeh CT, Tsao ML, Lin YC, Tseng IC. Identification of a novel single-stranded with human hepatitis. *J Inf Dis* 2006; 193:1089-1097.

Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer EM. Host defense role of platelets: engulfment of HIV Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment is enhanced by platelet activation. *Blood*, 2002, vol. 99 (pg. 4021-9).

Zahn A, Jennings N, Ouwehand WH, Allain JP. Hepatitis C virus interacts with human platelet glycoprotein VI. *J Gen Virol.* 2006. 87:2243–51. doi:10.1099/vir.0.81826-0.

Zeremski M, Petrovic M, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 2007;14:675-687.

Zhu H, Zhao H, Collins CD, Eckerrode SE, Ruan Q, et al. Gene expression associated with interferon alfa antiviral activity in an HCV replicon cell line. *Hepatology.* 37: 1180–1188, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: “Fisiopatologia da Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica”.

Número do protocolo:

Prezado(a)

Sr(a). _____

O(A) Sr(a). está sendo convidado para participar de um estudo denominado “Aspectos fisiopatológicos da hepatite C crônica: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica”.

Antes que o(a) Sr(a). decida participar, é importante que saiba por que o estudo está sendo feito e o que ele significará para o(a)Sr(a). O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais revisou os objetivos e a proposta deste estudo e forneceu um parecer favorável para a sua realização.

Este documento tem a finalidade de fornecer todas as informações que o(a) Sr(a). precisa saber. Tome o tempo que precisar para ler este documento com atenção. O(a) Sr(a). poderá fazer as perguntas que desejar a fim de compreender totalmente os objetivos e os métodos deste estudo antes de decidir se deseja ou não participar.

QUAL É A FINALIDADE DO ESTUDO?

A finalidade deste estudo é obter um melhor entendimento da associação do vírus causador da hepatite C com o sangue e seus componentes, ou seja, suas células, como as hemácias e as plaquetas, e investigar e implantar um método de monitoração de carga viral mais sensível que o método convencional utilizado. Entender o impacto dessa interação na doença dos pacientes HCV positivos antes, durante e após o tratamento será muito importante para orientar os médicos sobre como tratar melhor os pacientes no futuro.

O estudo será realizado a partir de amostras de sangue oriundas do(a) Sr(a) em momentos distintos do tratamento da hepatite C (pré-tratamento, durante e ao término do tratamento) realizado conforme o protocolo do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (AHEV/IAG/HC/UFMG).E, a partir destas amostras, serão realizados testes que nos permitam entender a interação do vírus com o sangue e a importância disto no tratamento proposto por seu médico. Estes testes serão realizados na Fundação Osvaldo Cruz, Laboratório de Biomarcadores, em Belo Horizonte, coordenado pelo Dr. Olindo Assis Martins Filho que é o coordenador geral deste projeto, juntamente com a sub-coordenadora Prof.^a Rosângela Teixeira, que também coordena o Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

Espera-se que o estudo comece em 2013 e que a inclusão de pacientes ocorra até 2016. Se o(a) Sr(a). atender às exigências para entrar no estudo e concordar em participar, a duração da sua participação esperada será de aproximadamente 18 meses, dependendo do início e da duração do tratamento determinado para o seu caso estabelecido pelo seu médico. Portanto, este estudo não irá modificar em nada o tratamento da hepatite C que está sendo proposto para o(a) Sr(a). pelo seu médico.

EU PRECISO PARTICIPAR?

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. O seu tratamento e a sua relação com seu médico não serão afetados caso o(a) Sr(a). opte por não participar dele.

Se o(a) Sr(a). optar por participar, precisará assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para confirmar que a finalidade, duração e efeitos previsíveis do estudo foram explicados e que o(a) Sr(a).concordou em participar.

Com o consentimento, o(a) Sr(a). dará a sua permissão para que amostras de sangue sejam coletadas e que informações específicas contidas no seu prontuário médico sejam extraídas. Estas informações serão confidenciais e anotadas pela pesquisadora principal do estudo e serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes visando o melhor entendimento dos fatores envolvidos na pesquisa. É

importante que o(a) Sr(a). saiba que a sua identidade será preservada e que as anotações não serão identificadas com o seu nome.

O(a) Sr(a). poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem afetar de maneira alguma a sua assistência médica futura. Para se retirar deste estudo, notifique à pesquisadora principal do estudo ou o coordenador de pesquisas do grupo de hepatites (veja as informações para contato abaixo).

O pesquisador responsável ou autoridades regulatórias podem encerrar o estudo ou a sua participação no estudo, a qualquer momento, sem o seu consentimento. Contudo, o seu tratamento não será jamais interrompido por este motivo e o(a) Sr(a). continuará com a mesma assistência médica inicial. Portanto, a interrupção do tratamento só acontecerá por motivos médicos, conforme decisão do seu médico, e não por causa dessa pesquisa.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU PARTICIPAR?

Se o(a) Sr(a). concordar em participar deste estudo, amostras de sangue oriundas do(a) Sr(a) em momentos distintos do tratamento da hepatite C (pré-tratamento, durante e ao término do tratamento) serão coletadas e o seu médico preencherá um questionário com informações sobre o(a) Sr(a)., a sua doença. O questionário coletará informações sobre o(a) Sr(a)., como idade, sexo e histórico médico relevante. Coleta também informações sobre a hepatite C, o tratamento indicado para a hepatite C e outros tratamentos que forem indicados para o seu caso.

É importante que saiba que para que o(a) Sr(a). participe do estudo, não será necessário comparecer a nenhuma consulta extra, tomar qualquer outro medicamento experimental ou outro medicamento que não seja os que seu médico lhe receitou. O(A) Sr(a). também não será submetido(a) a nenhum exame adicional para que participe deste estudo. Somente será feito o procedimento de coleta do sangue no ambulatório do Hospital das Clínicas para posterior análise no laboratório. É importante esclarecer que estas coletas não afetarão em nada o seu tratamento proposto.

A sua participação neste estudo não terá impacto sobre as decisões de tratamento feitas pelo seu médico.

O(A) Sr(a). será solicitado(a) a continuar participando do estudo após a sua entrada

até a conclusão do seu tratamento ou então até que o(a) Sr(a). decida sair do estudo ou que ele seja encerrado. Pediremos que informe ao seu médico caso mude de residência e ainda que nos forneça informações sobre uma pessoa para contato alternativo (família ou amigo) que estará autorizada a informar o seu último endereço conhecido e o número de telefone, caso o seu médico e equipe não sejam capazes de contatá-lo.

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Conforme dito acima, este estudo não requer que o(a) Sr(a). tome qualquer medicamento fora do tratamento proposto pelo médico(a) que o assiste na rotina. Este estudo também não irá modificar nada no tratamento proposto que seguirá o protocolo do serviço. Portanto, a sua participação no estudo não irá trazer riscos adicionais àqueles que são do próprio tratamento da hepatite C e que lhe serão explicados pelo seu médico e equipe do ambulatório antes que inicie o tratamento.

As três coletas de sangue (antes, durante e após o término do tratamento) que serão realizadas para esta pesquisa deverão retirar uma pequena quantidade de sangue (0,5 mililitros) na veia do braço. Este procedimento é semelhante ao que o(a) Sr(a). realiza nos laboratórios de rotina. Contudo, toda punção venosa tem um risco de pequeno desconforto e dor local e raramente podem ocorrer manchas vermelhas (ou hematomas) no local da punção. Contudo, estes riscos são minimizados quando a punção é realizada por técnico treinado e capacitado, como ocorre no nosso serviço.

QUAIS SÃO OS POSSÍVEIS BENEFÍCIOS OBTIDOS COM A PARTICIPAÇÃO DO SR(A) NO ESTUDO?

Embora não exista nenhum benefício direto para o(a) Sr(a). com a sua participação, os dados coletados de cada paciente e examinados em conjunto ajudarão a conhecer e compreender melhor a interação do vírus causador da hepatite C com o sangue e o tratamento de pacientes com hepatite C e poderão beneficiar outras pessoas que serão tratadas no futuro. Mas é muito importante o(a) Sr(a). saber que o seu tratamento não será modificado em nenhuma hipótese com a sua participação. Portanto, as suas chances de resposta ao tratamento não serão aumentadas nem diminuídas com a sua participação.

E QUANTO À CONFIDENCIALIDADE?

Para os propósitos da sua participação neste estudo e para a proteção da sua identidade, o seu médico irá atribuir para o(a) Sr(a). um código único, tal como uma série de números e/ou letras. O médico do estudo registrará os dados do estudo coletados em um formulário que usa o código que lhe foi atribuído e não o seu nome. Isto tem a intenção de proteger os seus dados do estudo, tornando-os anônimos para a maioria dos propósitos do estudo.

Os dados que são registrados com o código atribuído ao invés de seu nome, são chamados “**dados codificados**”. Os dados codificados serão inseridos na base de dados do estudo, no computador. O seu médico do estudo manterá uma lista confidencial ligando o seu nome ao seu código e apenas pessoas autorizadas terão acesso a esta lista. Os seus dados codificados podem ser compartilhados e utilizados apenas pela equipe do projeto de pesquisa e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais(COEP/UFMG). Os seus dados codificados serão utilizados neste estudo e também podem ser:

- Utilizados para outras pesquisas atuais ou futuras envolvendo o tratamento e controle da hepatite C, condições de saúde relacionadas, ou para outra pesquisa relevante de saúde;
- Utilizados em publicações sobre este estudo, mas eles permanecerão codificados. A sua identidade não será revelada em qualquer compilação, relatório de estudo ou publicação a qualquer momento.

O(a) Sr(a). terá o direito de inspecionar os dados que estão sendo compilados, solicitar a correção de dados incorretos, e também se opor ao processamento dos seus dados pessoais, a qualquer momento.

E QUANTO AOS CUSTOS?

O(a) Sr(a). não receberá qualquer compensação pela sua participação no estudo, e este também não lhe acarretará custos.

O(a) Sr(a). não receberá qualquer tratamento grátis para a hepatite C pela sua participação neste estudo.

CONTATO PARA OUTRAS INFORMAÇÕES

O(a) Sr(a). receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado. Se tiver dúvidas sobre qualquer aspecto deste estudo, pode solicitar outras informações, a qualquer momento durante o estudo à **Dra. Rosângela Teixeira no telefone (fax) (031) 3409 9748. Se o(a) Sr(a). ou seu representante tiver qualquer dúvida sobre os seus direitos como paciente, relacionadas a este estudo que não forem solucionados pela coordenadora do estudo, poderá também contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG que é o órgão que regulamenta a realização de pesquisas na UFMG, no endereço Av. Pres. Antônio Carlos, 6627- Unidade administrativa II – 2º andar – sala 2005. CEP: 31270-901 – BH-MG telefax (031) 3409-4592 - email: coep@prpq.ufmg.br**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Li o termo de consentimento livre e esclarecido para este estudo “Fisiopatologia da Infecção pelo Vírus da Hepatite”.
2. Recebi explicações sobre a finalidade, duração e possível benefício do estudo e sobre o que é esperado que eu faça. Minhas perguntas foram respondidas de maneira satisfatória.
3. Concordo livremente em participar deste estudo.
4. Entendo que a minha participação no estudo é voluntária e que sou livre para me retirar a qualquer momento, sem dar qualquer razão, sem que minha assistência médica ou os meus direitos legais sejam afetados.
5. Monitores e coordenadores de pesquisa, Comitê de Ética em Pesquisa ou autoridades regulatórias podem querer examinar os meus prontuários médicos para verificar as informações coletadas.
6. Ao assinar este documento, dou permissão para coleta de amostras de sangue e análise dos meus dados no prontuário médico do Hospital das Clínicas da UFMG.
7. Dou o meu consentimento para o uso, armazenamento e retenção dos meus dados pessoais para as finalidades do estudo descrito neste documento.

Nome do paciente
Data

Assinatura

Nome do representante (se aplicável)
Data

Assinatura

Médico ou pessoa que conduziu a discussão sobre o consentimento livre e esclarecido

Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, finalidade e duração do estudo ao sujeito supracitado.

Nome do médico

Assinatura

Data (deve ser a mesma data)

Testemunha imparcial

As informações deste documento e quaisquer outras informações por escrito foram claramente explicadas e aparentemente compreendidas, e o consentimento foi concedido livremente pelo paciente.

Nome da testemunha*

Assinatura*

Data

*Testemunha imparcial: Se o paciente não souber ler, será necessária a assinatura de uma testemunha imparcial. Uma testemunha imparcial é uma pessoa independente do estudo que não pode estar sob a influência de pessoas ligadas à pesquisa clínica, e que se encontra presente durante o processo de consentimento e lê o TCLE e qualquer outra informação por escrito dada ao paciente.

ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fisiopatologia da Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C: análise do impacto da interação do vírus HCV com componentes do sangue periférico e de biomarcadores imunológicos da resposta terapêutica

Pesquisador: Rosângela Teixeira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15732513.0.1001.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 300.383

Data da Relatoria: 13/06/2013

Apresentação do Projeto:

O vírus da hepatite C (HCV) é um vírus hepatotrópico, não-citopático, que possui alta capacidade de mutação, resultando em numerosas seqüências e quasiespécies, o que contribui para a evasão da resposta imune do hospedeiro e cronicidade da infecção. Peculiaridades do agente infeccioso (genótipo e carga viral), do hospedeiro (idade à infecção, sexo e resposta imune), assim como a concomitância de outros fatores de agressão hepática (alcoolismo e as coinfeções com o vírus da hepatite B ou da imunodeficiência humana), parecem interferir no curso da doença. Contudo, as interações entre o HCV e o sistema imune do hospedeiro são determinantes para a história natural da infecção. Há evidências contundentes de que uma resposta imune vigorosa é necessária para o clareamento viral espontâneo. Sabe-se que o vírus C não tem ação citopática direta sobre os hepatócitos e a resposta imune ao vírus parece ser a verdadeira responsável pelas lesões hepáticas e, ao mesmo tempo, pode influenciar nas chances de resposta terapêutica ao tratamento.

Entretanto, investigações são necessárias para conclusões definitivas sobre biomarcadores em hepatite C crônica. Estudos anteriores desenvolvidos pelo mesmo grupo de pesquisa demonstraram que pacientes com hepatite C crônica apresentam um conjunto de biomarcadores

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 300.383

fenotípicos em leucócitos do sangue periférico que permitem discriminá-los de indivíduos saudáveis. A investigação de parâmetros fenotípicos-funcionais em sangue periférico de pacientes durante o tratamento da hepatite C contribuiria para a compreensão da fisiopatologia da infecção viral e identificação de biomarcadores de resposta virológica. Diante desse contexto, o presente projeto é prospectivo e tem como propósito investigar a natureza e o significado biológico da interação do vírus HCV com componentes do sangue, determinando o impacto dessa interação nas características clínicas dos pacientes HCV positivos, antes, durante e após o tratamento. Para cumprir esses objetivos as seguintes metas específicas são propostas para a população a ser avaliada: a) quantificar a carga viral de HCV em soro, hemácias e plaquetas dos pacientes; b) caracterizar o perfil fenotípico-funcional de plaquetas HCV positivas ou negativas; c) avaliar o processo de hemofagocitose por monócitos circulantes dos pacientes; d) analisar a presença de agregados plaquetários associados a monócitos circulantes dos pacientes; e) caracterizar o perfil de micropartículas eritrocíticas, plaquetárias e leucocitárias circulantes no plasma dos pacientes; e f) determinar o perfil proteômico de plaquetas e o perfil sérico de citocinas e quimiocinas em pacientes portadores de HCV. Amostras de sangue periférico de 200 pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica (anti-HCV positivo, HCV positivo) serão avaliadas por diferentes métodos como imunofenotipagem por citometria de fluxo, análises de ácidos nucleicos e proteínas, hemofagocitose e dosagem de fatores solúveis. Serão indicadores de desempenho: a) carga viral de HCV dos pacientes determinada em soro, eritrócitos e plaquetas; b) perfil fenotípico-funcional de plaquetas caracterizado; processo de hemofagocitose por monócitos circulantes avaliado; c) presença de agregados plaquetários associados a monócitos circulantes analisada; d) perfil de micropartículas eritrocítica, plaquetária e leucocitária caracterizadas no plasma dos pacientes; d) perfil proteômico de plaquetas e perfil sérico de citocinas e quimiocinas determinados. Serão incluídos duzentos pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica, através de sorologia anti-HCV positiva (ELISA de terceira geração) e pesquisa de RNA do HCV positiva de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, infectados por HCV genótipo 1 ou 3. No cálculo amostral foi determinado um erro relativo de 5% com 95% de nível de confiança. Este número de pacientes foi considerado para que, na população positiva composta predominantemente de indivíduos do sexo masculino, seja possível incluir um número de mulheres suficiente para a relação dos parâmetros a serem avaliados segundo sexo. Serão excluídos pacientes com hepatite C crônica coinfetados por outros vírus, tais como o HIV e o vírus da hepatite B crônica, bem como os pacientes com outras formas de doença hepática crônica (alcoólica, metabólicas, autoimunes), cirrose hepática

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 300.383

descompensada, insuficiência renal crônica, pacientes em uso de drogas imunossupressoras e etilistas. O estudo trará grande contribuição para a melhor compreensão dos fenômenos imunes associados à resposta ao tratamento da hepatite C, até o momento, não esclarecidos na literatura. Portanto, os estudos de biomarcadores moleculares séricos e de interação do vírus com componentes do sangue serão de grande importância para verificar a influência de mecanismos imunes associados à resposta virológica sustentada no tratamento da hepatite C com interferon-peguilado e ribavirina. O apoio disponível virá das instituições envolvidas com o projeto (FIOCRUZ-Minas, UFMG e CBER/FDA), que garantirão toda a infraestrutura física e computacional, a participação dos pesquisadores, profissionais de apoio técnico, estudantes envolvidos com o projeto proposto, e financeiro. O orçamento financeiro é da ordem de R\$ 299.400,00 e será subsidiado pela (FIOCRUZ-Minas, UFMG e CBER/FDA).

Será empregada a análise descritiva. A média e o desvio padrão serão empregados como medidas de tendência central e de dispersão, respectivamente, quando a variável apresentar distribuição normal. Já nos casos de distribuição assimétrica, serão utilizados a mediana (tendência central) e os quartis 1 e 3 (dispersão). Para as comparações entre os grupos serão utilizados os testes t de Student ou análise de variância (para a comparação de médias), e o teste de Kruskal-Wallis (para a comparação de medianas) para as variáveis intervalares. Para a comparação de variáveis nominais entre grupos, empregar-se-á o teste do qui-quadrado, com correção para o tamanho da amostra quando pertinente. Em algumas situações, o modelo logístico de análise multivariada será utilizado. Trata-se de um estudo multicêntrico no Brasil e que contará com uma pesquisadora visitante especial (Dra. Maria Rios), chefe da Seção de Arbovírus do Laboratory of Emerging Pathogens (LEP), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), US, Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos da

América, que desenvolve uma linha de pesquisa que investiga esses aspectos do estudo de mecanismos de interação de vírus com membrana de eritrócitos, leucócitos e plaquetas em sangue circulante durante infecções virais causadas por Arbovírus, dentre eles, o vírus da hepatite C. Acredita-se na possibilidade de parcerias entre as instituições contribuindo para maior troca de conhecimentos e de transferência de tecnologias e procedimentos técnicos entre os grupos, o que ampliará o intercâmbio internacional entre as equipes e favorecerá futuramente a captação de recursos em parcerias internacionais.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 300.383

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário**

Investigar a natureza e o significado biológico da interação do vírus HCV com componentes do sangue, determinando o impacto dessa interação nas características clínicas dos pacientes HCV positivos, antes, durante e após o tratamento da hepatite C crônica com o esquema de interferon peguila do associado à ribavirina e aos inibidores de protease.

Objetivos Secundários:

a) quantificar a carga viral de HCV em soro, hemácias e plaquetas dos pacientes; b) caracterizar o perfil fenotípico-funcional de plaquetas HCV positivas ou negativas; c) avaliar o processo de hemofagocitose por monócitos circulantes dos pacientes; d) analisar a presença de agregados plaquetários associados a monócitos circulantes dos pacientes; e) caracterizar o perfil de micropartículas eritrocíticas, plaquetárias e leucocitárias circulantes no plasma dos pacientes; e f) determinar o perfil proteômico de plaquetas e o perfil sérico de citocinas e quimiocinas em pacientes portadores de HCV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Este estudo não requer o uso de qualquer medicamento fora do tratamento proposto pelo médico(a) que assiste o paciente na rotina e não modificará o tratamento proposto que seguirá o protocolo do serviço. Portanto, o estudo não trará riscos adicionais àqueles que são do próprio tratamento da hepatite C. As coletas de sangue (0,5 mililitros) na veia do braço poderão ter risco de pequeno desconforto, dor local e raramente hematomas no local da punção. Estes riscos serão minimizados porque a punção será realizada por técnico treinado e capacitado.

Benefícios:

O estudo trará melhor compreensão da fisiologia da infecção viral e identificará biomarcadores de resposta virológica. Os fenômenos imunes associados à resposta ao tratamento da hepatite C poderão ser compreendidos. Embora não exista nenhum benefício direto para o paciente, os dados coletados ajudarão a conhecer e compreender melhor a interação do vírus causador da hepatite C com o sangue e o tratamento desses pacientes, beneficiando outros indivíduos que serão tratados

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 300.383

no futuro.

O trabalho é exequível, está bem fundamentado e tem relevância científica e clínica. Os métodos estão bem descritos, assim como os critérios de inclusão, de exclusão e o tratamento estatístico que será utilizado. Não há desvio ético.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O trabalho é exequível, está bem fundamentado e tem relevância científica e clínica. Os métodos estão bem descritos, assim como os critérios de inclusão, de exclusão e o tratamento estatístico que será utilizado. Não há desvio ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

Folha de Rosto

Parecer consubstanciado da Câmara Departamental - Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina - UFMG

Comunicação a DEPE

Anuência da Unidade Funcional Jeny Faria - HC - UFMG

Anuência do Instituto Alpha de Gastroenterologia - Hospital das Clínicas/UFMG

Anuência do Centro de Pesquisas René Rachou (Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ - MG) TCLE adequado e completo

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos, SMJ, pela aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 300.383

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 11 de Junho de 2013

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br