

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

FERNANDA RIMOLLI DE CASTRO ARAUJO

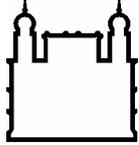
Avaliação da Susceptibilidade de *Cavia porcellus* ao Vírus da Hepatite A

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2007

Trabalho realizado no Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, de Manguinhos – Bio-Manguinhos e no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto e do Prof. Dr. Renato Sergio Marchevsky



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Fernanda Rimolli de Castro Araujo

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *CAVIA PORCELLUS*
AO VÍRUS DA HEPATITE A

ORIENTADORES: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto
Prof. Dr. Renato Sergio Marchevsky

Aprovada em: 27/ 04/ 2007

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar - Presidente
Prof^a. Dra. Elena Cristina Caride Siqueira Campos
Prof^a. Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia

Rio de Janeiro

A meus pais, que constituem exemplo de caráter, dedicação e determinação vivenciadas por mim ao longo de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Marcelo Alves Pinto, que acreditou que eu seria capaz de realizar este estudo e esteve sempre presente nos procedimentos experimentais.

Ao meu orientador Dr. Renato S. Marchevsky, por sua dedicação à pesquisa, por sua estruturação acadêmica e pelo enriquecimento do conteúdo desta Dissertação.

Ao veterinário Sebastião Enes, do Departamento de Produção Animal do Centro de Criação de Animais de Laboratório, pelo fornecimento dos animais.

A Dra. Eliane dos Reis, do Departamento de Bacteriologia do IOC, pela pesquisa de *Salmonella* nas cobaias utilizadas no experimento.

Ao técnico Edmilson Conceição Medeiros, por ser meu “braço direito” nas técnicas experimentais realizadas com os animais.

Aos técnicos Gabriele Souza, Viviane Ferreira, Creuza Ricardo, Daiani Paiva e Leandro Vilela, do Laboratório de Experimentação Animal de Bio-Manguinhos, pela colaboração no manejo dos animais.

A Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima, e a colega Liliane Monteiro Morais, do Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos, pela colaboração indispensável nas técnicas de biologia molecular.

Às colegas Luciane Almeida Amado, Débora Regina Lopes dos Santos, Juliana Freitas Lopes e Dra. Vanessa Salette de Paula do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico do Departamento de Virologia do IOC, pela cooperação nos trabalhos desenvolvidos com técnicas de biologia molecular.

Ao técnico José Mariano da Silva pelo processamento do material histológico.

Aos colegas Alexandre Saísse e Cleber Hooper, do Departamento de Controle de Qualidade do Centro de Criação de Animais de Laboratório, pela colaboração no estudo bioquímico das enzimas hepáticas.

A colega Taynãna César Simões, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Colega Alfredo Jabor, do Laboratório de Tecnologia Viroológica, e Maria Luiza Azevedo, do Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos pela colaboração na revisão dos testes moleculares.

Ao Chefe do Laboratório de Experimentação Animal, Joel Majerowicz, pelas condições propiciadas à realização desta Dissertação.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, pela oportunidade de realizar e concluir a pós-graduação.

Ao Dr. Akira Homma, diretor de Bio-Manguinhos, e Jussara Pereira do Nascimento mentores do Curso de Pós-Graduação de Bio-Manguinhos.

Ao amigo Rodrigo Muller, colaborador generoso e substituto nos incontáveis momentos que não pude estar presente no laboratório.

Ao meu marido Humberto, que sempre me apoiou, com tanta compreensão, do início ao fim desta Dissertação.

A meus pais, Elena e Eduardo, sempre tão queridos e tão presentes nos conselhos e no amor.

Aos meus irmãos, Mariano, Carolina e Diego, pelo carinho e apoio que nunca me faltaram.

As minhas amigas, Fabienne, Isabel e Célia, pelas conversas, conselhos e apoio.

Aos colegas do MPTI 2005, pela amizade, união e bom-humor, mesmo nos momentos mais difíceis.

Enfim, a todos quanto – direta ou indiretamente – colaboraram na consecução de todas as tarefas.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - Histórico da hepatite A	1
1.2 - O vírus da hepatite A	2
1.3 - Formas de transmissão	5
1.4 - Manifestações clínicas	6
1.5 - Imunopatologia da hepatite pelo HAV	7
1.6 - Diagnóstico laboratorial	8
1.7 - Epidemiologia	10
1.8 - Prevenção e controle	12
1.9 - Modelos animais da hepatite A	13
1.9.1 - Macacos superiores	14
1.9.2 - Macacos do Novo Mundo	15
1.9.3 - Macacos do Velho Mundo	16
1.9.4 - Roedores	17
1.10 - Relevância do estudo	21
2. OBJETIVOS	22
2.1 - Objetivo geral	22
2.2 - Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 - Apresentação	23
3.2 - Inóculos	23
3.2.1 - Vírus de hepatite A cepa HAF-203, selvagem (wt)	23
3.2.2 - Vírus de hepatite A cepa HAF-203 (adaptada em células FRhK-4)	23

3.3 -	Experimentos com animais	24
3.3.1 -	Cobaias (<i>Cavia porcellus</i>)	24
3.3.2 -	Delineamento experimental	25
3.3.3 -	Protocolo anestésico	26
3.3.4 -	Inoculação	26
3.3.5 -	Observação clínica	27
3.3.6 -	Coleta de fezes	27
3.3.7 -	Coletas de sangue	29
3.3.8 -	Eutanásia	29
3.3.9 -	Obtenção de amostras de órgãos	30
3.3.10 -	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp nos animais	30
3.4 -	Diagnóstico Laboratorial	31
3.4.1 -	Testes de ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA) para o diagnóstico de anticorpos totais anti-HAV	31
3.4.2 -	Análise dos níveis séricos de enzimas hepáticas pré e pós-inoculação ...	32
3.4.3 -	Pesquisa do RNA HAV nas amostras de fígado pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)	33
3.4.3.1 -	Preparação das amostras	33
3.4.3.2 -	Extração de RNA	34
3.4.3.3 -	Síntese de DNA complementar (cDNA)	34
3.4.3.4 -	PCR quantitativo em tempo real	35
3.4.4 -	Análise histológica	37
3.4.5 -	Pesquisa do RNA HAV nas amostras de fezes pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)	37
3.4.5.1 -	Pré-tratamento das amostras de fezes	37
3.4.5.2 -	Extração de RNA	38
3.4.5.3 -	Síntese do DNA complementar (cDNA)	39
3.4.5.4 -	PCR quantitativo em tempo real	40
3.5 -	Métodos estatísticos	40
4.	RESULTADOS	42
4.1 -	Observações clínicas	42
4.2 -	Peso corporal dos animais	42
4.3 -	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos totais anti-HAV	44

4.4 -	Níveis séricos das enzimas hepáticas	45
4.5 -	PCR quantitativo em tempo real das amostras de tecido hepático e fezes	46
4.6 -	Análise histológica	48
5.	DISCUSSÃO	49
5.1 -	Os modelos animais	49
5.2 -	Avaliação clínica	50
5.3 -	Avaliação dos níveis séricos das enzimas hepáticas	50
5.4 -	Análise histológica	51
5.5 -	Análise de RNA HAV pelo método de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real).....	51
5.5.1 -	Nas fezes	51
5.5.2 -	No fígado	52
5.6 -	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos totais anti-HAV	53
6.	CONCLUSÕES	56
7.	ANEXO	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
3' NC	Segmento não-traduzido 3'
3C ^{pro}	Protease viral 3C
3D ^{pol}	RNA polimerase 3D
5' NC	Segmento não-traduzido 5'
AANE	Aminoácidos não-essenciais
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
cDNA	DNA complementar
Cecal	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNx	Médias das absorbâncias dos controles negativos
CPx	Médias das absorbâncias dos controles positivos
CRIES	Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais
Cut-off	Valor de corte
d.p.i.	Dias pós-inoculação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	Absorbância da amostra
dsRNA	Dupla fita de RNA
dUTP	2'-Deoxiuridina 5'-Trifosfato
ELISA	Ensaio imunoenzimático (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
EP	Espaço porta
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FRhK-4	Célula de rim de feto de macaco rhesus
g	grama
GGT	Gama glutamiltransferase
GPE	células embrionária de <i>Cavia porcellus</i>
H.E.	Hematoxilina e eosina
HAV	Vírus da hepatite A
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IME	Imunomicroscopia eletrônica
IOC	Instituto Oswaldo Cruz

IP	Intraperitoneal
IRES	Sítio de entrada interna do ribossomo
kg	Quilo
L	Litro
Labent	Laboratório de Enterobactérias
Laean	Laboratório de Experimentação Animal
Laneu	Laboratório de Neurovirulência
LDT	Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico
log	Logarítimo
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRC-5	Fibroblasto de pulmão fetal humano
N	Normal
NBA-2	Nível de biossegurança animal 2
nm	Nanômetros
°C	Graus centígrados
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Região de fase aberta de leitura
p	Probabilidade de significância
p.i.	Pós-inoculação
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução salina tamponada (“Phosphate buffer saline”)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
R ²	Coefficiente múltiplo de determinação
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
RT-PCR qualitativo	Reação em cadeia da polimerase qualitativa com transcrição reversa
s	Segundo
slope	Coefficiente angular
TCID ₅₀	Dose infectante de 50% da cultura de tecido (“50% Tissue culture infective dose”)
TMB	Tetrametilbenzidina
UI	Unidade internacional
UNG	Uracil N-glicosilase
VC	Veia central
wt	Selvagem (wild-type)
x g	Força centrífuga

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Caracterização dos 3 Grupos de cobaias, números dos animais, respectivos inóculos e cópias de RNA HAV por dose	25
Tabela 3.2	Identificação numérica (1 a 336) das amostras de fezes diariamente colhidas das 12 cobaias durante os 56 dias do experimento	27
Tabela 3.3	Distribuição dos animais de cada Grupo, conforme a data da eutanásia, que ocorreu nos dias 14, 28, 42 e 56 do experimento	29
Tabela 3.4	Iniciadores específicos para a região 5' NC do HAV e sonda marcada na extremidade 5', utilizados no PCR em tempo real	36
Tabela 3.5	Seleção das amostras de fezes das cobaias analisadas para a presença de RNA HAV pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)	38
Tabela 4.1	Resultados do teste de ELISA para detecção de anticorpos totais anti-HAV em amostras de soro de cobaias colhidas antes da inoculação	44
Tabela 4.2	Resultados do teste de ELISA para detecção de anticorpos totais anti-HAV em amostras de soro de cobaias colhidas após a inoculação	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1a	Micrografia eletrônica de transmissão visualizando partículas com características morfológicas do HAV	2
Figura 1.1b	Esquema do vírus da hepatite A	2
Figura 1.2	Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína viral	3
Figura 1.3	Ciclo de replicação do HAV	4
Figura 1.4	Mapa da distribuição mundial da infecção pelo HAV	10
Figura 3.1	<i>Cavia porcellus</i> (cobaia) linhagem Fiocruz	24
Figura 3.2	Estantes ventiladas para cobaias (Alesco Indústria e Comércio Ltda, Brasil)	25
Figura 3.3	<i>Cavia porcellus</i> . Contenção mecânica e inoculação intraperitoneal	26
Figura 4.1	Distribuição dos pesos das cobaias dos 3 Grupos do dia <u>-2</u> ao <u>56</u> do experimento	42
Figura 4.2	Gráfico boxplot de pesos das cobaias por Grupo experimental durante período de infecção pelo HAV do dia 0 ao dia 56 p.i.	43
Figura 4.3	Gráfico boxplot de pesos das cobaias considerando o Grupo experimental e os intervalos de dias (14, 28, 42 e 56) durante período de infecção pelo HAV	44
Figura 4.4	Distribuição dos valores séricos de enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) das cobaias dos Grupos <u>1</u> , <u>2</u> e <u>3</u>	45
Figura 4.5	Linearidade das curvas padrões das diluições seriadas do HAV	46
Figura 4.6	Variação da Fluorescência normalizada (Delta Rn) versus número do ciclo para as três corridas de PCR (A, B e C)	47
Figura 4.7	Cobaia nº 4 (56 d.p.i.). Fotomicrografia do fígado	48

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite A (HAV) em geral é transmitida pelo contato fecal-oral. Precárias condições sanitárias e de higiene favorecem a transmissão do HAV. Dados disponíveis sobre o saneamento básico mostram a precariedade em muitas regiões do Brasil onde se concentram a maioria dos casos de infecções pelo HAV. O desenvolvimento de uma vacina efetiva e segura contra o HAV é uma das prioridades do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Para o desenvolvimento de vacinas contra a hepatite A um dos principais obstáculos é um modelo animal para o seu controle. Algumas espécies de primatas não-humanos são utilizadas como modelos para infecção pelo HAV, por serem semelhantes aos humanos no curso da infecção. Geralmente apresentam, após a infecção experimental pelo HAV, viremia, eliminação de vírus nas fezes, aumento dos níveis séricos de enzimas hepáticas, soroconversão, alterações histológicas e detecção de antígenos de HAV no fígado. É indiscutível também a importância dos primatas não-humanos nas pesquisas sobre patogênese. Entre as opções para substituí-los, em virtude do alto valor econômico e moral (pelo alto nível de consciência), foi pesquisada a viabilidade do uso de cobaias (*Cavia porcellus*) na infecção experimental pelo HAV. Neste estudo foram inoculadas intraperitonealmente três cobaias com a cepa brasileira HAF-203 do HAV, isolada de paciente infectado (Grupo 1), e três cobaias com esta cepa adaptada ao cultivo de células FRhK-4 (Grupo 2). Outras três cobaias, controles negativos, foram inoculadas com meio 199 (Grupo 3). Observadas diariamente, não apresentaram manifestações clínicas sugestivas de hepatite A. Quanto ao peso, em diferentes intervalos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos. Nos dias 14, 28, 42 e 56 p.i., uma cobaia de cada grupo foi submetida à eutanásia sendo colhido o sangue por punção cardíaca. Na necropsia eram obtidas amostras de fígado, rim, intestino delgado e grosso e vesícula biliar. O fígado e demais órgãos não exibiram alterações histológicas. Também não foi detectado genoma viral (RNA HAV) nas amostras de fezes de dias intercalados (dia 7 ao 56 do experimento) e nas amostras de fígado, analisadas pela técnica de PCR quantitativo em tempo real. Os níveis séricos das enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT) das amostras de sangue pós-inoculação foram comparadas com os níveis das amostras coletadas dois dias antes da inoculação e, também, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos intervalos de dias e entre os Grupos. A única evidência de antigenicidade do vírus foi encontrada no teste de ELISA, quando se detectaram anticorpos totais anti-HAV aos 28 e 56 dias, em duas cobaias do Grupo 1. A interpretação dos resultados não permite indicar as cobaias da linhagem “Fiocruz” como modelo experimental da infectividade do HAV cepa HAF-203. Entre as opções para substituir os primatas não-humanos no desenvolvimento de vacinas contra o HAV, não consideramos a *Cavia porcellus* um modelo adequado.

ABSTRACT

Infection by Hepatitis A virus (HAV) is generally transmitted through faecal-oral contact. Poor hygienic habits and inadequate sanitary conditions favor HAV transmission. Deficiencies in basic public sanitation among the different regions of Brazil have been associated with rates of HAV infections. The development of a safe and effective vaccine against HAV is priority for health policy in the Brazil National Immunization Program (PNI). The development of vaccines against Hepatitis A has been hampered by the lack of a suitable animal model for the control of this vaccine. Some species of Non-human primates are used as models for HAV infection which more closely mimics many of the aspects of the human disease. Various parameters of infection were assessed in this model: they usually present viremia, faecal elimination of the virus, serum level increase of hepatic enzymes, seroconversion, alterations in liver histology and detection of RNA HAV antigen in the liver. Non-human primates continue to play an important role on the research of pathogeny. Due to high economical and moral concerns (due to the elevated level of conscience), the feasibility of guinea pigs (*Cavia porcellus*) in the experimental infection by HAV is considered among the replacement options. In this present study three guinea pigs were infected by the intraperitoneal route with the Brazilian HAV strain HAF-203 isolated from infected patient (Group 1) and three by cell culture adapted (FRhK-4) Brazilian HAV strain HAF-203 (Group 2). Three guinea pigs (negative-controls) were inoculated intraperitoneally with medium 199 (Group 3). All animals were observed daily, but they did not show any suggestive clinical symptoms of Hepatitis A infection. Of weights taken on different occasions animals did not show statistically significant differences at different intervals among the groups. One animal of each Group were submitted to euthanasia on 14th, 28th, 42nd and 56th days post inoculation by heart exsanguination. During necropsy, samples of liver, kidneys, small and large intestines, and gall bladder were taken. By light microscopy, no alterations could be found. There was no detection of viral genome (RNA HAV) in the faeces samples taken at different intervals (from day 7 to 56 of the experiment) and in the liver samples, both analyzed through quantitative RT-PCR technique. The serum level of hepatic enzymes (ALT, AST and GGT) from the blood samples after inoculation were compared to the levels of samples collected two days before inoculation and, also, did not show statistically significant differences in relation to the intervals of days and between the groups. The only evidence of a specific antigen was determined by ELISA method when total anti-HAV antibodies were detected on the 28th and 56th days in two guinea pigs from Group 1. Analysis of the results of this study do not allow the indication of guinea pigs strain “Fiocruz” as experimental models for hepatitis A virus strain (HAF-203) infection. Interpretation of the results among the options for the replacement of non-human primates in the development of vaccines against HAV, the *Cavia porcellus* are certainly not considered as a suitable model.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Histórico da hepatite A

Embora haja evidências da icterícia catarral nas antigas civilizações da Grécia e Roma, foi somente em 1912 que Cockayne caracterizou a icterícia catarral epidêmica, então denominando-a hepatite infecciosa. O autor destacou que o agente causador da hepatite atinge o fígado pelo sangue, considerando os aerossóis como principal fonte de transmissão. Blumer (1923) descreveu, em detalhes, surtos ocorridos nos Estados Unidos, entre 1812 e 1922, caracterizando-os como icterícia epidêmica, onde os indivíduos mais acometidos eram crianças e adultos jovens que apresentavam manifestações clínicas uma semana após a exposição a um paciente icterico.

Os casos de icterícia que ocorreram durante a 2ª Guerra Mundial estavam associados ao enorme número de transfusões sanguíneas ocorrido no período. Parte destes quadros podia se dar devido às precárias condições de saneamento, que propiciaram a transmissão das hepatites de transmissão fecal-oral. Estudos epidemiológicos confirmaram a etiologia viral da doença e demonstraram a existência de uma hepatite com transmissão fecal-oral (icterícia infecciosa) e outra com transmissão pelo sangue (icterícia de soro homólogo) (Voegt, 1942; Havens, 1944; MacCallum & Bradley, 1944). Em 1947, foram introduzidos os termos hepatite A para a hepatite infecciosa e hepatite B, para a hepatite sérica (MacCallum, 1947).

Krugman e colaboradores (1967) realizaram um estudo em instituição para crianças com deficiência mental em Nova York e isolaram a cepa MS-1, causadora de hepatite infecciosa, que foi utilizada para infectar adultos voluntários (Boggs et al., 1970). Nas amostras de fezes e de soro destes indivíduos, foram identificados os vírus da hepatite A (HAV), por meio da técnica de imunomicroscopia eletrônica (Feinstone et al., 1973).

Em 1973, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou os termos Hepatite A e Hepatite B. Àquela altura, diversos testes para diagnóstico do HAV foram desenvolvidos: inicialmente o teste de fixação de complemento (Provost et al., 1975); e a seguir as técnicas de maior sensibilidade como o radioimunoensaio (Hollinger et al., 1975; Purcell et al., 1976; Bradley et al., 1979); e teste imunoenzimático (ELISA) (Mathiesen et al., 1978a).

Mas o grande avanço para a prevenção e controle da hepatite A ocorreu quando o vírus foi propagado em cultura de células de mamíferos (Provost & Hilleman, 1979), o que propiciou a pesquisa para o desenvolvimento de vacinas com vírus inativado (Sjogren et al., 1991) e com vírus atenuado (Midthun et al., 1991).

Atualmente, existem diversas vacinas contra hepatite A, comprovadamente eficazes, sendo a maioria vacinas inativadas, como a Havrix® (Glaxo SmithKline), Vaqta® (Merck Sharp & Dohme), Avaxim® (Sanofi Pasteur) e Epaxal® (Berna Biotech) (Ferreira & Silveira, 2006), mas também existe uma vacina atenuada desenvolvida e utilizada na China (Mao et al., 1989, 1997; Zhuang et al., 2005).

1.2 – O vírus da hepatite A

O vírus da hepatite A (HAV) pertence à família *Picornaviridae*, gênero dos Hepatovírus (Miller, 1997). É uma partícula viral icosaédrica, sem envelope, com 27 a 32 nm de diâmetro (Feinstone et al., 1973) (Figura 1.1a, b). O genoma é constituído por um RNA linear de fita simples com polaridade positiva com cerca de 7.500 nucleotídeos (Coulepis et al., 1981). O RNA viral é envolto por um capsídeo de simetria icosaédrica, composto de 60 cópias de cada uma das três maiores proteínas estruturais: VP1, VP2 e VP3 (Cohen et al., 1987; Martin & Lemon, 2006) (Figura 1.1b e Figura 1.2)

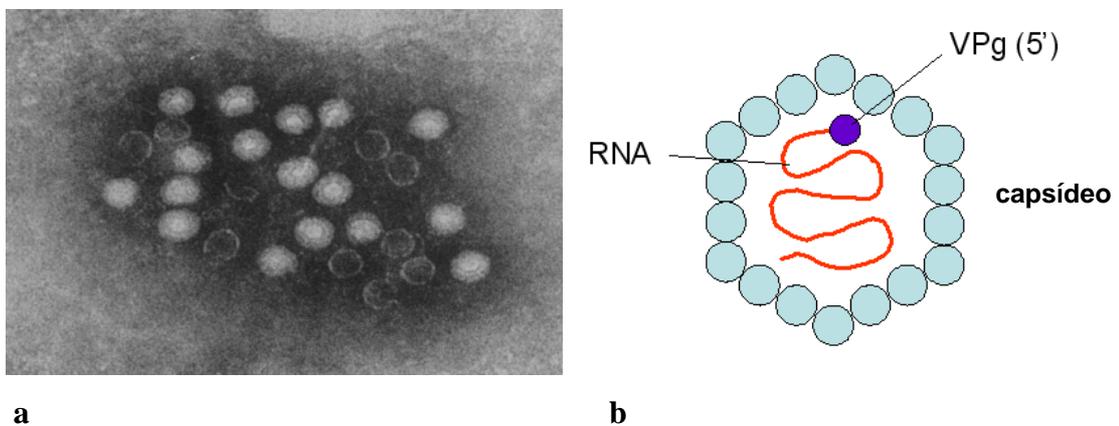


Figura 1.1– a) Micrografia eletrônica de transmissão visualizando partículas com características morfológicas do HAV (187.000x) (adaptado de Cook et al., 1976); b) Esquema do vírus da hepatite A (adaptado de Hunt, 2007)

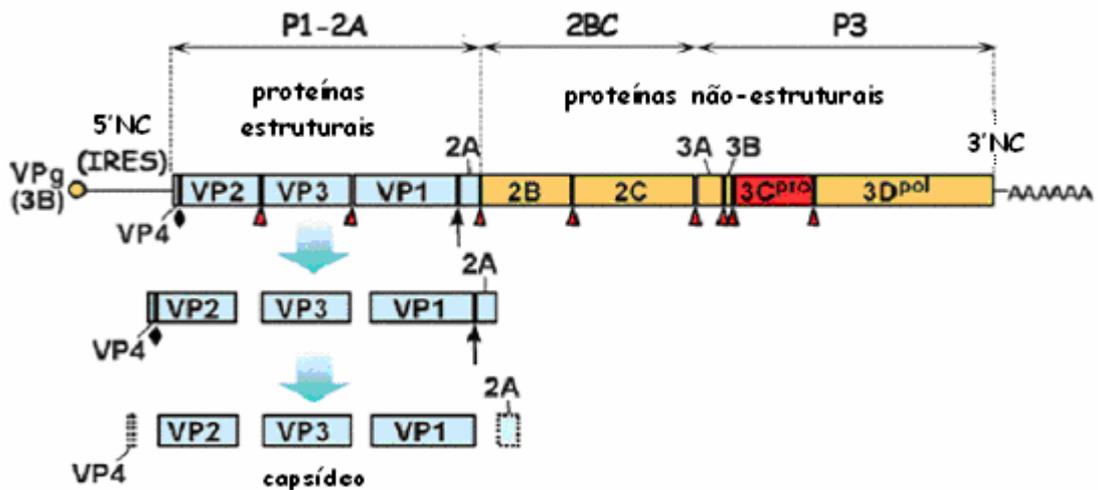


Figura 1.2 - Organização do genoma do HAV e processamento da poliproteína viral (adaptado e traduzido de Martin & Lemon, 2006).

A fita de polaridade positiva (RNA mensageiro) contém uma única região de leitura de fase aberta (ORF) que codifica uma poliproteína que é clivada por uma protease viral, 3C^{pro} (os locais de proteólise estão marcados com triângulos vermelhos), uma protease celular que ainda não foi identificada (as setas negras representam os locais de atividade) e uma atividade proteolítica desconhecida (os balões negros representam estes locais), liberando as proteínas estruturais e não-estruturais

O genoma viral possui apenas uma única fase aberta de leitura, codificando uma poliproteína na qual as maiores proteínas do capsídeo representam a extremidade amino-terminal. O restante da poliproteína corresponde a uma série de proteínas não-estruturais necessárias à replicação do vírus, como, por exemplo, a 3B, uma pequena proteína conhecida como VPg que se liga covalentemente à extremidade 5' do genoma, provavelmente como iniciador para a síntese do RNA; 3C^{pro}, uma cisteína protease responsável pela maioria das clivagens pós-traducionais da proteína; e a 3D^{pol} uma RNA-polimerase. Um sítio de entrada interna ao ribossomo (IRES), localizado no segmento não-traduzido 5' do genoma, guia a tradução cap-independente 5' da poliproteína (Martin & Lemon, 2006) (Figura 1.2).

O ciclo de replicação se caracteriza por ser lento e prolongado, com baixa produção viral e propenso a estabelecer infecções persistentes em cultura de células (Martin & Lemon, 2006). O HAV, para se replicar, entra no hepatócito pela interação com um receptor celular ainda incerto; ocorre a liberação do RNA genômico no citoplasma celular; o sítio de entrada ao ribossomo no segmento 5' não-traduzido medeia a tradução da poliproteína viral, que sofre processamento proteolítico; proteínas não-estruturais do segmento 2B-3D^{pol} da poliproteína se ligam à região 3' do genoma e é iniciada a síntese de uma cópia de fita negativa do genoma viral. Essa cópia é utilizada como fita molde para a síntese de diversas fitas positivas de RNA genômico. Algumas das fitas positivas produzidas servem para continuar a produção e outras são empacotadas para formar novas partículas virais que são secretadas pela membrana basolateral do hepatócito para os canalículos biliares e posteriormente drenadas no duodeno juntamente com a bile (Martin & Lemon, 2006) (Figura 1.3).

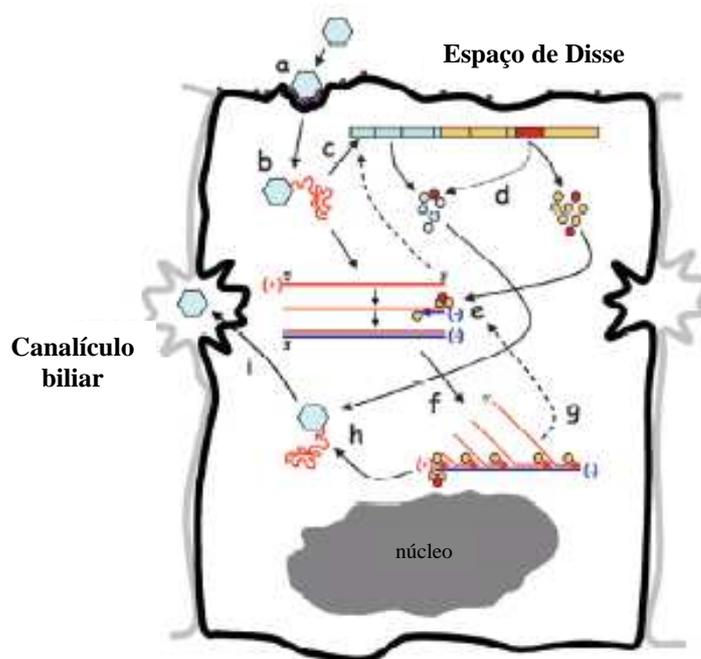


Figura 1.3 – Ciclo de replicação do HAV (adaptado de Martin & Lemon, 2006); a) adsorção e penetração; b) liberação do RNA genômico; c) sítio de entrada do ribossomo medeia a tradução da poliproteína; d) processamento proteolítico pela protease; e) tradução de fitas negativas intermediárias do genoma viral; f) tradução de fitas positivas do genoma viral a partir de fitas negativas; g) fitas positivas utilizadas para a tradução de novas fitas negativas; h) fitas positivas formando novas partículas virais

Diversas cepas de HAV foram estudadas, principalmente a HM-175 que foi isolada na Austrália (Daemer et al., 1981). Outras importantes cepas são MS-1 (Krugman et al., 1962); GMB (Frosner et al., 1979); CR-326 (Mascoli et al., 1973) e PA-33 (Lemon et al., 1982).

A cepa brasileira, denominada HAF-203, foi isolada em 1992 (Gaspar et al., 1992a), seqüenciada (Baptista, 1997) e avaliada sua infecciosidade em primatas não-humanos (Vital et al., 1995).

Pela análise da seqüência genômica da região VP1/2A, o HAV pode ser distinguido em diferentes genótipos (Robertson et al., 1992), mas possuem o mesmo sorotipo (Lemon et al., 1992). Assim, indivíduos infectados pelo HAV não são re-infectados por outra cepa do vírus. Desta mesma forma, uma vacina – produzida a partir de uma cepa – promove a produção de anticorpos que protegem o indivíduo de uma infecção por qualquer outra cepa do HAV (Innis et al., 1994).

Robertson e colaboradores (1992), compararam também, as seqüências de 168 nucleotídeos da região VP1/2A de 152 isolados do vírus da hepatite A distribuídos mundialmente. Consideraram que existem sete genótipos do HAV que possuem no mínimo 85% de homologia. A maior parte (>80%) das cepas humanas de HAV, inclusive a cepa

HAF-203, pertencem ao genótipo I, mas, também, podem ser encontradas nos genótipos II, III e VII. As cepas do HAV identificadas em primatas não-humanos pertencem aos genótipos III, IV, V e VI, respectivamente cepas PA21 (*Aotus trivirgatus*), Cy145 (*Macaca fascicularis*), AGM27 (*Chlorocebus aethiops*), e JM55 (*Macaca fascicularis*) (Robertson et al., 1992).

As cepas do HAV de primatas humanos e não-humanos têm relação antigênica, conferindo imunidade cruzada entre elas (Lemon & Binn, 1983a).

Finalmente, Costa-Mattioli e colaboradores (2002a e 2003) identificaram uma seqüência de 900 nucleotídeos na região VP1 de 81 cepas do HAV, onde foram observados apenas cinco grupos genéticos do HAV, propondo um novo método para classificação dos genótipos.

1.3 – Formas de transmissão

A forma mais comum de transmissão do HAV é fecal-oral (Krober et al., 1984), onde o indivíduo se contamina pela ingestão de água e alimentos contaminados (Chancellor et al., 2006; Villar et al., 2006a), ou via pessoa-a-pessoa (Morais et al., 2006). Por ser um vírus resistente às diferentes condições ambientais, permanece na população possibilitando a infecção de novos indivíduos (Parry & Mortimer, 1984; Scholz et al., 1989). A eliminação de partículas virais nas fezes de indivíduos infectados facilita a disseminação e surtos em ambientes confinados como creches e escolas devido aos casos assintomáticos e a precárias condições de higiene e saneamento básico (Morais et al., 2006).

A transmissão também pode ocorrer, muito raramente, pelo sangue ou por produtos derivados de sangue contaminado, desde que o indivíduo doador esteja no período de incubação, quando ainda não apresenta manifestações clínicas (Lemon, 1994a). Desta forma, surtos de hepatite A podem acontecer em indivíduos que recebem transfusão de sangue e derivados (Diwan et al., 2003), em hemofílicos, em razão da presença de HAV infeccioso em concentrados de fatores de coagulação, quando o HAV não é inativado com o tratamento do sangue unicamente por solventes e detergentes que inativam vírus com envelope (Lemon et al., 1994b; Chudy et al., 2002; Jee et al., 2006) e em usuários de drogas injetáveis ao compartilharem seringas e agulhas (Widell et al., 1983; Wells et al., 2006).

1.4 – Manifestações clínicas

A hepatite A é uma doença infecciosa de espectro clínico muito variado. Pode se apresentar como infecção assintomática, hepatite anictérica, hepatite icterícia e hepatite fulminante (Koff, 1992; Pereira & Gonçalves, 2003). Ressalte-se que manifestações clínicas atípicas como colestase, recidiva, doença auto-imune e manifestações extra-hepáticas também podem ocorrer (Schiff, 1992; Cioca, 2000).

Apesar do caráter autolimitante, a severidade da infecção é idade-dependente. A maioria das crianças infectadas (90% com menos de 6 anos de idade) apresenta a forma subclínica e assintomática enquanto que, em indivíduos adultos, predomina a forma de hepatite aguda com icterícia e outros sinais mais graves (Koff, 1992; Poovorawan et al., 2005).

A forma aguda da infecção caracteriza-se por um período de incubação, período prodrômico e a hepatite aguda propriamente dita, que pode progredir para a forma recorrente ou prolongada (van Hattum & Chen, 1999).

O período de incubação dura de 15 a 45 dias quando o HAV torna-se detectável nas fezes, bile, fluidos, sangue e fígado, representando o final do período de incubação, seguido pela detecção sérica de anticorpos IgM primeiramente e IgG específicos contra o vírus (van Hattum & Chen, 1999). A fase sintomática da doença coincide com a presença de anticorpos IgM anti-HAV (Ciocca, 2000)

O período prodrômico dura uma ou duas semanas e compreende manifestações clínicas não-específicas: anorexia, náusea, vômitos, cansaço, artralgia e mialgia, cefaléia e temperatura subfebril. A fase aguda apresenta elevação das enzimas hepáticas e possui sinais clínicos característicos de hepatite como dor abdominal, colúria e acolia fecal, precedendo a icterícia que dura por volta de duas semanas. A maioria dos adultos acometidos pela forma sintomática da doença se recupera com normalização dos níveis das enzimas hepáticas em dois meses (Koff, 1992; van Hattum & Chen, 1999).

Podem ocorrer infecções de forma prolongada com duração do quadro clínico por até 5 meses; recidivante com novos picos de enzimas hepáticas e retorno das manifestações clínicas por 3 a 5 meses (Cioca, 2000; Yesilkaya et al, 2003). Raramente se apresenta de forma fulminante, que – em geral – acomete indivíduos adultos, apresentando icterícia grave com deterioração da função hepática, podendo o paciente chegar ao óbito em 10 a 15 dias (Rezende et al., 2003).

1.5 – Imunopatologia da hepatite pelo HAV

Ainda existem dúvidas de como o vírus atinge o fígado e se existem sítios extra-hepáticos de replicação primária. Acredita-se que, após a ingestão, o HAV alcance o fígado, replique-se e, a seguir, seja excretado no intestino pela bile (Asher et al., 1995, Mathiesen et al., 1980; Pinto et al., 2002a).

Primatas não-humanos desenvolvem, pela inoculação experimental do HAV, lesões histológicas no fígado que incluem a) infiltração inflamatória portal, principalmente com linfócitos e macrófagos; b) aumento e ativação das células de Kupffer; e c) difuso dano hepatocelular. As lesões necroinflamatórias são freqüentemente observadas na zona 1 da estrutura acinar, mas também podem ocorrer nas zonas 2 e 3 (LeDuc et al., 1983; Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002a). As alterações histológicas verificadas nos animais experimentalmente inoculados são semelhantes, porém menos intensas que em humanos com hepatite A (LeDuc et al., 1983). Os mecanismos responsáveis pela injúria hepatocelular na hepatite A ainda não estão totalmente esclarecidos. Considera-se que o dano hepatocelular ocorra pela resposta imunomediada contra hepatócitos infectados e não pela direta ação citopática do vírus. Durante a fase aguda da doença observou-se a presença de células T citotóxicas CD8 + (Vallbracht et al., 1989; Fleischer et al., 1990) e CD4+ (Pinto et al., 2002b) que secretam interferon- γ , com capacidade de estimular células inflamatórias para os locais de replicação viral no fígado, aumentando desta maneira a injúria hepatocelular (Maier et al., 1988; Fleischer et al., 1990; Pinto et al., 2002b).

Outras citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α), liberadas nos locais de injúria hepática relacionada ao HAV, podem recrutar células inflamatórias que são potencialmente desencadeadoras de dano e regeneração hepatocelulares (Pinto et al., 2002b).

A detecção da enzima óxido nítrico sintetase, em macrófagos esplênicos e células de Kupffer, de primatas não-humanos com hepatite A, sugere a contribuição do óxido nítrico, produto desta enzima, para os mecanismos citotóxicos hepáticos e eliminação do vírus (Pinto et al., 2000).

As células NK (natural killer) do sistema imune inespecífico parecem ter também papel importante no dano hepatocelular antecedendo a ativação das células T citotóxicas (Baba et al., 1993).

A infecção pelo HAV não induz à síntese de interferon- α (IFN- α) e interferon- β (IFN- β) basicamente pelo fato de que a introdução desses interferons exógenos é capaz de eliminar infecções de HAV persistentes em fibroblastos humanos (Vallbracht et al., 1984, 1985).

Em cultura de células, o HAV inibe a transcrição do RNA mensageiro do interferon- β , induzido pela dupla fita de RNA (dsRNA) formada durante a replicação, e a apoptose induzida pelo acúmulo de RNA. Esta dupla capacidade preserva o local de replicação do vírus por um longo período, permitindo a propagação para as células vizinhas, facilitando ao vírus estabelecer a infecção (Brack et al., 2002).

Em células infectadas por vírus, o fator-3 regulador de interferon (IRF-3) é fosforilado e direcionado ao núcleo para induzir a síntese de IFN- β . No entanto, nos hepatócitos infectados pelo HAV, ocorre inibição da expressão do “retinoic acid-inducible gene-I” (RIG-I), induzida pela dsRNA e responsável pela sinalização da cascata de cinases para fosforilação do IRF-3 (Fensterl et al., 2005).

Anticorpos neutralizantes (IgM e IgG) surgem com a infecção hepática e não desempenham papel na eliminação do vírus. Os anticorpos da classe IgG, entretanto, previnem a reinfecção pelo HAV (Lemon & Binn, 1983b).

1.6 – Diagnóstico laboratorial

A infecção pelo vírus da hepatite A pode ser evidenciada pelo aumento dos níveis séricos de bilirrubina e enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), e gama glutamiltransferase (GGT) que podem preceder as manifestações clínicas (Bell & Feinstone, 2004) e diminuição do tempo de protrombina (Hussain et al., 2006). A principal alteração bioquímica sérica, durante a infecção sintomática pelo vírus, é a elevação de ALT maior que da AST (Ciocca, 2000). A ALT se localiza exclusivamente no citosol, enquanto AST é encontrado na mitocôndria (80%) e no citosol (20%). Sabe-se que as alterações histológicas no fígado nas hepatites virais agudas induzem lesão da membrana plasmática do hepatócito e liberação das enzimas do citosol (Hollinger & Emerson, 2001). As enzimas AST e ALT podem atingir taxas maiores que 1.000 UI/L (Hussain et al., 2006), no entanto, como tal situação pode ocorrer por outros agentes que causam hepatite, a detecção destas alterações não é utilizada como diagnóstico final.

Como a hepatite A não pode ser diferenciada de outras hepatites virais somente pelo diagnóstico clínico e análise bioquímica do soro, é necessário que indivíduos (acometidos pela doença) realizem testes sorológicos para detecção de anticorpos da classe IgM específicos para HAV e confirmação da hepatite aguda devido ao vírus em questão (ACIP,

2006). Estes anticorpos IgM surgem com as manifestações clínicas e duram três meses ou mais na circulação (Bradley et al., 1977; Eble et al., 1991; Ciocca, 2000).

Para diagnóstico de infecção passada pode ser feita a detecção de anti-HAV IgG, na ausência do anti-HAV IgM, pois estes anticorpos surgem ao mesmo tempo que a IgM, mas de forma muito mais lenta, atingindo valores máximos aos 3-4 meses e persistindo por anos (van Hattum & Chen, 1999; Ciocca, 2000). Ambos os testes utilizam o ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Os testes permitem, como forma alternativa, utilizar amostras de urina (Lay et al., 2003) e saliva (Amado et al., 2006a).

Anticorpos anti-HAV totais e IgM são detectados, pelo teste de ELISA, na saliva de indivíduos com hepatite A aguda, com sensibilidade pouco inferior em relação às amostras séricas (Amado et al., 2006a), e anticorpos da classe IgM podem ser detectados na urina, utilizando o teste de ELISA e tem correlação de 90,78% com os resultados dos testes de amostras de sangue (Lay et al., 2003). O exame sorológico para anticorpos anti-HAV total é utilizado para determinar o estado imune, os anticorpos IgM para caracterizar a infecção aguda e os anticorpos IgG para investigar o contato prévio com a partícula viral.

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) realizada para a detecção do RNA HAV nas fezes, soro e em amostras teciduais (macerado) é muito utilizada para estudos experimentais (Hornei et al., 2001; Chudy et al., 2002; Pinto et al., 2002a) e epidemiológicos, nos casos de fezes e soro (Kwon et al., 2000; Villar et al., 2004; de Paula et al., 2004 e 2006). Em geral, essa técnica não é realizada no diagnóstico de rotina, pois – além de alto custo econômico – a maior eliminação do vírus nas fezes ocorre antes de surgirem as manifestações clínicas da infecção (Bell & Feinstone, 2004).

Métodos moleculares como a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) e nested RT-PCR vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de proporcionar o diagnóstico de forma rápida para detecção do RNA HAV antes do surgimento dos anticorpos (de Paula et al., 2004). No final do período de incubação, ocorre uma viremia que dura cerca de 100 dias. A viremia precede, em média, 17 dias o aparecimento das enzimas hepáticas e termina por volta de 60 a 79 dias após o pico dessas, apresentando concentrações de HAV menores durante a fase de convalescência (Fujiwara et al., 1997; Bower et al., 2000; Costa-Mattioli et al., 2002b).

Pela técnica do RT-PCR em tempo real na saliva de pacientes na fase virêmica da infecção observa-se uma diferença de 2 logs entre a carga viral no soro ($7,3 \times 10^3$ a $2,3 \times 10^7$ cópias de RNA HAV/mL) e na saliva ($9,3 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^4$ cópias de RNA HAV/mL) (Mackiewicz et al., 2004).

A liberação do vírus nas fezes começa no período de incubação (Ciocca, 2000; Martin & Lemon, 2006) e precede os sinais clínicos, período onde ocorre a maior eliminação viral (10^9 virions por grama de fezes) (Hollinger & Emerson, 2001). A eliminação viral continua pelo menos três semanas após o diagnóstico clínico ou bioquímico da hepatite A (Poovorawan et al., 2005) podendo persistir por mais duas semanas (Chitambar et al., 2001) a três meses (Yotsuyanagi et al., 1996).

Técnicas de imunofluorescência, direta e indireta, para detecção de antígeno de HAV em tecidos – embora não utilizadas na rotina dos laboratórios (Mathiesen et al., 1977; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002a) – ou na cultura de células infectadas pelo vírus (Gaspar et al., 1992b), são úteis em projetos de pesquisa do antígeno, sobretudo em casos em que os métodos convencionais de diagnóstico não são conclusivos ou, mesmo, na aplicação direta na pesquisa de uma nova vacina e no estudo da patogênese da doença.

1.7 – Epidemiologia

A infecção pelo vírus da hepatite A ocorre em todos os países do mundo (Figura 1.4), é responsável por cerca de 1,5 milhões de casos a cada ano (OMS, 2000) e a endemicidade da infecção pelo HAV pode ser classificada em quatro grupos, de acordo com as condições sanitárias e socioeconômicas (Tanaka, 2000).

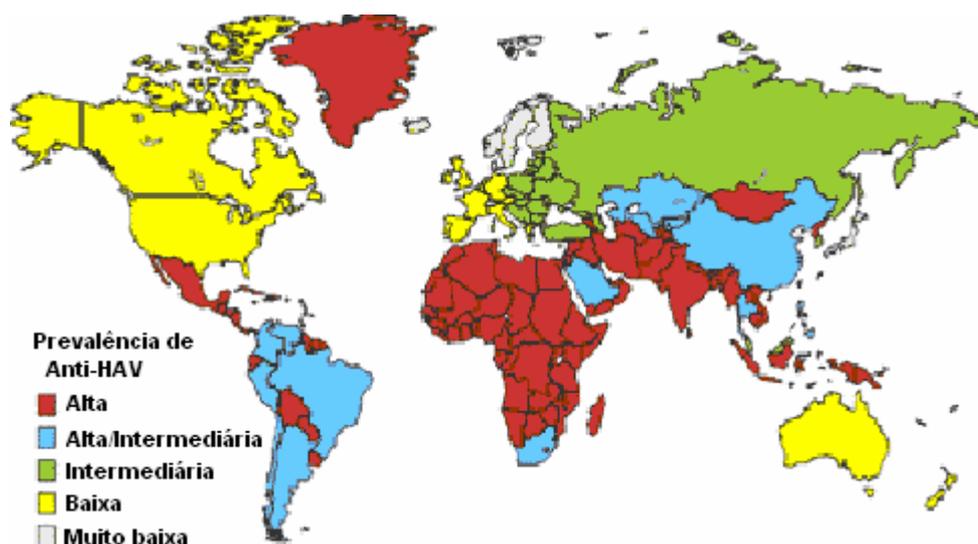


Figura 1.4 – Mapa da distribuição mundial da infecção pelo HAV (adaptado de CDC, 2006a)

Notadamente em países com precárias condições sanitárias, a endemicidade é alta, a incidência da doença varia de baixa à alta e a infecção atinge, principalmente, crianças nos primeiros anos de vida, quase sempre com a forma assintomática da doença, determinando que quase toda a população de crianças maior de dez anos de idade seja imune ao HAV. Neste caso, o padrão de transmissão é de pessoa-a-pessoa e surtos são incomuns (Gust, 1992; Melnick, 1995; Tanaka, 2000; Jacobsen & Koopman, 2005).

Países em desenvolvimento, com melhorias nas condições de saneamento básico, apresentam deslocamento da infecção do HAV de crianças para adolescentes e adultos jovens, com isso aumentando a morbidade da doença. Desta forma, a endemicidade é moderada e a incidência da doença é alta. O padrão de transmissão é de pessoa-a-pessoa e por água e alimentos contaminados, e surtos são comuns (Gust, 1992; Melnick, 1995; Tanaka, 2000; Jacobsen & Koopman, 2005).

Países desenvolvidos têm boas condições sanitárias, o que diminui a possibilidade das crianças terem contato com o vírus, gerando adultos susceptíveis que podem desenvolver a forma sintomática caso se exponham ao vírus. Estes países podem apresentar baixa (ou muito baixa) endemicidade. Nos de baixa endemicidade, a infecção atinge principalmente adultos jovens, a transmissão é de pessoa-a-pessoa e por água e alimentos contaminados. Surtos também são comuns. Já os países de muito baixa endemicidade têm incidência mínima. A infecção acomete mais frequentemente adultos, com histórico de viagens para áreas endêmicas, embora surtos sejam incomuns (Gust, 1992; Melnick, 1995; Tanaka, 2000; Jacobsen & Koopman, 2005).

Locais com condições sanitárias inadequadas e alimentos e água contaminados geralmente resultam em infecções pelo HAV em crianças pequenas (até os 6 anos) e a doença ocorre de forma subclínica ou assintomática. Nas áreas em transição de endêmica para epidêmica, as pessoas passam a entrar em contato com o vírus na fase adulta, aumentando o número de indivíduos susceptíveis, que, quando infectados, desenvolvem a forma sintomática podendo variar de uma hepatite aguda a uma forma mais severa como a fulminante (Ferreira & Silveira, 2004; Jacobsen & Koopman, 2004).

Assim, os riscos de infecção pelo HAV são maiores em viajantes para áreas endêmicas, trabalhadores da área de saúde, trabalhadores da rede de saneamento, professores e crianças de creches, pessoas institucionalizadas, homens homossexuais e prisioneiros. Receptores de transfusão de sangue, hemofílicos e usuários de drogas correm menos riscos de infecção que os citados anteriormente (Franco et al., 2003).

Na América Latina, os dados de morbidade e mortalidade pela hepatite A são incompletos em consequência da subnotificação da doença e falta de identificação do agente

etiológico. No entanto, um estudo desenvolvido por Tanaka (2000) revelou que a América Latina tem apresentado características de países em desenvolvimento, com melhorias nos programas de Saúde Pública e condições sanitárias que alteraram o padrão epidemiológico do HAV.

Pesquisas no Brasil revelam ainda recentes modificações no perfil epidemiológico da infecção pelo vírus da Hepatite A: de alta para média incidência, visualizando-se o aumento do número de adolescentes e adultos susceptíveis (Villar et al., 2002, 2004 e 2006b; Vitral et al., 1998a e 2006).

1.8 – Prevenção e controle

Para a prevenção da hepatite A, são necessárias constantes melhorias no tratamento da água fornecida à população, saneamento básico para tratamento adequado do esgoto, educação sanitária no que diz respeito a noções de higiene pessoal, maior controle de qualidade dos alimentos e vacinação em massa ou para os grupos de risco (Jacobsen & Koopman, 2005).

As imunoglobulinas podem ser utilizadas na prevenção da infecção quando administradas duas a quatro semanas antes da exposição (ACIP, 2006) e na pós-exposição ao HAV para prevenir ou diminuir a severidade da infecção (Stapleton, 1992; Winokur & Stapleton, 1992).

Indiscutivelmente, a vacinação é o método mais importante para o controle da hepatite A em áreas com melhorias das condições sanitárias, diminuição da prevalência e aumento de indivíduos susceptíveis, pois evita a infecção e disseminação da doença (Ferreira & Silveira, 2004). Um exemplo de como um programa de vacinação pode diminuir a incidência de hepatite A ocorreu nos Estados Unidos: no ano de 1995 ocorreram 31.582 casos da forma aguda (12 casos por 100.000 habitantes) e, com a utilização de vacina inativada, registraram-se 5.682 casos em 2004 (1,9 casos / 100.000 habitantes) (CDC, 2006b).

Existem vacinas inativadas contra o HAV que fazem parte de programas de imunização de diferentes países (Bell & Feinstone, 2004) e vacinas a partir de vírus atenuado como na China, sendo efetivas na prevenção da hepatite A (Mao et al., 1997; Wang et al., 2004; Zhuang et al., 2005).

As vacinas inativadas são altamente imunogênicas protegendo contra a infecção pelo HAV (OMS, 2000). Elas contêm partículas virais, produzidas em cultura de células diplóides humanas (MRC-5) (OMS, 2000), purificadas, inativadas por formalina e adsorvidas com um

adjuvante, geralmente o hidróxido de alumínio ou lipossomos, podendo (ou não) usar o 2-fenoxietanol como preservativo (Peetermans, 1992; Armstrong et al., 1993; Innis et al., 1994; OMS, 2000; Bell & Feinstone, 2004). São seguras e promovem uma proteção durável (mais de 12 anos em adultos e 6 anos ou mais em crianças) contra a infecção quando administrada nas doses recomendadas, mesmo com a indução de títulos de anticorpos mais baixos que os produzidos na infecção natural (Van Damme et al., 1994 e 2003). A idade mínima para início da vacinação é de 1 ano com duas doses com intervalo de 6 meses (Brasil, 2006).

O Ministério da Saúde oferece, nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIES), as vacinas Havrix® (Glaxo SmithKline) e a Vaqta® (Merck Sharp & Dohme) contra a hepatite A (Ferreira & Silveira, 2004). No sistema privado de saúde do Brasil são comercializadas além das vacinas inativadas oferecidas pelo CRIES as vacinas Avaxim® (Sanofi Pasteur), Epaxal® (Berna Biotech) e Twinrix® (Glaxo SmithKline) (Ferreira & Silveira, 2006).

1.9 – Modelos animais da hepatite A

Os modelos experimentais foram desenvolvidos para avaliar os diferentes mecanismos etiopatogênicos do HAV e, por meio de comparações clínicas, morfológicas e laboratoriais possibilitaram o avanço no conhecimento da história natural da hepatite A. Especialmente os primatas não-humanos são modelos experimentais ideais para o estudo da infecção pelo HAV, desenvolvendo a doença com características semelhante a dos humanos, porém de forma mais branda (Holmes et al., 1969; Dienstag et al., 1975; LeDuc et al., 1983; Deinhardt & Deinhardt, 1984; Bower et al., 2000; Pinto et al., 2002a). A escolha dos primatas não-humanos ocorreu pela transmissão do HAV de chimpanzés para homens (Hillis, 1961).

É importante acrescentar que a suscetibilidade natural dos primatas não-humanos é comprovada pelos surtos espontâneos de hepatite A descritos em animais recentemente capturados, como o *Aotus trivirgatus*, (LeDuc et al., 1981), *Macaca fascicularis* (Slighter et al., 1988), *Macaca mulatta* (Lankas & Jensen, 1987; Shevtsova et al., 1987), *Macaca arctoides* (Andzhaparidze et al., 1987a) e *Chlorocebus aethiops* (Andzhaparidze et al., 1987b).

Os primatas não-humanos, quando infectados pelo HAV, natural ou experimentalmente, desenvolvem uma infecção branda, geralmente subclínica, seguida de completa recuperação (Deinhardt & Deinhardt, 1984; Balayan, 1992). Estudos demonstram que em primatas não-humanos, o HAV é menos infeccioso se infectado experimentalmente

pela via oral que pela via intravenosa, pois, pela via oral se observa um período de incubação mais longo com maiores doses de HAV inoculado (Purcell et al., 2002).

Segundo Balayan (1992), os critérios considerados “padrão-ouro” para avaliar a infectividade e patogenicidade do HAV são: alterações morfológicas específicas no fígado; elevação dos níveis das enzimas hepáticas; eliminação de HAV nas fezes; detecção de anticorpos anti-HAV IgM e/ou soroconversão do anti-HAV.

A infecção experimental pelo HAV em primatas não-humanos propiciou inegável avanço, pois possibilitou o isolamento de amostras virais nas fezes; produção de soro hiperimune; e produção de DNA complementar (cDNA) a partir do genoma do vírus presente em amostras hepáticas. A produção de vírus infectante permitiu estudos da patogenia e a avaliação da eficácia e segurança das vacinas (Cohen et al., 1989; Asher et al., 1995; Vitral et al., 1995; Emerson et al., 1996). Porém, é imprescindível encontrar novos modelos experimentais em virtude da dificuldade de obtenção e de manejo, do alto custo e dos atributos sencientes dos primatas não-humanos.

Roedores (como modelos experimentais da hepatite A), por exemplo, já tinham sido utilizados em diversos testes de imunogenicidade, eficácia e segurança de vacinas, (Binn et al., 1986; Flehmig et al., 1987; Kusov et al., 1991; Elbert et al., 1992; Mitchell & Galun, 2003; Smerdova et al., 2004; Avdeeva et al., 2005; Mitchell et al., 2006) e em eventos relacionados à própria vacina de hepatite A (Burnett et al., 2003).

1.9.1 – Macacos superiores

O chimpanzé (*Pan troglodytes*) é um dos primatas mais susceptível a cepas do HAV dos primatas humanos e não-humanos (Balayan, 1992). Gorilas (*Gorilla gorilla*) e orangotangos (*Pongo pygmaeus*) são apenas capazes de desenvolverem conversão sorológica após infecção natural (Deinhardt & Deinhardt, 1984; Warren et al., 1998).

Chimpanzés inoculados com HAV, pelas vias oral ou intravenosa, geralmente apresentam uma infecção subclínica com eliminação de vírus nas fezes (Dienstag et al., 1975; Deinhardt & Deinhardt, 1984; Balayan, 1992; Emerson et al., 1996); viremia que pode persistir até três meses p.i. (pós-inoculação); soroconversão a partir da terceira semana p.i.; aumento dos níveis das enzimas hepáticas entre a terceira e sétima semana p.i., apresentando ao mesmo tempo antígenos de HAV no fígado (Cohen et al., 1989; Bower et al., 2000; Purcell et al., 2002) e alterações histológicas no fígado características de hepatite moderada (Schulman et al., 1976; Emerson et al., 1996).

Quando inoculados oralmente, podem apresentar HAV na saliva e na mucosa oral, antígeno nas amígdalas palatinas (Cohen et al., 1989) e na bile (Schulman et al., 1976). É importante observar que quanto maior a concentração da carga viral do inóculo, menor é o período de incubação (Cohen et al., 1989) e maior a carga virêmica (Bower et al., 2000).

Em análise de eficácia de vacina inativada, os chimpanzés desenvolveram imunoglobulinas específicas que os protegeram contra o desafio intravenoso de cepa selvagem do HAV (Purcell et al., 1992).

1.9.2 - Macacos do Novo Mundo

Os macacos do Novo Mundo mais utilizados em pesquisa com HAV pertencem às famílias Callitrichidae e Cebidae (Deinhardt & Deinhardt, 1984).

Os primatas não-humanos da família Callitrichidae utilizados em estudos com HAV compreendem principalmente as espécies, *Saguinus mystax*, *S. labiatus*, *S. fuscicollis*, *S. nigricollis*, *S. oedipus* e *Callithrix jacchus*, nesta ordem de susceptibilidade (Deinhardt & Deinhardt, 1984).

Saguinus mystax inoculados com HAV pela via enteral (Mathiesen et al., 1980; Krawczynski et al., 1981; Purcell et al., 2002) ou intravenosa (Mathiesen et al., 1978b; Emerson et al., 1996; Purcell et al., 2002) desenvolvem anticorpos anti-HAV a partir da segunda semana p.i.; os vírus são eliminados pelas fezes entre a terceira e quinta semanas p.i.; aumento dos níveis séricos de enzimas hepáticas entre a primeira e sétima semana p.i.; alterações histológicas hepáticas sugestivas de hepatites virais começando na terceira semana podendo chegar até a 11ª semana p.i.; antígeno de HAV no fígado entre a terceira e nona semana, podendo também encontrar antígeno no conteúdo intestinal, bile, baço, linfonodos abdominais e rim (Mathiesen et al., 1978b e 1980; Krawczynski et al., 1981; Emerson et al., 1996; Purcell et al., 2002). Animais desta mesma espécie foram usados em testes comprobatórios de eficácia de vacina inativada na pré e pós-exposição a uma cepa de HAV (SD11) diferente da vacina (cepa HM-175) (D'Hondt et al., 1995).

Callithrix jacchus inoculados via intravenosa (Baptista et al., 1993) ou oral (Vital et al., 1995; Pinto et al., 2002a) com HAV podem apresentar eliminação de vírus nas fezes entre o quinto e quadragésimo dia p.i.; anticorpos detectáveis a partir da terceira semana p.i.; aumento do nível sérico de ALT entre a segunda e nona semana p.i.; antígeno no fígado a partir de 6 horas até a nona semana p.i.; lesões necro-inflamatórias hepatocelulares entre a segunda e nona semana p.i. (Baptista et al., 1993; Vital et al., 1995; Pinto et al., 2002a) e

antígenos HAV no rim (Baptista et al., 1993; Vitral et al., 1995), baço, gânglios linfáticos e intestino delgado (Baptista et al., 1993).

Os macacos da família Cebidae – utilizados em estudos com HAV – compreendem principalmente as espécies *Aotus trivirgatus* e *Saimiri sciureus*. Os *Aotus trivirgatus* são susceptíveis à infecção experimental, a diversas cepas de HAV tanto pela via oral (Trahan et al., 1987; Polotsky et al., 1994; Asher et al., 1995) quanto intravenosa (Keenan et al., 1984; Trahan et al., 1987; LeDuc et al., 1983).

Saimiri sciureus foram infectados experimentalmente com HAV via intravenosa e desenvolveram características laboratoriais que se assemelham com os demais calitricídeos. Estes animais quando re-infectados podem apresentar manifestações clínicas recorrentes da doença (Prevot et al., 1992).

1.9.3 - Macacos do Velho Mundo

Os macacos do Velho Mundo, mais utilizados em pesquisa com HAV, pertencem à família Cercopithecidae e compreendem, principalmente, os gêneros *Macaca* (*M.mulatta*, *M.fascicularis*, *M.arctoides* e *M.speciosa*) e *Chlorocebus aethiops* (Rowe, 1996).

Alguns autores admitem a possibilidade da transmissão do HAV do homem para macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (Belova et al., 1991). Experimentalmente, a doença pode ser induzida por cepas humanas e de primatas não-humanos, tanto pela via oral quanto intravenosa (Doroshenko et al., 1990; Shevtsova et al., 1990 e 1991; Korzaia et al., 1991 e 1994; Emerson et al., 1996; Chitambar et al., 2001).

Os macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) desenvolvem hepatite A natural e experimentalmente, via oral e intravenosa, com cepas humanas e de primatas não-humanos, podendo apresentar aumento das enzimas hepáticas, soroconversão, eliminação de HAV nas fezes e alterações histológicas de hepatite aguda (Andzhaparidze et al., 1987c; Doroshenko et al., 1990; Korzaia et al., 1991 e 1994; Shevtsova et al., 1988; Emerson et al., 1996). Considera-se que macacos cynomolgus e *Chlorocebus aethiops* (macaco-verde-africano) poderiam apresentar a doença com evolução arrastada (Shevtsova et al., 1992). Outros macacos do gênero *Macaca* também são susceptíveis à hepatite A, como a *M.arctoides* (Andzhaparidze et al., 1987a e 1987c) e *M.speciosa* (Mao et al., 1981).

1.9.4 - Roedores

Até o momento, os estudos da patogenia do HAV, realizados com roedores, indicam, como os mais apropriados, os camundongos (*Mus musculus*) e as cobaias (*Cavia porcellus*).

Nos camundongos – utilizados em testes de imunogenicidade de vacina inativada contra o HAV – a dose mínima de antígeno necessária para a produção de anticorpos foi superior àquela inoculada em *Saguinus labiatus* (10:3) (Provost et al., 1986). Os camundongos inoculados com vacinas inativadas induziram menor quantidade de anticorpos, embora detectáveis após dois anos (Flehmig et al., 1987). Esses roedores, uma semana após receberem três doses de vacina inativada (dia 0, 14 e 28), apresentaram maiores títulos de anticorpos quando utilizado o hidróxido de alumínio comparado à vacina sem o adjuvante (Elbert et al., 1992).

No estudo da arterioesclerose relacionada aos efeitos da vacinação contra o HAV, foram empregados camundongos sem nenhuma prova conclusiva nesse estudo (Burnett et al., 2003). Quanto à imunização em camundongos pela via retal, com a vacina inativada (com hidróxido de alumínio como adjuvante), observou-se, naqueles imunizados com baixas doses, uma efetiva indução de células formadoras de IgA (em linfócitos de mucosa) e de IgM (em células do baço). Detectaram-se, também, anticorpos IgM no soro e no suco intestinal aliados à forte resposta imune celular sistêmica e nas vias aéreas, em níveis superiores a dos camundongos imunizados pela via intraperitoneal (Mitchell & Galun, 2003). Posteriormente, comparando-se as vias de imunização (intramuscular, retal e intranasal), verificou-se que a administração de vacina inativada (com adjuvante de oligodeoxinucleotídeos (ODNs) sintéticos) com seqüências de guanina-fosfato-citosina (CpG) não-metilado, incorporado a um novo lipídio catiônico, aumentou a resposta de anticorpos (IgA) específicos para HAV na interface intestinal, principalmente na administração retal e nasal em baixas doses (Mitchell et al., 2006).

As cobaias (*Cavia porcellus*) albinas são comumente utilizadas como modelo para teste de imunogenicidade da vacina contra hepatite A (Dienstag et al., 1976; Binn et al., 1986; Flehmig et al., 1987; Kusov et al., 1991; Elbert et al., 1992; Pellegrini et al., 1993; Karpovich et al., 1995; Liu et al., 1996), controle de qualidade (Smerdova et al., 2004) e teste de adjuvante (Avdeeva et al., 2005). Apenas Hornei e colaboradores (2001) descrevem a efetiva susceptibilidade desta espécie a infecção pelo HAV em estudo experimental.

Em 1976, três anos depois da visualização do HAV, Dienstag e colaboradores, ao perceberem que antígenos do HAV detectados em fezes de pacientes e em fígado de *Saguinus mystax* eram morfológicamente semelhantes, inocularam esses antígenos em *Cavia porcellus*

e analisaram a resposta de anticorpos por imunomicroscopia eletrônica (IME) e hemaglutinação imunoaderente (HIA). Observaram, então, que os dois antígenos estimularam a produção de anticorpos anti-HAV; por IME, não havia distinção na reação do soro pós-inoculação destes animais frente aos dois antígenos e que os anticorpos apresentavam títulos de diluição final semelhantes, quando testados por HIA contra os dois antígenos. Em consequência, eles sugeriram que os antígenos – morfologicamente similares de diferentes fontes com diferentes densidades – eram imunologicamente parecidos podendo ser o mesmo sorotipo, o que facilitaria o desenvolvimento de vacinas contra a hepatite A (Dienstag et al., 1976).

Binn e colaboradores (1986), por sua vez, inocularam protótipos de vacinas contra HAV inativadas com formalina e não-inativadas para testar a imunogenicidade de cada lote. As cobaias receberam três inoculações (dias 0, 21 e 42). Foram coletadas amostras de sangue nestes dias e nos dias 28 e 49 p.i. para detecção de anticorpos por radioensaio. A maioria das cobaias – que receberam os protótipos de vacinas não-inativadas e que não passaram por filtro (de 0,2 µm) – produziu anticorpos detectáveis após a primeira inoculação, provavelmente por causa da grande quantidade de antígeno nestas preparações.

Nesses lotes de vacinas inativadas, deu-se a soroconversão em todos os animais após a terceira inoculação. Já as preparações de vacinas inativadas ou não, àquelas que passaram pela filtragem, induziram, após a segunda inoculação, taxas de soroconversão similares. Anticorpos neutralizantes para HAV foram igualmente detectados nos soros de todas as cobaias após a terceira inoculação sem nenhum animal apresentar sinais clínicos da doença. É evidente que tais estudos (de inativação por formalina e imunogenicidade em animais) muito contribuíram com informações para o posterior desenvolvimento de vacinas contra o HAV (Binn et al., 1986).

Realizou-se ensaio pré-clínico de uma vacina inativada contra o HAV originada de cultura de células heteroplóides utilizando cobaias (*Cavia porcellus*) e sagüis (*Saguinus sp*). As cobaias foram imunizadas via intramuscular quatro vezes e a eficácia da vacina foi comprovada com a indução de anticorpos anti-HAV que persistiram por, pelo menos, 12 meses (Kusov et al., 1991).

Com o propósito de avaliar e melhorar a qualidade da vacina inativada em desenvolvimento contra o HAV (Hep-A-in-vac), produzida pela Rússia, realizou-se um estudo comparativo de resposta imune humoral em cobaias, ratos e camundongos por meio de diferentes esquemas de vacinação. As cobaias receberam 3 doses de vacina nos dias 0, 14 e 28, e foram divididas em 3 grupos. O primeiro grupo recebeu 0,5 mL de vacina sem adjuvante, o segundo 1,0 mL de vacina sem adjuvante e o terceiro 1,0 mL de vacina com

hidróxido de alumínio como adjuvante. As cobaias do primeiro e segundo grupo apresentaram, uma semana ou um ano após o término do esquema de vacinação, títulos de anticorpos sem diferenças significativas (superior a \log_2 8). O grupo 3 apresentou, após um ano, títulos maiores que os outros dois grupos (quase \log_2 12). Uma quarta inoculação após um ano do término do esquema de vacinação fez com que os grupos 1 e 2 apresentassem um aumento no título de anticorpos (Elbert et al., 1992).

Em outros três grupos de cobaias, que receberam 3 doses de vacina com hidróxido de alumínio com diferentes intervalos, observaram-se anticorpos detectáveis após a segunda dose e os maiores títulos de anticorpos ocorreram depois da terceira dose persistindo por, pelo menos, 135 dias (Elbert et al., 1992).

Comparando a imunogenicidade da vacina em cobaias, camundongos e ratos após 7 dias do término do esquema de vacinação (0, 14 e 28 dias) observou-se que os ratos apresentavam os menores títulos de anticorpos e com maiores variações individuais; as cobaias apresentavam títulos médios de \log_2 6,9 e os camundongos, títulos médios de \log_2 10,1, mas com maiores variações individuais do que as cobaias (Elbert et al., 1992).

Pellegrini e colaboradores (1993) realizaram ainda um estudo para evidenciar que uma vacina, inativada por formalina contra o HAV com a cepa LSH/S cultivada em células diplóides humanas MRC-5, era segura e imunogênica em modelos animais e, conseqüentemente, poderiam ser realizados estudos clínicos. Para testar a toxicidade e inativação desta vacina, foram inoculados *Callithrix jacchus*. Estes animais não apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas ou partículas infecciosas de HAV nas fezes ou no soro. Para testar a imunogenicidade, cobaias foram inoculadas três vezes com 28 dias de intervalo com 0,8, 0,2 ou 0,05 μg de antígeno de HAV adsorvido nos adjuvantes $\text{Al}(\text{OH})_3$ (0,5 ou 1 mg) ou AlPO_4 (0,3 mg). Foram também realizadas coletas de sangue quatro semanas após cada administração.

Após a primeira vacinação,

a) todos os animais que receberam as doses de 0,8 μg de antígeno com os diferentes adjuvantes e as doses de 0,2 μg – com o adjuvante AlPO_4 – demonstraram soroconversão;

b) 100% dos animais que receberam as doses de 0,2 μg com 0,5 ou 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ou as doses de 0,05 μg com AlPO_4 , apresentaram soroconversão após a terceira vacinação;

c) dentre os animais que receberam as doses de 0,05 μg com 0,5 ou 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ apenas um pequeno número apresentou soroconversão

d) os títulos de anticorpos dos animais que receberam 0,2 μg de antígenos adsorvidos com AlPO_4 foram semelhantes com os obtidos nas vacinações de 0,8 μg de antígeno com $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adjuvante.

É importante observar que, apesar de ter utilizado o esquema de vacinação em 3 doses, o uso do fosfato de alumínio, adjuvante mais eficiente neste estudo, possibilita que uma única dose da vacina induza um bom nível de proteção (Pellegrini et al., 1993).

Em 1995, cobaias foram usadas para estudo da imunogenicidade de uma vacina inativada contra o HAV produzida pela Rússia (Hep-A-in-vac). Verificou-se que a eficácia imunológica depende diretamente da quantidade de antígeno por dose. Além disso, os resultados de imunogenicidade em voluntários humanos são compatíveis com os resultados experimentais com cobaias (Karpovich et al., 1995). A seguir, uma vacina recombinante contra o HAV, utilizando, como vetor de expressão, o vírus da poliomielite tipo 1, foi inoculada em cobaias, induzindo o aparecimento de anticorpos neutralizantes para ambos os vírus (Liu et al., 1996).

Para comprovação da segurança de uma vacina, contra o HAV produzida com a cepa MB-7, vacinaram-se cobaias por 4 vezes e camundongos, uma vez. Neste experimento não foram observadas quaisquer alterações hematológicas e bioquímicas, comprovando que este produto apresentava-se livre de propriedades tóxicas (Smerdova et al., 2004).

Em posterior pesquisa, desenvolvida para analisar o efeito do uso de citocinas como adjuvantes da vacina contra a hepatite A (Hep-A-in-vac), verificou-se na totalidade dos casos soroconversão e maiores títulos de anticorpos nas cobaias imunizadas. Animais que receberam a vacina sem as citocinas apresentaram soroconversão entre 75 a 89% dos animais (Avdeeva et al., 2005).

Como citado anteriormente, o emprego de cobaias como modelo experimental para estudo da infecção pelo HAV foi realizado por Hornei e colaboradores em 2001. Neste experimento, cobaias da linhagem Dunkin-Hartley foram inoculadas, pelas vias intraperitoneal ou oral, com uma de duas variantes da cepa HM-175. Uma variante foi a HAV_{BS-C-1} obtida da infecção da cepa HM-175 em células de rim de macaco-verde africano (linhagem BS-C-1) e a outra HAV_{GP5} foi obtida após cinco passagens da variante HAV_{BS-C-1} em células embrionárias de cobaias (GPE). Os autores descreveram uma infecção sub-clínica, com período de incubação de 2 a 3 semanas, sem alterações dos níveis das enzimas hepáticas (ALT e AST) e de bilirrubina. A presença de RNA HAV nas fezes e no soro foi detectada pela técnica de nested RT-PCR e observou-se que a eliminação do vírus nas fezes pôde iniciar-se a partir do dia 14 p.i. e terminar até 52 dias p.i. bem como a viremia detectada a partir do dia 17 pôde terminar até o dia 52 p.i. A ausência de anticorpos anti-HAV, detectáveis pelas técnicas de ELISA e radioimunoensaio, pode ter ocorrido pela dose de HAV inoculada (10^5 TCID₅₀). A histopatologia (aos 60 dias p.i.) revelou alterações sugestivas de uma hepatite branda e pela técnica de nested RT-PCR detectou-se RNA HAV no tecido hepático. A detecção de RNA

HAV e o diagnóstico de lesões histológicas no baço, duodeno e jejuno indicaram replicação extra-hepática. Estes dados demonstram que ocorreu replicação de HAV nas cobaias inoculadas, o que sugeriu a utilização desses animais como modelo adaptado para o estudo da patogênese viral e testes de segurança de vacinas (Hornei et al., 2001).

1.10 – Relevância do estudo

As precárias condições de saneamento ambiental ainda são os grandes responsáveis pela crescente incidência das infecções pelo vírus da hepatite A (HAV) no Brasil. O HAV é extremamente resistente às condições externas, podendo sobreviver vários meses em águas doce, marinha e de esgoto.

Atualmente as vacinas contra o HAV, disponíveis na Rede Pública, são importadas, em sua totalidade, com alto preço e destinam-se principalmente, a pessoas com hepatopatias crônicas. É indispensável, portanto, o desenvolvimento de uma vacina nacional, de baixo custo, para possibilitar a produção industrial e sua distribuição pelo Ministério da Saúde.

O homem é o único reservatório natural do vírus da hepatite A. Desde 1992, o Laboratório de Hepatites Virais do IOC/Fiocruz participa efetivamente no estudo de modelos experimentais na infecção pelo HAV e sua imunopatologia. Nestes trabalhos, confirmou-se a importante contribuição dos primatas não-humanos neotropicais nos estudos de infectividade e de imunogenicidade do vírus da Hepatite A, cepa HAF-203, isolada no Brasil.

Roedores como modelos experimentais da hepatite A foram utilizados em diversos testes de imunogenicidade, eficácia e segurança de vacinas. Até o momento os estudos da patogenia do HAV realizados com roedores indicam, como os mais apropriados, as cobaias (*Cavia porcellus*).

A justificativa para o uso de cobaias (*Cavia porcellus*), como modelo experimental do HAV cepa HAF-203, apóia-se na circunstância de substituir ou reduzir o número de primatas não-humanos (visto que esses animais, além do alto valor econômico, são de suprimento limitado, de complexo manejo em cativeiro e de elevado valor moral, já que são reconhecidamente mais sencientes que as cobaias).

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Analisar aspectos clínicos e laboratoriais no decorrer de uma infecção experimental pelo vírus da hepatite A (HAV) em cobaias (*Cavia porcellus*) da linhagem “Fiocruz”, visando utilizá-las como modelo experimental no desenvolvimento de vacinas contra o HAV.

2.2 - Objetivos específicos

- Comparação da patogenia da cepa HAF-203 do vírus da hepatite A, adaptada ou não a cultura de células FRhK-4.
- Investigar a replicação do vírus da hepatite A em cobaia (*Cavia porcellus*) caracterizada pela presença de RNA viral nas fezes e no parênquima hepático.
- Comparar as lesões hepatocelulares nas cobaias com àquelas descritas em infecções agudas pelo vírus no homem e em primatas-não humanos.
- Comparar os níveis séricos, pré e pós-inoculação, das enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT).
- Analisar o desenvolvimento de anticorpos totais anti-HAV.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Apresentação

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Experimentação Animal (Laean) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos – Bio-Manguinhos, e no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDT) do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz, com a colaboração do Laboratório de Neurovirulência (Laneu) de Bio-Manguinhos e Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Qualidade do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal) da Fiocruz.

3.2 - Inóculos

3.2.1 - Vírus de hepatite A cepa HAF-203, selvagem (wt)

A cepa HAF-203, o único vírus de hepatite A isolado e descrito no Brasil (acesso: GenBank AF268396), foi obtida de um caso agudo de infecção humana pelo HAV (Gaspar et al., 1992b).

Resumidamente, as amostras de fezes do paciente foram diluídas a 1% (peso/volume) em PBS (10 mM de fosfato de sódio, 0.15 M de NaCl) com penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), clarificadas com centrifugação de baixa velocidade e filtradas por meio de membrana de 0.45 µm (Gaspar et al., 1992b). Posteriormente, a carga viral foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) com $4,35 \times 10^5$ cópias de RNA viral/mL.

3.2.2 - Vírus de hepatite A cepa HAF-203 (adaptada em células FRhK-4)

A cepa HAF-203 foi adaptada em células FRhK-4 (rim de feto de macaco rhesus – *Macaca mulata*), e a quarta passagem seriada do vírus nestas células, por apresentar aumento da produção do título viral, foi selecionada para banco de produção de inóculo (comunicação pessoal, Sheila Maria Barbosa de Lima & Liliane Monteiro de Moraes).

Este vírus foi cultivado em células FRhK-4, extraído, clarificado e quantificado por PCR em tempo real com $1,15 \times 10^6$ cópias de RNA viral/mL.

3.3 - Experimentos com animais

Os experimentos foram realizados segundo o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz), do Programa nº P0257/05, intitulado “Desenvolvimento da vacina inativada contra o vírus da hepatite A” sob a responsabilidade do Dr. Marcelo Alves Pinto, IOC – Departamento de Virologia/Fiocruz (Anexo I).

3.3.1 - Cobaias (*Cavia porcellus*)

Utilizaram-se 15 cobaias (*Cavia porcellus*) (Figura 3.1), linhagem “Fiocruz”, fêmeas, recém-desmamadas (19 dias de idade), clinicamente saudáveis, fornecidas pelo Departamento de Produção Animal - Cecal/ Fiocruz. Destes animais, três foram destinados à pesquisa de *Salmonella* sp.

Estes animais foram recebidos pelo Laean onde permaneceram durante todo o experimento, mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno (60 x 50 x 22 cm) em sistema de estantes ventiladas (Figura 3.2) (Alesco Indústria e Comércio Ltda, Monte Mor – SP, Brasil). Os experimentos foram realizados em laboratório com nível de Biossegurança Animal 2 (NBA-2), com temperatura entre 18 °C e 22 °C, umidade relativa do ar entre 55 e 75% e ciclos diários de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. As gaiolas eram específicas para *Cavia porcellus*, forradas com maravalha autoclavada e a alimentação foi composta de ração comercial para cobaias (Nutricobaia, Purina®) e água autoclavada *ad libitum* complementada com ácido ascórbico (vitamina C) 1g/ L de água, a cada três dias.

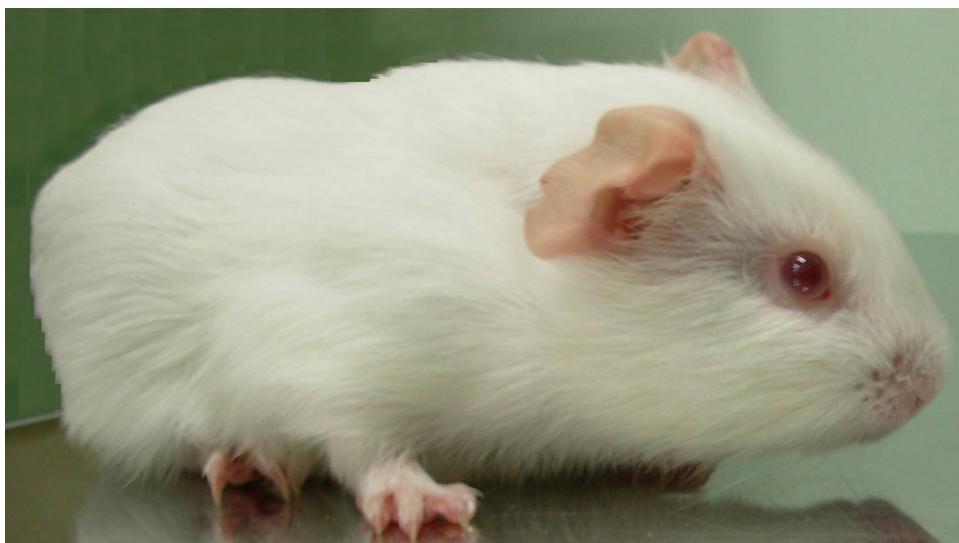


Figura 3.1 – *Cavia porcellus* (cobaia) da linhagem “Fiocruz”



Figura 3.2 – Estantes ventiladas para cobaias (Alesco Indústria e Comércio Ltda, Brasil)

3.3.2 - Delineamento experimental

Doze cobaias foram divididas, igualmente, em 3 Grupos (Tabela 3.1):

- Grupo 1, inoculado com 0,5 mL suspensão de vírus de hepatite A cepa HAF-203 selvagem (wt);
- Grupo 2, inoculado com 0,19 mL da suspensão da cepa HAF-203 adaptada em células FRhK-4 adicionada de 0,31 mL de meio de cultura 199;
- Grupo 3, inoculado com 0,5 mL de meio de cultura 199 suplementado com 1% de AANE (aminoácidos não-essenciais) 0,1 mM, acrescido de 10% de soro fetal bovino, de 2,25% de bicarbonato de sódio (4,4%) e 1% de gamicina (80 mg/mL).

Tabela 3.1 – Caracterização dos 3 Grupos de cobaias, números dos animais, respectivos inóculos e cópias de RNA HAV por dose

Grupo nº	Nº das cobaias	Inóculo	Carga viral (cópias de RNA/0,5mL)
1	1, 2, 3 e 4	HAV cepa HAF-203 wt	$2,17 \times 10^5$
2	5, 6, 7 e 8	HAV cepa HAF-203 adaptada em células FRhK-4	$2,18 \times 10^5$
3	9, 10, 11 e 12	Meio 199	0

3.3.3 - Protocolo anestésico

Nos procedimentos de coleta de sangue as cobaias receberam administração prévia de solução anestésica de cetamina (44mg/kg) (Vetanarcol® - König, Argentina) e xilazina (5mg/kg) (Kensol® - König, Argentina) pela via intraperitoneal (Terril & Clemons, 1997), empregando-se seringa descartável de 1mL e agulha hipodérmica descartável de 13 x 4,5 (26 G ½”). Quando se confirmava a ausência de reação a estímulos dolorosos, eram colhidas as amostras.

3.3.4 - Inoculação

Após a contenção mecânica realizou-se a assepsia da região abdominal com gaze estéril embebida em álcool etílico a 70%. As cobaias dos 3 Grupos receberam o mesmo volume (0,5 mL) intraperitonealmente. Utilizaram-se, seringas descartáveis de 1mL com agulhas hipodérmicas descartáveis 13 x 4,5 (26 G ½”) (Figura 3.3). Todos os animais receberam apenas uma dose do inóculo.

Iniciamos a inoculação pelos animais do Grupo 3 (controles-negativos), seguindo-se os do Grupo 2 e Grupo 1.



Figura 3.3 – *Cavia porcellus*.
Contenção mecânica e inoculação intraperitoneal

3.3.5 – Observação clínica

Os animais eram observados uma vez por dia, avaliando-se o consumo de alimento e água, as características dos dejetos e as manifestações clínicas.

Registraram-se os pesos em planilhas computadorizadas. Com utilização do programa GraphPad Prism v.4.0 (GraphPad Software Inc., EUA, 2003), gráficos de pesos de cada animal por Grupo experimental foram confeccionados. Com o programa estatístico Minitab 14 (Minitab Inc., EUA, 2003), também prepararam-se gráficos para comparação dos pesos entre os Grupos e os dados foram submetidos à análise estatística.

3.3.6 - Coleta de fezes

Foram realizadas coletas de fezes presentes nas gaiolas, desde o dia da inoculação até o final do experimento, sempre pelas manhãs, em horário definido. As amostras, coletadas em tubos identificados, estéreis de 1,5 mL (Tabela 3.2), eram transportadas em caixa isotérmica, para material com risco biológico, até o LDT para armazená-las em freezer a -70 °C.

Amostras selecionadas foram analisadas por PCR em tempo real para detecção de DNA complementar ao RNA HAV.

Tabela 3.2 - Identificação numérica (1 a 336) das amostras de fezes diariamente colhidas das 12 cobaias, durante os 56 dias do experimento

Dia do experimento	Número das cobaias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Identificação das amostras de fezes											
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
2	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
3	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
4	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
5	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
6	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
7	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
8	^a -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
11	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
12	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
13	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144

Dia do experimento	Número das cobaias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Identificação das amostras de fezes											
14	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
15	^b x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-
16	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-
17	x	157	158	159	x	160	161	162	x	163	164	165
18	x	166	167	168	x	169	170	171	x	172	173	174
19	x	175	176	177	x	178	179	180	x	181	182	183
20	x	184	185	186	x	187	188	189	x	190	191	192
21	x	193	194	195	x	196	197	198	x	199	200	201
22	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-
23	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-
24	x	202	203	204	x	205	206	207	x	208	209	210
25	x	211	212	213	x	214	215	216	x	217	218	219
26	x	220	221	222	x	223	224	225	x	226	227	228
27	x	229	230	231	x	232	233	234	x	235	236	237
28	x	238	239	240	x	241	242	243	x	244	245	246
29	x	x	-	-	x	x	-	-	x	x	-	-
30	x	x	-	-	x	x	-	-	x	x	-	-
31	x	x	247	248	x	x	249	250	x	x	251	252
32	x	x	253	254	x	x	255	256	x	x	257	258
33	x	x	259	260	x	x	261	262	x	x	263	264
34	x	x	265	266	x	x	267	268	x	x	269	270
35	x	x	271	272	x	x	273	274	x	x	275	276
36	x	x	-	-	x	x	-	-	x	x	-	-
37	x	x	-	-	x	x	-	-	x	x	-	-
38	x	x	277	278	x	x	279	280	x	x	281	282
39	x	x	283	284	x	x	285	286	x	x	287	288
40	x	x	289	290	x	x	291	292	x	x	293	294
41	x	x	295	296	x	x	297	298	x	x	299	300
42	x	x	301	302	x	x	303	304	x	x	305	306
43	x	x	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-
44	x	x	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-
45	x	x	x	307	x	x	x	308	x	x	x	309
46	x	x	x	310	x	x	x	311	x	x	x	312
47	x	x	x	313	x	x	x	314	x	x	x	315
48	x	x	x	316	x	x	x	317	x	x	x	318
49	x	x	x	319	x	x	x	320	x	x	x	321
50	x	x	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-
51	x	x	x	-	x	x	x	-	x	x	x	-
52	x	x	x	322	x	x	x	323	x	x	x	324
53	x	x	x	325	x	x	x	326	x	x	x	327
54	x	x	x	328	x	x	x	329	x	x	x	330
55	x	x	x	331	x	x	x	332	x	x	x	333
56	x	x	x	334	x	x	x	335	x	x	x	336

^a Nos dias em que as amostras não foram colhidas, mas os animais ainda estavam vivos, marcou-se um hífen

^b A partir do momento em que um animal foi submetido à eutanásia registrava-se um x na coluna referente a esta cobaia

3.3.7 - Coletas de sangue

Colheram-se, de cada animal, dois dias antes da inoculação, amostras de sangue (1,0 mL) por punção cardíaca, com o emprego de agulhas 30 x 6 (23 G1 ¼'') e seringas (3,0 mL), descartáveis e estéreis. As amostras de sangue foram transferidas das seringas para tubos estéreis (de 1 mL) com ativador de coágulo (MiniCollect® Vacuette do Brasil).

Nas amostras de sangue, colhidas nos animais submetidos à eutanásia, utilizaram-se tubos para coleta de sangue à vácuo (de 8,5 mL) com ativador de coágulo e gel separador (BD Vacutainer™).

Após o término das coletas, os tubos contendo sangue foram transportados em caixa isotérmica para material com risco biológico, ao LDT, colocados na estufa a 37 °C (para formação de coágulo) e, a seguir, centrifugados (2.100 x g) durante 5 minutos. Os soros foram transferidos para criotubos de 1,8 mL, armazenados em freezer a -70 °C e procedeu-se à sorologia específica de anticorpos totais anti-HAV no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDT), e análises das enzimas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT), no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Qualidade - Cecal/ Fiocruz.

3.3.8 - Eutanásia

Cobaias dos Grupos 1, 2 e 3 eram escolhidas de forma planejada e submetidas à eutanásia a cada duas semanas após a inoculação (Tabela 3.3). Sob narcose profunda, seguindo-se o protocolo anestésico (item 3.3.3), realizaram-se as punções cardíacas até a completa exsangüinação, utilizando-se seringas “luer-lock” descartáveis de 20 mL com agulha hipodérmica 30 x 6 (23 G1 ¼'').

Tabela 3.3 - Distribuição dos animais de cada Grupo, conforme a data da eutanásia, que ocorreu nos dias 14, 28, 42 e 56 do experimento

Dias da eutanásia (pós-inoculação)	Grupo 1 – cepa HAF-203 wt	Grupo 2 –cepa HAF-203 adaptada em células FRhK-4	Grupo 3 – Meio 199
	Número de identificação das cobaias		
14	1	5	9
28	2	6	10
42	3	7	11
56	4	8	12

3.3.9 - Obtenção de amostras de órgãos

Depois da verificação da morte do animal iniciou-se a remoção de amostras de órgãos (fígado, vesícula biliar, rins, intestinos delgado e grosso), que foram, a seguir, fixadas em formalina tamponada a 10%. As amostras, destinadas às análises histológicas, foram transportadas, em caixa isotérmica para material com risco biológico, para o Laboratório de Neurovirulência (Laneu) de Bio-Manguinhos.

Amostras de fígado, a fresco, de cada animal, eram colocadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise, por PCR em tempo real, da presença de DNA complementar ao RNA HAV no LDT.

3.3.10 - Pesquisa de *Salmonella* sp nos animais

Nas 12 cobaias e mais um grupo adicional de 3 animais da mesma linhagem, foram realizadas, anterior ao desafio, pesquisa de *Salmonella* sp em amostras de fezes, com o apoio do Laboratório de Enterobactérias (Labent) do Departamento de Bacteriologia - IOC/Fiocruz.

No grupo adicional (3 cobaias), para análise do padrão sanitário, colheram-se amostras de sangue e fígado obtidas após a eutanásia para pesquisa de *Salmonella*.

Cada suspensão de amostra foi pré-enriquecida em meio não-seletivo, enriquecida com meios seletivos adicionados de inibidores e posteriormente em meios seletivos-indicadores que propiciam o isolamento de diferentes membros das enterobactérias.

Selecionaram-se as colônias bacterianas suspeitas, por apresentarem aspectos macroscópicos relacionados a características da maioria das salmonelas. Para meios de triagem, foram transferidas. Esses meios possibilitaram uma caracterização bioquímica presuntiva, pois indicaram os testes bioquímicos complementares necessários para identificar os membros da família Enterobacteriaceae. As amostras de fezes, fígado e sangue foram, também, semeadas diretamente em meios seletivos-indicadores (Rodrigues et al., 2006).

Os testes microbiológicos das fezes das 12 cobaias assim como as amostras de fezes, sangue e tecido hepático, das 3 utilizadas para análise do padrão sanitário, não detectaram *Salmonella* sp nas amostras analisadas.

3.4 - Diagnóstico Laboratorial

3.4.1 - Testes de ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA) para o diagnóstico de anticorpos totais anti-HAV

Os testes de ELISA foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDT) do Departamento de Virologia – IOC/ Fiocruz.

O teste utiliza o método imunoenzimático (ELISA) competitivo para determinação de anticorpos totais anti-HAV nas amostras de soro. Nesse ELISA os anticorpos anti-HAV presentes nas amostras competem com os anticorpos monoclonais anti-HAV conjugados com peroxidase quando são incubados simultaneamente nos poços da microplaca recobertos com HAV. Após a lavagem, a solução de substrato enzimático e cromógeno é adicionada. Caso as amostras de soro sejam negativas para a presença de anticorpos totais anti-HAV essa solução reage com a peroxidase do anticorpo monoclonal.

Material:

- “kit” comercial (Bioelisa HAV® – Biokit, Barcelona, Espanha).

Método:

Para detecção de anticorpos totais anti-HAV das amostras de soro pré e pós-inoculação utilizou-se o “kit” comercial Bioelisa HAV® e seguiram-se as instruções do fabricante.

No total, foram analisadas 24 amostras de soro em duplicata, que correspondem às 12 amostras pré-inoculação e às 12 pós-inoculação. Três poços da microplaca de ELISA foram utilizados para o soro padrão-negativo (soro de humano diluído negativo para anticorpos anti-HAV); 2 poços para o soro padrão-positivo (soro de humano diluído contendo anticorpos anti-HAV) e 3 poços para o branco (que não receberam quaisquer soro).

Foram pipetados: 10 µL das amostras de soro das cobaias; 10 µL do soro padrão-positivo e 10 µL do soro padrão-negativo, nos respectivos poços da microplaca recobertos com HAV. Nos poços para o branco, nada foi pipetado. Imediatamente após, 100 µL da solução de anticorpo anti-HAV monoclonal de camundongo, conjugado com peroxidase, foram acrescentados aos poços da placa, com exceção do branco. A placa foi coberta com filme plástico adesivo e incubada durante 60 min em estufa a 37 °C.

Após a incubação, os poços foram a) aspirados para retirada de seu conteúdo; b) lavados por seis vezes, com intervalos de 15 s – com solução de lavagem diluída (tampão

fosfato concentrado 1x) – e c) novamente aspirados e levemente golpeados, para total retirada do líquido.

Em recipiente separado, adicionaram-se 8 mL do substrato (citrato de sódio-acetato e peróxido de hidrogênio) e 160 µL de cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) originando a solução substrato-TMB. Dessa solução, 100 µL foram pipetados em cada poço inclusive os do branco. A seguir, a placa foi incubada por 30 min a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C).

Após o término da incubação, 100 µL da solução de bloqueio (ácido sulfúrico 1N) foi adicionado em cada poço (para interromper a reação). Neste momento, as amostras fortemente positivas se tornaram incolores e as negativas amareladas.

Em seguida, era realizada a leitura das absorbâncias (DO) de cada poço em leitor de microplaca de ELISA (Microplate Reader modelo 680 Bio Rad), com o comprimento de onda de 450 nm.

Para avaliação dos resultados foi calculado o valor de “cut-off” pela soma das médias das absorbâncias dos controles positivos (CPx) e dos controles negativos (CNx) bem como sua divisão por dois: “cut-off” = (CPx + CNx)/2

De acordo com as instruções do fabricante, o valor da absorbância (DO) lida em cada poço deve ser dividida pelo valor de “cut-off”. Desses cálculos, os valores (DO/“cut-off”) iguais ou inferiores a 1,0 foram considerados positivos; os superiores a 1,1 foram considerados negativos e os superiores a 1,0 e inferiores ou iguais a 1,1 foram considerados não-conclusivos.

Neste trabalho, o critério de avaliação dos resultados obtidos no ensaio imunoenzimático incluiu a repetitividade das duas análises de uma mesma amostra. Os dados coincidentes foram considerados consistentes para este estudo.

3.4.2 - Análise dos níveis séricos de enzimas hepáticas pré e pós-inoculação

Todos os exames dos níveis séricos das enzimas hepáticas – alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) – foram realizadas pelo Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Qualidade - Cecal.

Material:

- Sistema automatizado de bioquímica Vitros System Chemistry 750 XRC (Ortho-Clinical Diagnostics Inc, Johnson & Johnson Company, Nova York, EUA) com os respectivos reagentes.

Método:

Nas amostras de soro coletadas pré e pós-inoculação foram analisados os níveis de ALT, AST e GGT.

Para o procedimento foi utilizado o analisador Vitros 750 XRC com “kits” específicos para o mesmo. Nessas análises foram utilizados 0,3 mL de soro por amostra. As reações para uma medição quantitativa ocorreram no elemento analítico de múltiplas camadas de lâmina Vitros específicos para um tipo de teste. O método utilizado foi o colorimétrico enzimático (Reitman & Frankel, 1957).

Com os resultados das amostras de soro pré-inoculação foi calculada uma média para cada enzima dosada que foi utilizada como valor base para todos os animais.

Nos soros pós-inoculação, como somente um animal de cada grupo foi submetido à eutanásia, os dados encontrados representam o resultado da amostra obtida no dia do óbito.

Os valores das enzimas dosadas foram registradas em planilha com o programa computadorizado GraphPad Prism v.4.0 (GraphPad Software Inc., EUA, 2003) para confecção de um gráfico relativo a cada uma das enzimas. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com o programa computadorizado Minitab 14 (Minitab Inc., EUA, 2003).

3.4.3 - Pesquisa do RNA HAV nas amostras de fígado pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)

Os testes de PCR foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDT) do Departamento de Virologia – IOC/ Fiocruz.

O método de diagnóstico molecular utilizado está padronizado e validado para detecção da região 5'NC do HAV (Amado, 2006b; de Paula et al., 2007).

3.4.3.1 - Preparação das amostras

As amostras de fígado armazenadas em nitrogênio líquido foram primeiramente descongeladas (temperatura ambiente) e, a seguir, tiveram alíquotas (de 0,1 g) maceradas com lâminas de bisturi e colocadas em tubos estéreis de 1,5 mL.

3.4.3.2 – Extração de RNA

Materiais:

- Solução salina tamponada (PBS, pH 7,4);
- Reagente TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, EUA);
- Clorofórmio puro (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Glicogênio 20µg/µL (Invitrogen, Califórnia, EUA).

Método:

O método de extração utilizou o reagente TRIzol®, composto de fenol clorofórmio com adaptação do processo realizado no LDT (Chomczynski & Sacchi, 1987; de Paula et al., 2003).

Em cada tubo estéril de polipropileno (de 1,5 mL), contendo 0,1 g de fígado macerado, foi adicionado 200 µL de solução salina tamponada (PBS) e, a seguir, o tubo foi homogeneizado vigorosamente por 5 min. Como controle positivo, era colocado 200 µL de vírus de cultura celular (produzido conforme descrito no item 3.2.2) em um tubo estéril.

Em cada tubo foi adicionado 800 µL de TRIzol® e 200 µL de clorofórmio. O tubo foi vigorosamente homogeneizado por 5 min, incubado à temperatura ambiente por 20 min e centrifugado por 30 min (16.100 x g) a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante aquoso foi transferido para um tubo estéril (de 1,5 mL) contendo 600 µL de isopropanol a 100% e 2 µL de glicogênio para a precipitação do RNA. Esta amostra foi homogeneizada e incubada, sob refrigeração (freezer a -70 °C) por aproximadamente 20 horas.

As amostras congeladas foram centrifugadas por 30 min a 16.100 x g a 4 °C, descartando-se o sobrenadante e lavadas com 1 mL de isopropanol (a 75%). A seguir, as amostras foram submetidas à centrifugação por 30 min (16.100 x g) a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado seco apresentou a forma de precipitado.

3.4.3.3 - Síntese de DNA complementar (cDNA)

Materiais:

- Random Primer (20 pmol/µL) (Promega, Madison, EUA);
- Água destilada ultra-pura livre de RNA/DNases (Invitrogen, Nova York, EUA);
- Inibidor de RNase - RNasin® Plus (40 U/µL) (Promega, Madison, EUA);
- Mistura de dNTP (1,25 mM) (Promega, Madison, EUA);

- Enzima “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (M-MLV – RT) (200 U/ μ L) (Promega, Madison, EUA);
- Tampão de reação da enzima (“M-MLV RT 5X Buffer”) (Promega, Madison, EUA).

Método:

Em cada tubo contendo os precipitados de RNA foram adicionados 2 μ L de do Random primer e 8 μ L de água destilada ultra-pura livre de RNA/DNAses. Os “pellets” foram homogeneizados e transferidos para tubos estéreis (de 0,5 mL), contendo 0,5 μ L de RNasin®, inibidor de RNase, 1,0 μ L de dNTP, 4,0 μ L de tampão de reação da enzima (“M-MLV Buffer”), 1,0 μ L da enzima M-MLV – RT e 3,5 μ L de água destilada ultra-pura livre de RNA/DNAses.

Os tubos (de 0,5 mL), contendo RNA e os compostos para a síntese do DNA complementar (cDNA), foram então colocados no termociclador para processamento do programa cDNA MMLV, onde as amostras permaneceram a 37 °C por 60 min, para ocorrer a transcrição reversa do RNA em cDNA e, posteriormente, a 65 °C por 10 min para inativação da enzima. Os cDNAs foram armazenados em freezer a -20 °C até realização do PCR em tempo real.

3.4.3.4 – PCR quantitativo em tempo real

Materiais:

- Água destilada ultra-pura livre de RNA/DNAses (Invitrogen, Nova York, EUA);
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs com dUTP, referência passiva e tampão) (Roche, Nova Jersey, EUA);
- “Assay-by-design” (300 nM de cada iniciadores e 150 nM de sonda) (Applied Biosystems assay, CA, EUA);
- Placa de polipropileno com 96 poços.

Método:

O PCR em tempo real (TaqMan-Applied Biosystems, Foster City, CA) foi utilizado para detecção do fragmento da região 5' NC e para quantificar a carga viral do HAV nas amostras.

A quantificação absoluta das amostras foi determinada utilizando-se uma curva padrão externa de 10^1 a 10^7 cópias de RNA viral/mL com sensibilidade de 15 cópias de RNA viral/mL (de Paula et al., 2007).

Utilizaram-se iniciadores específicos para a região 5' NC do HAV e uma sonda marcada na extremidade 5' com o "reporter FAM" (6-carboxifluoresceína) (Tabela 3.4), utilizando o programa Primer Express v. 2.0 (TaqMan gene expression assay, Applied Biosystems Inc.) (Amado, 2006b).

Preparou-se uma solução, em banho-de-gelo, contendo 6,25 μ L de água destilada ultra-pura livre de RNA/DNases, 12,5 μ L de "Master Mix" e 1,25 μ L de "Assay-by-design", totalizando 20 μ L para cada amostra. Esta mistura foi adicionada em um poço que imediatamente recebeu 5 μ L da amostra de cDNA. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Para o controle da reação alguns poços não receberam amostra de cDNA. Após pipetar todas as amostras nos poços, a placa foi coberta com parafilme, submetida à centrifugação por menos de um minuto e colocada no termociclador (PCR em tempo real).

Foi utilizado o sistema 7500 da Applied Biosystems de PCR em tempo real. Para a corrida do PCR a placa com as amostras permaneceu 2 min a 50 °C, quando ocorreu descontaminação inicial da placa com uracil N-glicosilase (UNG); 10 minutos a 95 °C para a desnaturação e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. No final da etapa de hibridização da sonda, a fluorescência foi detectada.

Após a corrida o programa fornece o valor do Ct ("threshold cycle"), que se refere ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada e, portanto a amostra amplificada.

Tabela 3.4 - Iniciadores específicos para a região 5' NC do HAV e sonda marcada na extremidade 5', utilizados no PCR em tempo real (Amado, 2006b)

Oligo e sonda	Polaridade	Posição no genoma	Seqüência
Sense	positiva	86-109	5'TGCAGGTTTCAGGGTTCTTAAATC3'
Anti-sense	negativa	219-240	5'GAGACCCTGGAAGAAAGAAGA3'
Sonda		198-218	FAM-5'ACTCATTTTTTCACGCTTTCTG3'

3.4.4 - Análise histológica

Os procedimentos histotécnicos e avaliações histológicas foram desenvolvidos pelo Laneu.

As amostras de tecidos (fígado, vesícula biliar, rins, intestino delgado e grosso) foram fixadas por 24 horas em solução de formalina a 10% tamponada, recortadas, lavadas em água corrente, desidratadas, clarificadas, infiltradas e incluídas em Paraplast® (Oxford Labware, St. Louis, EUA), cortadas a cinco micrômetros e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (Luna, 1968) além de examinadas ao microscópio óptico (Leica DMRXA). Lâminas de tecido hepático foram, também, coradas pela técnica de Masson (Luna, 1968), para identificação do tecido conjuntivo; pelo PAS (Luna, 1968), para mucopolissacarídeos; e, finalmente, pelo Giemsa (Luna, 1968), para identificação de células inflamatórias.

Os critérios de diagnóstico histológico de hepatite viral aguda incluem: injúria hepatocelular, infiltração portal por células inflamatórias mononucleares, erosão da lâmina limitante e as várias formas de necrose (focal, lobular ou em ponte) e apoptose.

3.4.5 – Pesquisa do RNA HAV nas amostras de fezes pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)

Os testes de PCR foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico (LDT) do Departamento de Virologia – IOC/ Fiocruz.

3.4.5.1 - Pré-tratamento das amostras de fezes

Cento e oito amostras de fezes após a inoculação foram analisadas (Tabela 3.5) em duplicata, abrangendo o período de 7 a 56 dias, com intervalos de 2 a 3 dias, com o intuito de detectar o genoma viral em faixa tão ampla quanto a descrita em primatas não-humanos (Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002a) e *Cavia porcellus* infectadas experimentalmente com HAV (Hornei et al., 2001).

Tabela 3.5 - Seleção das amostras de fezes das cobaias analisadas para a presença de RNA HAV pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)

Dia do experimento	Número das cobaias											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Identificação das amostras de fezes analisadas											
7	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
11	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
14	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
18	^a x	166	167	168	x	169	170	171	x	172	173	174
21	x	193	194	195	x	196	197	198	x	199	200	201
25	x	211	212	213	x	214	215	216	x	217	218	219
28	x	238	239	240	x	241	242	243	x	244	245	246
32	x	x	253	254	x	x	255	256	x	x	257	258
35	x	x	271	272	x	x	273	274	x	x	275	276
39	x	x	283	284	x	x	285	286	x	x	287	288
42	x	x	301	302	x	x	303	304	x	x	305	306
46	x	x	x	310	x	x	x	311	x	x	x	312
49	x	x	x	319	x	x	x	320	x	x	x	321
53	x	x	x	325	x	x	x	326	x	x	x	327
56	x	x	x	334	x	x	x	335	x	x	x	336

^aA partir do momento em que um animal foi submetido à eutanásia registrava-se um x na coluna referente a esta cobaia

Método:

Cada amostra foi descongelada e pesada para obtenção de 0,5 g de fezes em tubo estéril (de 50 mL). Essas amostras foram diluídas em 5 mL de solução salina tamponada (PBS 7,4 pH), obtendo-se desta forma uma solução fecal a 10% (0,1 g/mL), acrescentada de 10 pérolas de vidro de 3 a 4 mm, agitada vigorosamente por 2 min e centrifugadas, a 4.800 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi aspirado com pipeta descartável para seringa de 10 mL acoplada a filtro (Millipore®) estéril de 0,45 µm e, a seguir, filtrado e armazenado em criotubo (de 1,8 mL) a -70 °C.

3.4.5.2 – Extração de RNA

Materiais:

- “Kit” comercial (QIAamp® Viral RNA Mini kit – Qiagen, Maryland, EUA);
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Método:

Para extração das amostras de fezes filtradas, foi utilizado um “kit” comercial e etanol absoluto seguindo-se as instruções do fabricante.

Em cada tubo estéril (de 1,5 mL), foram pipetados 560 µL do tampão AVL (“Viral Lysis Buffer”). A seguir, adicionaram-se 140 µL da amostra. Os tubos foram vigorosamente homogeneizados por 15 s, incubados a temperatura ambiente por 10 min para completa lise da partícula viral e, a seguir, centrifugados por alguns segundos. Foram adicionados 560 µL de etanol absoluto, imediatamente após homogeneizados vigorosamente e centrifugados por menos de 1 min. De cada tubo, 630 µL da solução foram colocadas em colunas com membrana de sílica-gel, acoplados a bases coletoras e centrifugadas por 1 min a 6.000 x g.

Após centrifugação, as bases foram descartadas e substituídas por novas. Novamente foram transferidos 630 µL da solução dos tubos para as colunas, centrifugadas por 1 min a 6.000 x g, e substituídas as bases. Foram adicionados 500 µL de tampão AW1 (“Washer Buffer 1”), centrifugados por 1 min a 6.000 x g e substituídas as bases.

Outro tampão, o AW2 (“Washer Buffer 2”) foi adicionado em cada coluna, em 500 µL, centrifugadas por 3 min a 20.000 x g para lavagem das colunas. Após a centrifugação, as bases foram descartadas, as colunas acopladas a tubos estéreis de 1,5 mL e adicionados 60 µL de tampão AVE (“Elution Buffer”) no centro das colunas para eluição do RNA. As colunas acopladas aos tubos foram centrifugadas por 1 minuto a 6.000 x g, descartadas, e os tubos, contendo o RNA, foram armazenados em freezer a -20 °C por alguns minutos para a preparação da etapa seguinte.

3.4.5.3 – Síntese do DNA complementar (cDNA)

Materiais:

- Random Primer (20 pmol/µL) (Promega, Madison, EUA);
- Água destilada ultra-pura livre de RNA/DNAses (Invitrogen, Nova York, EUA);
- Inibidor de RNase - RNasin® Plus (40 U/µL) (Promega, Madison, EUA);
- Mistura de dNTP (1,25 mM) (Promega, Madison, EUA);
- Enzima “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase” (M-MLV – RT) (200 U/µL) (Promega, Madison, EUA);
- Tampão de reação da enzima (“M-MLV RT 5X Buffer”) (Promega, Madison, EUA);

Método:

Em um tubo estéril (de 1,5 mL) foram preparadas soluções que continham para cada amostra de RNA: 0,5 µL de RNasin® (inibidor de RNase); 1,0 µL de dNTP; 4 µL de tampão de reação da enzima (“M-MLV Buffer”); 1,0 µL da enzima M-MLV – RT; 1,5 µL de água destilada ultra-pura livre de RNA/DNases; 2,0 µL de Random Primer.

Cada solução deste tipo foi homogeneizada e centrifugada por alguns segundos e 10 µL foram colocados em tubos (de 0,5 mL), que foram posteriormente centrifugados por segundos. De cada amostra de RNA 10 µL foram colocados no respectivo tubo (de 0,5 mL) contendo a solução para a transcrição reversa de RNA em DNA complementar (cDNA). Os tubos contendo a solução e o RNA foram então colocados no termociclador para processamento do programa cDNA MMLV, onde as amostras permaneceram a 37 °C por 60 min, para ocorrer a transcrição reversa do RNA em cDNA, e posteriormente a 65 °C por 10 min para inativação da enzima. Os cDNAs foram armazenados em freezer a -20°C até realização do PCR em tempo real.

3.4.5.4 – PCR quantitativo em tempo real

O PCR em tempo real foi realizado da mesma maneira que com os DNA complementares obtidos das amostras de fígado e também em duplicata.

3.5 – Métodos estatísticos

Os dados obtidos das análises dos níveis séricos de enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) e pesos dos animais foram submetidos à análise estatística, utilizando o programa estatístico Minitab 14 (Minitab Inc., EUA, 2003).

Para os dados de pesos, foi realizada análise estatística descritiva, utilizando medidas estatísticas (média, quartis, valores mínimo e máximo) e gráficos (Conover, 1980; Siegel & Castellan, 2006).

Primeiro, fez-se o teste para verificar se os dados de peso tinham distribuição normal e, posteriormente, decidiu-se se seria usado um teste paramétrico ou não-paramétrico para comparar o peso entre os Grupos. Embora as amostras de pesos de algumas cobaias tenham apresentado distribuição normal, isso não foi verificado em todos os animais. Desta forma, utilizaram os não-paramétricos (Conover, 1980; Siegel & Castellan, 2006).

Para a análise das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT (como em cada dia de eutanásia havia somente uma amostra de sangue de cada Grupo), optou-se por utilizar testes não-paramétricos (Conover, 1980; Siegel & Castellan, 2006).

Em relação aos testes não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar as respostas com um fator e o teste de Friedman para comparar as respostas com dois fatores, ambos com nível de significância de 0,05 (Conover, 1980; Siegel & Castellan, 2006).

4. RESULTADOS

4.1 – Observações clínicas

Nenhum animal inoculado com os vírus (Grupos 1 e 2) apresentou manifestações clínicas durante o experimento. Deve-se ressaltar que não foram, também, registradas alterações clínicas nos animais controles.

Nos dias em que ocorreu redução do peso corporal foi possível constatar diminuição da quantidade de ração consumida, mas não o consumo de água. Nesses casos, os animais recuperaram peso nos dias seguintes.

4.2 – Peso corporal dos animais

As cobaias foram pesadas em 23 intervalos, nos dias -2; -1; 0; 7; 14; 17; 19; 21; 24; 26; 28; 31; 33; 35; 38; 40; 42; 45; 47; 49; 52; 54; e 56 do experimento. Visualiza-se a distribuição por Grupo nos gráficos lineares (Figuras 4.1 a, b e c), construídos pelo programa computadorizado GraphPad Prism v.4.0 (GraphPad Software Inc., EUA, 2003).

A média do peso inicial foi de 213,5 g no Grupo 1; 206,1 g no Grupo 2 e 209,5 g no Grupo 3. Os grupos apresentaram-se homogêneos quanto ao peso no início do experimento e ganho de peso ao longo do seguimento.

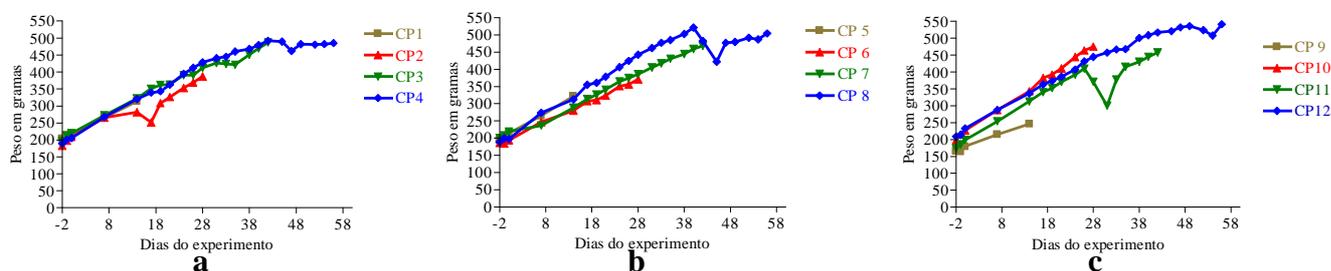


Figura 4.1 – Distribuição dos pesos das cobaias dos 3 Grupos do dia -2 ao 56 do experimento
a) Grupo 1 – cobaias inoculadas com vírus da hepatite A cepa HAF-203 selvagem (wt)
b) Grupo 2 – cobaias inoculadas com vírus da hepatite A cepa HAF-203 adaptada em células FRhK-4
c) Grupo 3 – cobaias inoculadas com meio 199

Na Figura 4.2, os pesos do dia 0 ao dia 56 do experimento para cada Grupo experimental estão apresentados graficamente em “bloxpots” construídos pelo programa estatístico Minitab 14 (Minitab Inc., EUA, 2003). O gráfico ilustra as caixas muito parecidas e próximas mas, embora a caixa do Grupo 2 pareça um pouco maior do que as outras, estas diferenças entre os pesos medianos de cada Grupo não se mostram significativas. Para confirmar essa hipótese, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, visto que as amostras não têm distribuição normal. Obteve-se o valor de $p = 0,541$, ou seja, o valor-p não foi $<0,05$, confirmando que não existe diferença significativa entre os grupos em relação aos pesos.

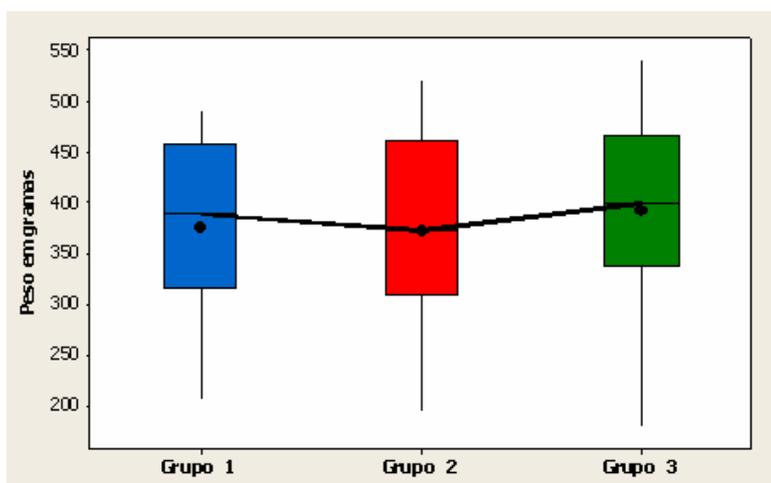


Figura 4.2 – Gráfico boxplot de pesos das cobaias por Grupo experimental durante período de infecção pelo HAV do dia 0 ao dia 56 p.i.

A Figura 4.3 apresenta os pesos para cada grupo experimental dos animais observados até os dias 14, 28, 42 e 56 do experimento. Observa-se que o peso mediano aumenta com o aumento do número de dias em que o animal é observado, como esperado; que no Grupo 1 houve um valor atípico (valor mínimo de 219,2 g) para o animal observado até 42 dias (representado pelo asterisco da Figura 4.3); e que os animais do Grupo 3 parecem apresentar até o dia 14 e 28 do experimento pesos bem discrepantes dos outros animais.

Para verificar se essas evidências têm significância estatística, realizou-se o teste de Friedman, onde são considerados dois fatores, o grupo e os intervalos de dias. O teste não confirmou essas evidências, pois o valor de p foi igual a 1,0, ou seja, maior que o nível de significância escolhido (0,05).

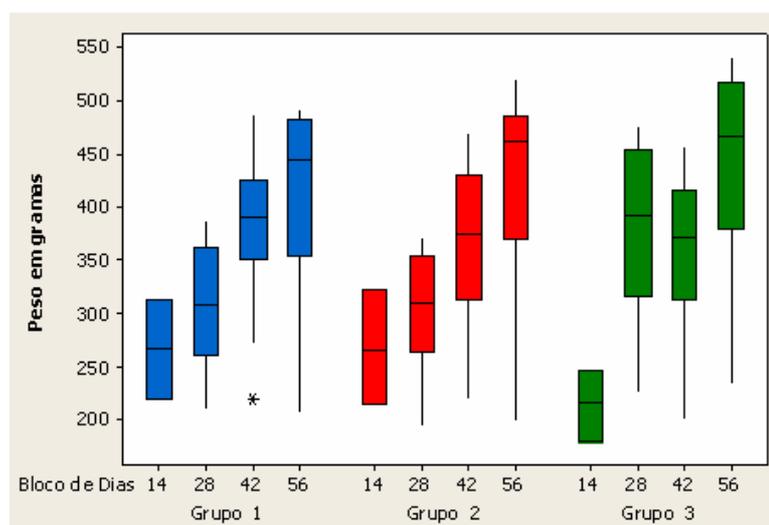


Figura 4.3 – Gráfico boxplot de pesos das cobaias considerando o Grupo experimental e os intervalos de dias (14, 28, 42 e 56) durante período de infecção pelo HAV

* valor atípico (mínimo de 219,2 g) para o animal observado até 42 dias do Grupo 1

4.3 – Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos totais anti-

HAV

Os resultados da sorologia (ELISA) para detecção de anticorpos totais anti-HAV estão sumarizados nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 - Resultados do teste de ELISA para detecção de anticorpos totais anti-HAV em amostras de soro de cobaias colhidas antes da inoculação

Resultado	Número das cobaias
Negativo	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12
Positivo	5

Tabela 4.2 - Resultados do teste de ELISA para detecção de anticorpos totais anti-HAV em amostras de soro de cobaias colhidas após a inoculação

Resultado	Número das cobaias		
	Grupo 1 – HAV cepa HAF-203 wt	Grupo 2 – HAV cepa HAF-203 adaptada em células FRhK-4	Grupo 3 – meio 199
Negativo	1 e 3	5, 6, 7 e 8	9, 10, 11 e 12
Positivo	2 e 4*	- ^a	-

^a marcou-se com hífen quando não houve animais com um determinado resultado

*No momento da leitura os dois poços contendo as amostras da cobaia n° 4 estavam incolores, indicando que os soros eram fortemente positivos para a presença de anticorpos totais anti-HAV

4.4 – Níveis séricos das enzimas hepáticas

Os resultados das dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT) nas amostras de soro obtidas antes da inoculação e nos dias da eutanásia estão ilustradas na Figura 4.4 com a utilização do programa computadorizado Graphpad Prism v.4.0 (GraphPad Software Inc., EUA, 2003).

Na análise estatística, como havia somente uma observação para cada combinação de intervalos de dias e de grupo para cada enzima, foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman, para testar se havia diferenças significativas entre as dosagens séricas das enzimas entre os grupos (Conover, 1980; Siegel & Castellan, 2006).

Entretanto, também neste momento não foram observadas diferenças significativas ao nível de 5% para as enzimas abordadas (ALT, AST e GGT) entre os Grupos, pois os valores de p foram acima de 0,05.

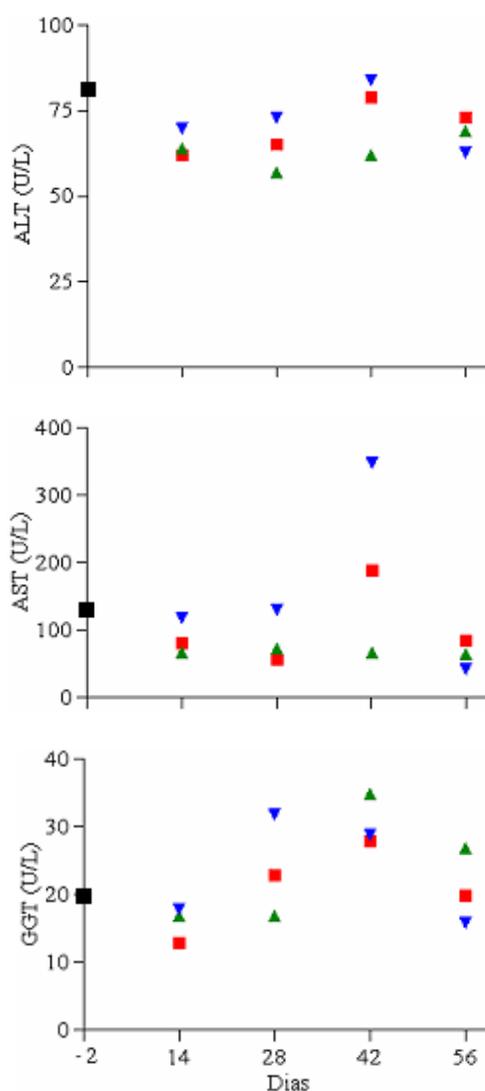


Figura 4.4 – Distribuição dos valores séricos de enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT) das cobaias dos Grupos 1, 2 e 3
■ Grupo 1 - animais inoculados com HAV cepa HAF-203 wt
▲ Grupo 2 - animais inoculados com HAV cepa HAF-203 adaptado em células FRhK-4
▼ Grupo 3 - animais inoculados com meio de cultura 199
■ Média dos valores séricos das enzimas na pré-inoculação

4.5 – PCR quantitativo em tempo real das amostras de tecido hepático e fezes

O método PCR em tempo real, – nas 12 amostras de tecido hepático e em 108 amostras de fezes (analisadas em duplicata) – não detectou a presença de RNA HAV.

Os resultados do PCR em tempo real dos controles negativos e positivos utilizados foram os esperados (dados não apresentados).

Nas três corridas utilizadas (A, B e C), a linearidade das curvas padrões foram verificadas nas diluições de $1,5 \times 10^1$ a $1,5 \times 10^7$ cópias de RNA viral/mL (de Paula et al., 2007), apresentando os coeficientes múltiplos de determinação (R^2) de 0,99 e os coeficientes angulares (slope): - 3,38, - 3,44 e - 3,22 (Figura 4.5).

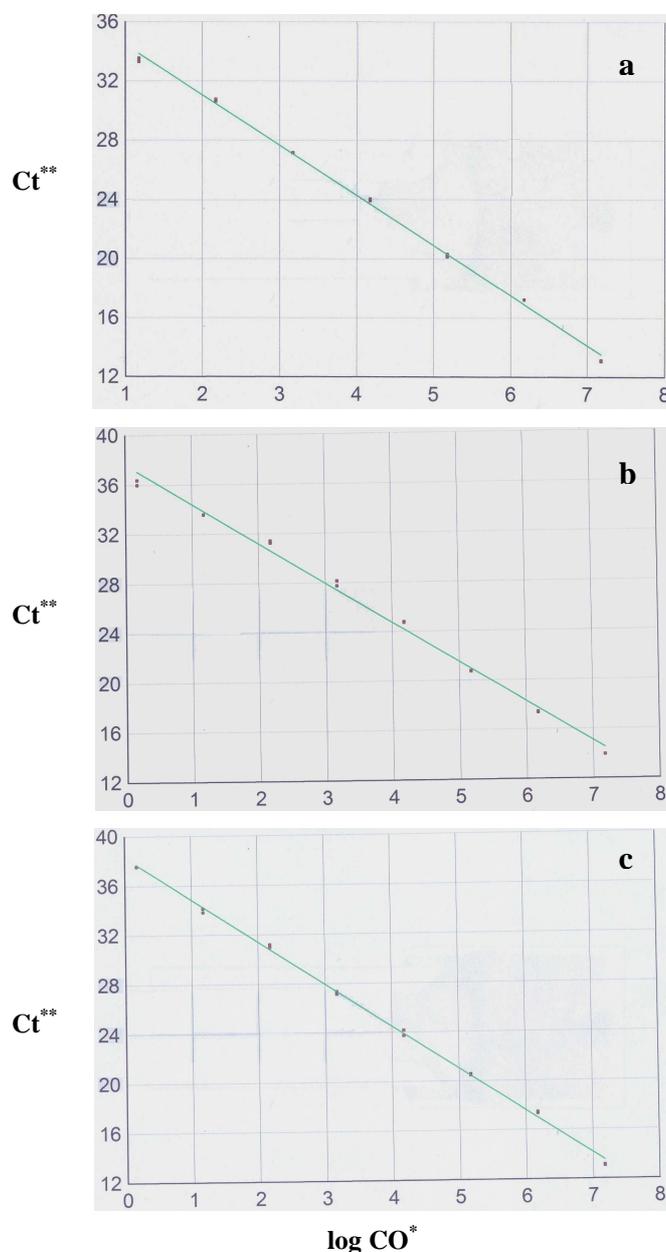


Figura 4.5 – Linearidade das curvas padrões das diluições seriadas do HAV, com ($1,5 \times 10^1$ a $1,5 \times 10^7$ cópias de RNA viral/mL) com R^2 de 0,99 e slope de - 3,38 (a), - 3,22 (b) e - 3,44 (c)

* log CO: número de cópias em escala logarítmica

** Ct: “cycle threshold”

A Figura 4.6 representa as variações de fluorescências normalizadas (Delta Rn) versus os números dos ciclos nas três corridas de PCR realizadas (A, B e C), para as amostras das curvas padrões, controles positivos, controles negativos e amostras não detectadas.

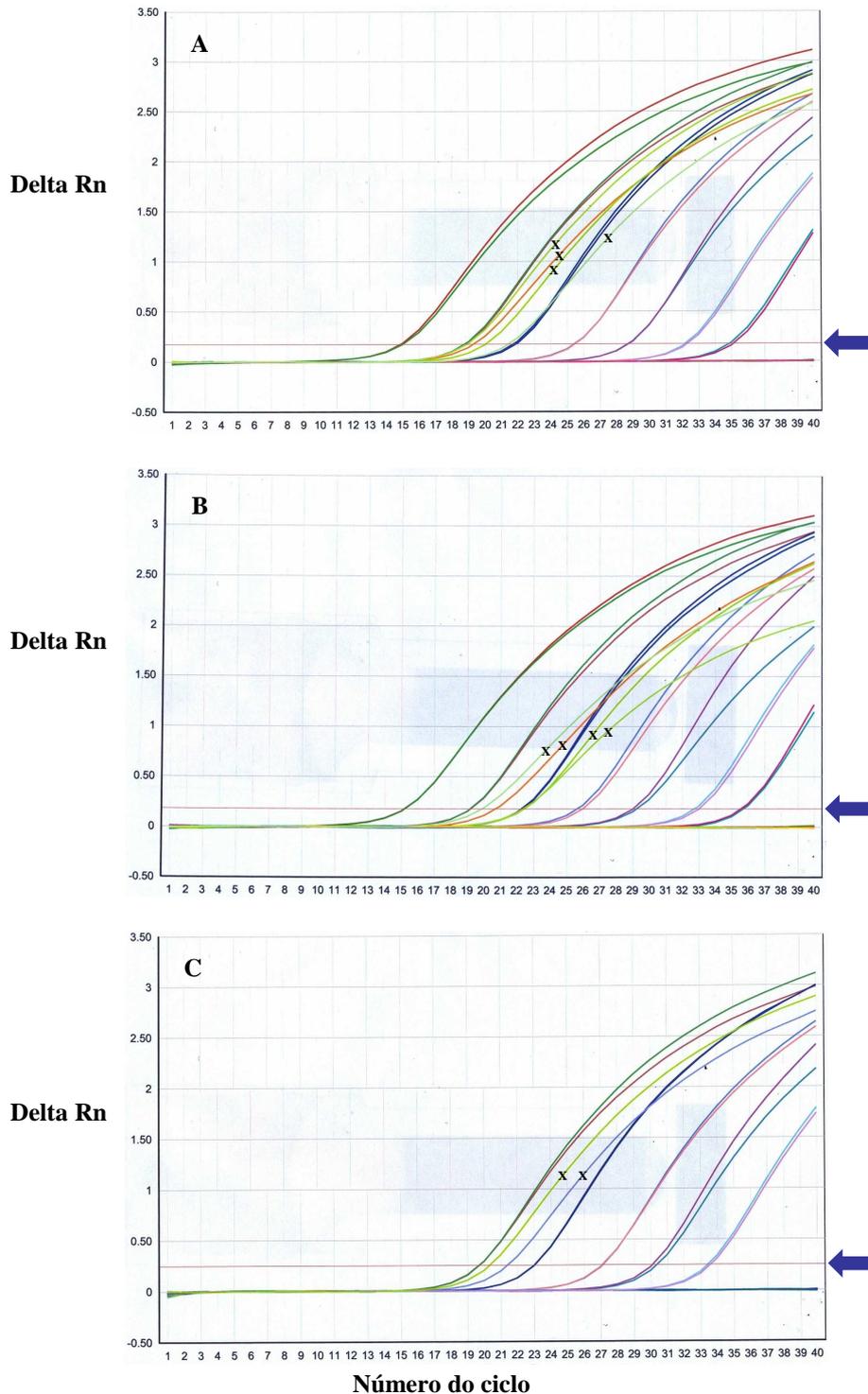


Figura 4.6 – Variação da fluorescência normalizada (Delta Rn) versus número do ciclo para as três corridas de PCR (A, B e C). A seta azul indica o “threshold” (linha de base). Abaixo da seta azul estão as amostras onde não houve detecção do genoma viral e os controles negativos. Acima da seta azul estão os controles positivos (marcados com um x) e as amostras das curvas padrões.

4.6 – Análise histológica

Os animais inoculados com as cepas virais não desenvolveram alterações histológicas sugestivas de hepatite viral. Constatou-se histologia normal do fígado em todos os animais, inoculados e controles (Figura 4.7).

Também não foram observadas alterações morfológicas significativas nos outros órgãos examinados (vesícula biliar, rins, intestinos delgado e grosso).

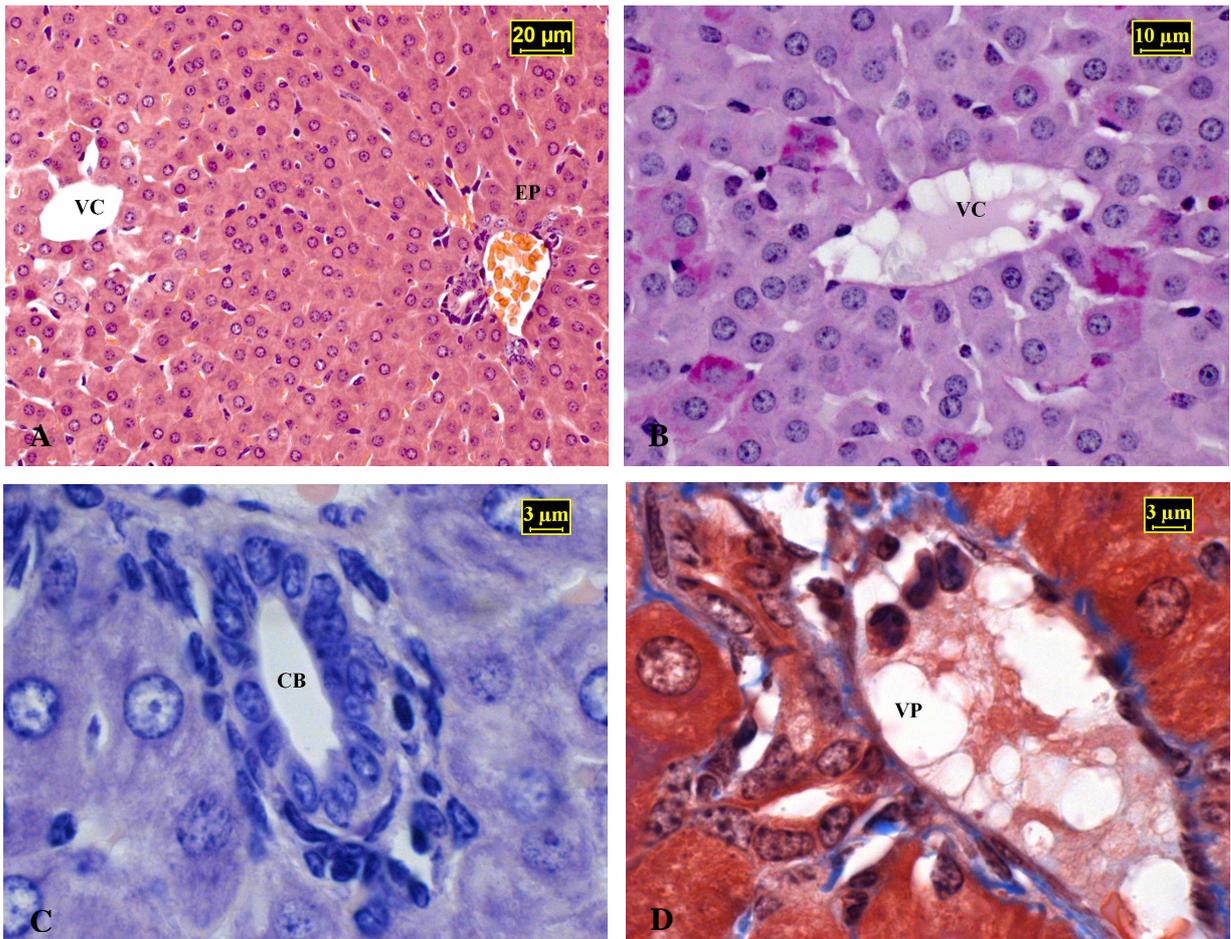


Figura 4.7 - Cobaia nº 4 (56 d.p.i.). Fotomicrografia do fígado

A) Cordões hepatocitários e capilares sinusóides, espaço porta (EP) e veia central (VC). Coloração hematoxilina e eosina, 320x

B) Glicogênio em hepatócitos da zona 3. Coloração ácido periódico de Schiff, 640x

C) Um canalículo biliar (CB) circundado por macrófagos e linfócitos. Coloração Giemsa, 1.200x

D) Ramo da veia porta (VP) envolto por tecido conjuntivo. Coloração tricrômico de Masson, 1.200x

5. DISCUSSÃO

5.1 – Os modelos animais

Hornei e colaboradores (2001) inocularam o vírus da hepatite A em cobaias (*Cavia porcellus*) da linhagem Dunkin-Hartley e os animais apresentaram viremia, antígenos HAV nas fezes e fígado, acompanhados de dano hepatocelular sugestivo de hepatite.

Esse modelo pressupõe substituir ou reduzir o número de primatas não-humanos nos estudos de patogênese e do desenvolvimento de uma vacina nacional contra o HAV.

Obtivemos de um membro do grupo de pesquisa de Gauss-Müller, da Universidade de Lübeck, a informação de que não há razão especial para a susceptibilidade ao HAV da linhagem Dunkin-Hartley (Dotzauer, 2006). No Brasil, entretanto, infelizmente não dispomos da linhagem de *Cavia porcellus* recomendada para estudos de infecção experimental com o HAV. Assim, com o objetivo de avaliar como cobaias (*Cavia porcellus*), linhagem “Fiocruz”, criadas pela Fundação Oswaldo Cruz, responderiam à infecção experimental do vírus da hepatite A, inoculamos, intraperitonealmente, a cepa HAF-203, adaptada ou não a cultura de células FRhK-4.

Neste trabalho, utilizamos o HAV obtido diretamente de paciente infectado (Gaspar et al., 1992b). O inóculo foi quantificado por PCR em tempo real com 10^5 cópias de RNA viral/mL e sua infectividade foi comprovada pela inoculação oral em *Callithrix jacchus* (Pinto et al., 2002a). Considerando-se que o inóculo contendo 10^5 cópias de RNA viral/mL é uma dose infecciosa para primatas não-humanos, ajustamos as concentrações dos dois inóculos utilizados. Para isso diluímos uma amostra do HAV obtido de cultivo celular, quantificada por PCR em tempo real, até a concentração de 10^5 cópias de RNA viral/mL.

Na infecção experimental do HAV, a via preferencial é a endovenosa, comprovadamente mais efetiva que a inoculação oral (Purcell et al., 2002). Todavia, tivemos de optar pela via intraperitoneal (IP) pela dificuldade em se obter um acesso venoso periférico nesta espécie, também em concordância com o protocolo experimental envolvendo cobaias inoculadas com o HAV (Hornei et al., 2001).

5.2 – Avaliação clínica

No acompanhamento diário não foram observadas manifestações clínicas sugestivas de hepatite A. Algumas cobaias, dos três Grupos, apresentaram perda de peso acompanhada de diminuição do consumo de ração, mas com imediata recuperação. Atribuímos essas diferenças às condições individuais não relacionadas diretamente ao inóculo.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos Grupos ao longo do experimento. A ausência de também manifestações clínicas sugestivas de hepatite A foram observadas mesmo nos animais do Grupo 1, inoculados com HAV cepa HAF-203 selvagem e, também, nos animais do Grupo 2, inoculados com o mesmo vírus adaptado a cultura de células FRhK-4. Esses aspectos mencionados são semelhantes aos relatados por Hornei e colaboradores (2001) e ajusta-se às descrições em primatas não-humanos, que geralmente desenvolvem uma infecção subclínica detectada somente por exames laboratoriais (Margolis et al., 1988; Balayan, 1992; Vitral et al., 1998b; Purcell & Emerson, 2001; Pinto et al., 2002a).

5.3 – Avaliação dos níveis séricos das enzimas hepáticas

Partindo-se do princípio que a dosagem de enzimas hepáticas no soro reflete o grau de disfunção hepatocelular, nos animais estudados as enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT), obtidas antes da inoculação e nos dias da eutanásia, não revelaram alteração estatisticamente significativa entre os três Grupos. Esses dados assemelham-se aos descritos por Hornei e colaboradores (2001). Deve-se salientar que os autores visualizaram alterações histológicas no fígado, aos 60 d.p.i., sugestivas de hepatite, sem acompanhar-se de elevação significativa de ALT e AST.

Primatas não-humanos infectados experimentalmente com HAV quase sempre apresentam elevação dessas enzimas (Trahan et al., 1987; Mathiesen et al., 1980; Asher et al., 1995; Vitral et al., 1995; Pinto et al., 2002a; Purcell et al., 2002), com poucos relatos de infecção sem alteração (Baptista et al., 1993; Chitambar et al., 2001). Alguns autores consideram significativos aumentos 3 vezes ou mais, acima do nível máximo permitido das enzimas hepáticas (Karayiannis et al., 1986; Pinto et al., 2002a) e valores de corte situando-se 3 vezes o desvio-padrão (Krawczynski et al., 1981; LeDuc et al., 1983; Asher et al., 1995).

5.4 – Análise histológica

Hornei e colaboradores (2001) descrevem, nas cobaias inoculadas com o HAV, as características histológicas nas amostras de fígado obtidas 60 dias após a inoculação. Observaram-se danos hepatocelulares compatíveis com o diagnóstico de hepatite aguda moderada. Tais alterações hepatocitárias incluem hipertrofia; tumefação; corpúsculos acidofílicos, picnose e multinucleação. Os autores destacam, ainda, infiltrados inflamatórios, em áreas de maior dano hepatocelular, constituídos principalmente por linfócitos seguidos por plasmócitos e macrófagos; hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer e fagócitos circulantes, bem como, necrose focal, multifocal e confluenta.

Estudos morfológicos das hepatites virais são essenciais para caracterizar a infecção, sendo frequentemente descritos nos experimentos com primatas não-humanos (Krawczynski et al., 1981; Karayiannis et al., 1986; Trahan et al., 1987; Baptista et al., 1993; Vitral et al., 1995; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002a).

Infelizmente, no presente estudo, não foram observadas alterações hepáticas sugestivas de infecção pelo HAV. À microscopia óptica, o fígado de todos os animais apresentou aspecto normal. Os demais órgãos pesquisados (vesícula biliar, rins, intestinos delgado e grosso) apresentavam-se sem alterações microscópicas. Os vários autores consultados não realizaram estudo sistemático sobre associação de lesões extrahepáticas. Contudo, Baptista e colaboradores (1997) e Asher e colaboradores (1995) descrevem, apenas, a presença de antígenos de HAV no intestino delgado e grosso, rim, baço e linfonodos mesentéricos.

5.5 – Análise de RNA HAV pelo método de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR em tempo real)

5.5.1 - Nas fezes

Apesar da viremia caracterizar a infecção, optamos por analisar, pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, a presença do genoma de HAV nas fezes, pois, além da carga viral ser maior que no sangue (Hollinger & Emerson, 2001), poderíamos analisar a presença de RNA HAV durante todos os dias do experimento, com maior probabilidade de detectar a presença do antígeno viral mesmo em pequenas quantidades.

Hornei e colaboradores (2001) detectaram RNA HAV em fezes de cobaias entre 14 e 52 dias após a inoculação utilizando duas reações seqüenciais da técnica de RT-PCR (nested RT-PCR). Entretanto, em nossa pesquisa, utilizou-se o PCR quantitativo em tempo real que, embora mais sensível (Villar et al., 2006a), não detectou o RNA HAV nas amostras de fezes coletadas em diferentes intervalos.

Todavia, há de se salientar que Hornei e colaboradores (2001) utilizaram duas variantes da cepa HM-175: a HAV_{BS-C-1}, obtida da cepa HM-175 de HAV adaptada a células BS-C-1 (célula de rim de macaco-verde africano) e a HAV_{GP5} obtida da HAV_{BS-C-1} adaptada à células embrionárias de *Cavia porcellus* (GPE). Acreditamos que o HAV – adaptado às células de cobaia – tornou-se mais virulento para essa espécie. Cabe ressaltar, aqui, que inoculamos a cepa HAF-203 do vírus da hepatite A colhida diretamente de fezes de um paciente infectado e a mesma cepa adaptada em células FRhK-4 (célula de rim de feto de macaco rhesus). Por isso, seriam inóculos menos infecciosos para as cobaias, por não serem oriundos de células embrionárias dessa espécie de roedor.

Apesar dos resultados de infectividade desse trabalho e do trabalho de Hornei e colaboradores (2001) serem diferentes, é importante destacar que as cepas de HAV, HM-175 (utilizada por Hornei e colaboradores) e a cepa HAF-203, utilizada nesse trabalho, apresentam pelo menos 99,5% de homologia segundo Baptista e colaboradores (2006).

Nesse trabalho a persistente ausência da detecção de RNA HAV nas fezes em uma faixa tão ampla de coleta (7 a 56 dias) nos leva a aceitar que a cepa viral de HAV não infecta a cobaia, pois, nos modelos experimentais (primatas não-humanos) que desenvolvem a infecção pelo HAV, sempre ocorre a eliminação de vírus nas fezes (LeDuc et al., 1983; Trahan et al., 1987; Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995; Vitral et al., 1995; Chitambar et al., 2001; Pinto et al., 2002a).

5.5.2 - No fígado

O sítio principal da replicação é o hepatócito, embora vários autores admitam a replicação extra-hepática do HAV (Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995). É no fígado que provavelmente ocorre este processo (Krawczynski et al., 1981; Karayiannis et al., 1986; Cohen et al., 1989; Asher et al., 1995; Vitral et al., 1995; Pinto et al., 2002a), e, por isso, a detecção de RNA HAV no parênquima hepático é o diagnóstico indicativo da infecção.

Assim, após a replicação do HAV no hepatócito ocorre a liberação dos vírus nos canalículos biliares e daí à luz intestinal por onde são eliminados nas fezes (Krawczynski et

al., 1981; Pinto et al., 2002a). Aspectos do mecanismo de replicação e eliminação viral semelhantes são relatados em inoculações experimentais do HAV em *Saguinus mystax* (Krawczynski et al., 1981; Mathiesen et al., 1980), *Callithrix jacchus* (Baptista et al., 1993; Vitral et al., 1995; Pinto et al., 2002a), Chimpanzé (Cohen et al., 1989), *Saguinus labiatus* (Karayiannis et al., 1986) e *Aotus trivirgatus* (Asher et al., 1995).

Também neste trabalho não foi detectada a presença do genoma de HAV (por PCR quantitativo em tempo real) nas fezes e nas amostras de fígado testadas. A interpretação deste padrão sugere que o vírus da hepatite A não foi capaz de infectar e replicar-se nas células hepáticas das cobaias inoculadas.

Todavia, Hornei e colaboradores (2001) descrevem a detecção de RNA HAV (por nested RT-PCR) no fígado de cobaias infectadas com a cepa viral adaptada ou não a células GPE.

Finalmente, a técnica de imunofluorescência, embora extremamente útil para o diagnóstico da infecção pelo HAV nas amostras de fígado (Mathiesen et al., 1978b e 1980; Krawczynski et al., 1981; Karayiannis et al., 1986; Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995; Pinto et al., 2002a), não contribuiu para o esclarecimento da infecciosidade do inóculo.

5.6 - Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos totais anti-HAV

O desenvolvimento de anticorpos anti-HAV foi descrito em cobaias inoculadas com a) uma ou duas doses de protótipo de vacinas não-inativadas (Binn et al., 1986); b) uma a três doses de vacina inativada (Pellegrini et al., 1993); c) três doses de vacina inativada em desenvolvimento (Hep-A-in-vac) (Elbert et al., 1992); d) com três doses da vacina comercial inativada (Havrix®) e e) ainda, a fração 70S correspondendo ao capsídeo do vírus quimérico HAV-gp41 (HAV contendo epítomos da proteína gp41 do HIV) (Kusov et al., 2007).

Hornei e colaboradores (2001) não detectaram a presença de anticorpos nas amostras de sangue coletadas (semanalmente) por 60 dias após a inoculação. Atribuíram, tal fato, à baixa titulação dos inóculos (10^5 TCID₅₀/mL). É possível que a cepa HAV adaptada à cultura de células tenha menor virulência (Cohen et al., 1987; Karron et al., 1988; Tedeschi et al., 1993; Emerson et al., 2002).

Neste estudo, as amostras de soro pós-inoculação foram obtidas na eutanásia. O teste de ELISA competitivo revelou que, entre os animais estudados, apenas as cobaias n° 2 e n° 4 (Grupo 1) apresentaram anticorpos anti-HAV após a inoculação. O resultado do teste de

ELISA da cobaia nº 2, no 28º dia pós-inoculação (d.p.i.) foi 0,63 (DO/“cut-off”) – considerado positivo. Esse achado encontra consonância nos relatos de experimentos com primatas não-humanos que descrevem soroconversão em igual ou menor intervalo (Mathiesen et al., 1978b; LeDuc et al., 1983; Karayiannis et al., 1986; Trahan et al 1987; Karron et al 1988; Cohen et al., 1989; Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995).

O sangue da cobaia nº 4, aos 56 dias depois da inoculação apresentou-se fortemente positivo (0,06 DO/“cut-off”) no ELISA para a presença de anticorpos totais anti-HAV, quando comparado ao resultado aos 28 d.p.i. do animal nº 2 (0,63 DO/“cut-off”), provavelmente por ser mantido mais tempo no experimento.

A análise do soro do animal nº 3 (Grupo 1), morto 42 dias após a inoculação, demonstrou que o HAV selvagem não induziu a produção de anticorpos. Isso pode ter ocorrido por características individuais na susceptibilidade e indução da resposta imunológica entre as cobaias (*Cavia porcellus*) utilizadas, animais não-consanguíneos (“outbred”), que possuem diferenças na constituição genética, o que não ocorre nos animais isogênicos por serem geneticamente idênticos.

O HAV induziu, em cobaias, resposta imune humoral semelhante aos primatas não-humanos inoculados com cepa atenuada do HAV, onde a virulência é diminuída e o animal necessita de um longo período de incubação para induzir a soroconversão (Emerson et al., 2002). É possível, também, que as cobaias respondam fracamente após a inoculação do HAV e, desta maneira, a produção de anticorpos é mais demorada ou mais lenta que aquela observada em primatas experimentalmente inoculados com vírus não-atenuado (LeDuc et al., 1983; Karayiannis et al., 1986; Trahan et al 1987; Karron et al 1988; Cohen et al., 1989; Baptista et al., 1993; Asher et al., 1995).

No tocante ao animal nº 5, o resultado positivo, verificado antes da inoculação, pode ser atribuído à visível hemólise. Essa possibilidade se baseia no fato de que a baixa faixa de peso dos animais no dia das coletas antes da inoculação (165,5 g a 208,7 g) não permitiu a retirada de sangue em quantidades superiores a 1 mL, o que dificulta, após centrifugação, a aspiração do soro sem agitar e romper as hemácias depositadas no fundo do frasco. Isto não ocorreu nas amostras de sangue pós-inoculação, obtidas de coletas por punção cardíaca total, pois eram mais volumosas e os soros aspirados não se misturaram com as hemácias do fundo do frasco.

Isto se comprova, quando observamos, que o único animal positivo para a amostra pré-inoculação (nº 5) apresentou resultado negativo na amostra colhida à eutanásia.

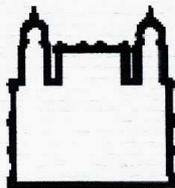
Os resultados apresentados neste trabalho não foram animadores. Não foram evidenciadas alterações clínicas, histológicas, bioquímicas e moleculares capazes de caracterizar a infecção pelo HAV. Julgamos que nosso modelo experimental, as cobaias (*Cavia porcellus*), são inapropriadas para promover a substituição ou diminuição do emprego de primatas não-humanos nos estudos da patogênese e desenvolvimento de vacinas contra o vírus da hepatite A.

Contudo, estudos sempre são fundamentais para o conhecimento da patogênese do HAV e do desenvolvimento de uma vacina nacional para utilização em um programa compulsório de imunização (Clemens et al., 2000; Brasil, 2002; Carrilho et al., 2005). O modelo experimental permanece, assim, imprescindível para este objetivo.

6. CONCLUSÕES

1. No modelo de infecção proposto, a espécie *Cavia porcellus* não demonstra ser adequado para estudos sobre patogênese da hepatite A e sobre eficácia na resposta protetora de vacinas em desenvolvimento contra o vírus da hepatite A.
2. Cobaias (*Cavia porcellus*) da linhagem Fiocruz infectadas experimentalmente via intraperitonal com HAV cepa HAF-203 não evidenciaram replicação do vírus, demonstrada pela ausência de RNA HAV nas fezes e fígado. Também não apresentaram alterações histológicas no fígado e não houve diferença significativa nos níveis séricos de enzimas hepáticas.
3. Não houve diferença significativa nos diversos momentos experimentais entre os animais inoculados e os controles.
4. A única evidência de imunogenicidade foi revelada pelo teste de ELISA, quando se detectaram anticorpos totais anti-HAV aos 28 e 56 dias, em duas cobaias do Grupo 1.
5. Os resultados obtidos não permitem estabelecer conclusões definitivas sobre a utilização de cobaias como modelo experimental da infecção do HAV, porque não foram inoculadas cobaias da linhagem Dunkin Hartley, para uma comparação mais pontual.
6. Além disso, seria absolutamente, inviável a utilização dos mesmos subsídios e/ou parâmetros aplicados na pesquisa de Hornei e colaboradores.

7. ANEXO I



MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Rio de Janeiro, 10 de outubro de 2006.

CARTA Nº 124-06/CEUA-FIOCRUZ

Dr. Marcelo Alves Pinto
Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico
Departamento de Virologia

Referência: **Protocolo P-0257/05**

Prezado Dr. Marcelo,

Temos o prazer de informar-lhe que seu projeto intitulado "**Inovabio: Desenvolvimento de vacina inativada contra vírus da hepatite A**", foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz).

O certificado de licença é encaminhado em anexo.

Obrigado por submeter seu projeto a CEUA-Fiocruz.

Cordialmente,

Dr. Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
Fiocruz

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIP (Advisory Committee on Immunization Practices); Fiore AE, Wasley A, Bell BP. **Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).** MMWR Recomm Rep 2006 May 19; 55 (RR-7): 1-23.

Amado LA, Villar LM, de Paula VS, de Almeida AJ, Gaspar AM. **Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2006a mar; 101 (2): 149-55.

Amado LA. **Detecção e caracterização do vírus da hepatite A em amostras de saliva.** Rio de Janeiro; 2006b. Mestrado [Dissertação em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz.

Andzhaparidze AG, Shevtsov ZV, Korzaia LI, Karetnyi IuV, Balaian MS. **Signs of natural infection with hepatitis A in brown macaques (*Macaca arctoides*).** Vopr Virusol 1987a Sep-Oct; 32 (5): 541-4.

Andzhaparidze AG, Balaian MS, Savinov AP, Kazachkov IuA, Titova IP. **Spontaneous hepatitis similar to hepatitis A in African green monkeys.** Vopr Virusol 1987b Nov-Dec; 32 (6): 681-6.

Andzhaparidze AG, Kazachkov IuA, Balaian MS, Kusov IuIu, Poleshchuk VF. **Hepatitis A in *Macaca fascicularis* and *M. arctoides* infected by the Java monkey-55 strain of hepatitis A virus.** Vopr Virusol 1987c Jul-Aug; 32 (4): 440-8.

Armstrong ME, Giesa PA, Davide JP, Redner F, Waterbury JA, Rhoad AE, et al. **Development of the formalin-inactivated hepatitis A vaccine, VAQTA from the live attenuated virus strain CR326F.** J Hepatol 1993; 18 (Suppl 2): S20-6.

Asher LV, Binn LN, Mensing TL, Marchwicki RH, Vassel RA, Young GD. **Pathogenesis of hepatitis A in orally inoculated owl monkeys (*Aotus trivirgatus*).** J Med Virol 1995 Nov; 47 (3): 260-268.

Avdeeva ZhI, Akol'zina SE, Alpatova NA, Medunitsyn NV. **Effects of cytokines on the immunogenic properties of hepatitis A vaccine.** Vopr Virusol 2005 Mar-Apr; 50 (2): 23-7.

Baba M, Hasegawa H, Nakayabu M, Fukai K, Suzuki S. **Cytolytic activity of natural killer cells and lymphokine activated killer cells against hepatitis A virus infected fibroblasts.** J Clin Lab Immunol 1993; 40 (2): 47-60.

Balayan MS. **Natural hosts of hepatitis A virus.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S27-31.

Baptista ML, Marchevsky RS, Oliveira AV, Yoshida CF, Schatzmayr HG. **Histopathological and immunohistochemical studies of hepatitis A virus infection in marmoset *Callithrix jacchus*.** Exp Toxicol Pathol 1993 Feb; 45 (1): 7-13.

Baptista ML. **Clonagem e sequenciamento nucleotídico completo do vírus da hepatite A, cepa HAF 203, isolado no Brasil.** Rio de Janeiro; 1997. Doutorado [Dissertação em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz.

Baptista ML, Silva M, Lima MA, Yoshida CF, Gaspar AM, Galler R. **Genetic variability of hepatitis A virus strain HAF-203 isolated in Brazil and expression of the VP1 gene in *Escherichia coli*.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Nov; 101 (7): 759-66.

Bell BP, Feinstone SM. Hepatitis A vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA. **Vaccines.** 4. ed. Pennsylvania: WB Saunders; 2004. v.1. p.269-97.

Belova EG, Krylova RI, Lomovskaia IB, Shevtsova ZV. **Comparative morphology of spontaneous hepatitis A in lower Old World monkeys.** Arkh Patol 1991; 53 (10): 28-32.

Binn LN, Bancroft WH, Lemon SM, Marchwicki RH, LeDuc JW, Trahan CJ, et al. **Preparation of a prototype inactivated hepatitis A virus vaccine from infected cell cultures.** J Infect Dis 1986 Apr; 153 (4): 749-56.

Blumer G. **Infectious jaundice in the United States.** JAMA 1923; 81: 353-358.

Boggs JD, Melnick JL, Conrad ME, Felsher BF. **Viral hepatitis: Clinical and tissue culture studies.** JAMA 1970 Nov 9; 214 (6): 1041-6.

Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. **Duration of viremia in hepatitis A virus infection.** J Infect Dis 2000 Jul; 182 (1): 12-7.

Brack K, Berk I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A. **Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA.** J Virol 2002 Dec; 76 (23): 11920-30.

Bradley DW, Maynard JE, Hindman SH, Hornbeck CL, Fields HA, McCaustland KA, et al. **Serodiagnosis of viral hepatitis A: detection of acute-phase immunoglobulin M anti-hepatitis A virus by radioimmunoassay.** J Clin Microbiol 1977 May; 5 (5): 521-30.

Bradley DW, Fields HA, McCaustland KA, Maynard JE, Decker RH, Whittington R, et al. **Serodiagnosis of viral hepatitis A by a modified competitive binding radioimmunoassay for immunoglobulin M anti-hepatitis A virus.** J Clin Microbiol 1979 Jan; 9 (1): 120-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica, volume I, Aids/hepatites virais.** 5. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Imunizações. **Manual dos Centros de Referência para Imunobiológicos Especiais.** 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Burnett MS, Zhu J, Miller JM, Epstein SE. **Effects of hepatitis A vaccination on atherogenesis in a murine model.** J Viral Hepat 2003 Nov; 10 (6): 433-6.

Carrilho FJ, Mendes Clemente C, Silva LC. **Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil.** Gastroenterol Hepatol 2005 Mar; 28 (3): 118-25.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Viral hepatitis A. Educational materials. Hepatitis A slide set. Epidemiology and prevention of viral hepatitis A to E: an overview. **Hepatitis A with notes** [on line]. Atlanta, USA; 2006a. [capturado 03 fev. 2007] Disponível em : http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_a/hep_a2.pdf

CDC - Centers for Disease Control and Prevention [on line]. **Hepatitis Surveillance.** Report No. 61. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2006b September. [capturado 30 de set. 2006]. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/resource/PDFs/hep_surveillance_61.pdf

Chancellor DD, Tyagi S, Bazaco MC, Bacvinskas S, Chancellor MB, Dato VM, et al. **Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination.** J Food Prot 2006 Jun; 69 (6): 1468-72.

Chitambar SD, Joshi MS, Sreenivasan MA, Arankalle VA. **Fecal shedding of hepatitis A virus in Indian patients with hepatitis A and in experimentally infected Rhesus monkey.** Hepatol Res 2001 Mar 26; 19 (3): 237-246.

Chomczynski P, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** Anal Biochem 1987 Apr; 162 (1): 156-9.

Chudy M, Stahl-Hennig C, Berger A, Nubling CM, Hunsmann G, Rabenau HF, et al. **hepatitis A virus infection in tamarins: experimental transmission via contaminated factor VIII concentrates.** J Infect Dis 2002 Apr 15; 185 (8): 1170-3.

Ciocca M. **Clinical course and consequences of hepatitis A infection.** Vaccine 2000 Feb 18; 18 (Suppl 1): S71-4.

Clemens SA, Fonseca JC, Azevedo T, Cavalcanti A, Silveira TR, Castilho MC, et al. **Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop 2000 Jan-Fev; 33 (1): 1-10.

Cockayne EA. **Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver.** Q J Med 1912; 6: 1-28.

Cohen JI, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM, Purcell RH. **Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus.** Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Apr; 84 (8): 2497-501.

Cohen JI, Feinstone SM, Purcell RH. **Hepatitis A virus in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs.** J Infect Dis 1989 Nov; 160 (5): 887-890.

Conover WJ. **Practical nonparametric statistics.** 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1980.

Cook EH Jr, Bradley DW, Gravelle CR, Maynard JE, Maynard JE. **Ultrastructural studies of hepatitis A virus by electron microscopy.** J Virol 1976 Dec; 20 (3): 687-9.

Costa-Mattioli M, Cristina J, Romero H, Perez-Bercof R, Casana D, Colina R, et al. **Molecular evolution of hepatitis A virus: a new classification based on the complete VP1 protein.** J Virol 2002a Sep; 76 (18): 9516-25.

Costa-Mattioli M, Monpoeho S, Nicand E, Aleman MH, Billaudel S, Ferre V. **Quantification and duration of viraemia during hepatitis A infection as determined by real-time RT-PCR.** J Viral Hepat 2002b Mar; 9 (2): 101-6.

Costa-Mattioli M, Di Napoli A, Ferre V, Billaudel S, Perez-Bercof R, Cristina J. **Genetic variability of hepatitis A virus.** J Gen Virol 2003 Dec; 84 (Pt 12): 3191-201.

Coulepis AG, Tannock GA, Locarnini SA, Gust ID. **Evidence that the genome of hepatitis A virus consists of single-stranded RNA.** J Virol 1981 Jan; 37 (1): 473-7.

Daemer RJ, Feinstone SM, Gust ID, Purcell RH. **Propagation of human hepatitis A in African green monkey kidney cell culture; primary isolation and serial passage.** Infect Immun 1981 Apr; 32 (1): 388-93.

de Paula VS, Villar LM, Coimbra Gaspar AM. **Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples.** Braz J Infect Dis 2003 Apr; 7 (2): 135-41.

de Paula VS, Villar LM, Morais LM, Lewis-Ximenes LL, Niel C, Gaspar AM. **Detection of hepatitis A virus RNA in serum during the window period of infection.** J Clin Virol 2004 Apr; 29 (4): 254-9.

de Paula VS, Niel C; Teves SC; Villar LM, Virgolino H, Gaspar AM. **Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Brazilian Amazon.** Hepatology 2006 Sep; 21 (9): 1435-8.

de Paula VS, Mendes-Diniz L, Villar LM, Luz SB, Silva LA, Jesus MS, et al. **Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon basin.** Water Res 2007 Mar; 41 (6): 1169-76.

Deinhardt F, Deinhardt JB. Animal models. In: Gerety RJ. **Hepatitis A.** Orlando: Academic Press; 1984. p.185-204.

D'Hondt E, Purcell RH, Emerson SU, Wong DC, Shapiro M, Govindarajan S. **Efficacy of an inactivated hepatitis A vaccine in pre- and postexposure conditions in marmosets.** J Infect Dis 1995 Mar; 171 (Suppl 1): S40-3.

Dienstag JL, Feinstone SM, Purcell RH, Hoofnagle JH, Barker LF, London WT, et al. **Experimental infection of chimpanzees with hepatitis A virus.** J Infect Dis 1975 Nov; 132 (5): 532-45.

Dienstag JL, Shulman AN, Gerety RJ, Hoofnagle JH, Lorenz DE, Purcell RH, et al. **Hepatitis A antigen isolated from liver and stool: immunologic comparison of antisera prepared in guinea pigs.** J Immunol 1976 Sep; 117 (3): 876-81.

Diwan AH, Stubbs JR, Carnahan GE. **Transmission of hepatitis A via WBC-reduced RBCs and FFP from a single donation.** Transfusion 2003 Apr; 43 (4): 536-40.

Doroshenko NV, Shevtsova ZV, Stakhanova VM, Lapin BA, Lomovskaia IB, Zairov GK, et al. **The sensitivity of rhesus and cynomolgus macaques to the human hepatitis A virus.** Vopr Virusol 1990 Jul-Aug; 35 (4): 299-303.

Dotzauer, A. **HAV guinea pigs.** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <march@bio.fiocriz.br> em 9 de outubro de 2006.

Eble K, Clemens J, Krenc C, Rynning M, Stojak J, Stuckmann J, et al. **Differential diagnosis of acute viral hepatitis using rapid, fully automated immunoassays.** J Med Virol 1991 Mar; 33 (3): 139-50.

Elbert LB, Lisitzina EA, Kusov YY, Balayan MS. **Immunogenicity of inactivated purified tissue culture vaccine against hepatitis A (HepA vac) assessed in laboratory rodents.** Vaccine 1992; 10 (12): 828-32.

Emerson SU, Tsarev SA, Govindarajan S, Shapiro M, Purcell RH. **A simian strain of hepatitis A virus, AGM-27, functions as an attenuated vaccine for chimpanzees.** J Infect Dis 1996 Mar; 173 (3): 592-7.

Emerson SU, Huang YK, Nguyen H, Brockington A, Govindarajan S, St Claire M, et al. **Identification of VP1/2A and 2C as virulence genes of hepatitis A virus and demonstration of genetic instability of 2C.** J Virol 2002 Sep; 76 (17): 8551-9.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. **Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness.** Science 1973; 182: 1026-1028.

Fensterl V, Grotheer D, Berk I, Schlemminger S, Vallbracht A, Dotzauer A. **Hepatitis A virus suppresses RIG-I mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon.** J Virol 2005 Sep; 79 (17): 10968-77.

Ferreira CT, Silveira TR. **Hepatitis virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção.** Rev Bras Epidemiol 2004 dez; 7 (4): 473-487.

Ferreira CT, Silveira TR. **Viral hepatitis prevention by immunization.** J Pediatr (Rio J) 2006 Jul; 82 (3 Suppl): S55-66.

Flehmg B, Haage A, Pfisterer M. **Immunogenicity of a hepatitis A virus vaccine.** J Med Virol 1987 May; 22 (1): 7-16.

Fleischer B, Fleischer S, Maier K, Wiedmann KH, Sacher M, Thaler H, et al. **Clonal analysis of infiltrating T lymphocytes in liver tissue in viral hepatitis A.** Immunology 1990 Jan; 69 (1): 14-9.

Franco E, Giambi C, Ialacci R, Coppola RC, Zanetti AR. **Risk groups for hepatitis A virus infection.** Vaccine 2003 Jun 2; 21 (19-20): 2224-33.

Frosner GG, Deinhardt F, Scheid R, Gauss-Muller V, Holmes N, Messelberger V, et al. **Propagation of human hepatitis A virus in hepatoma cell line.** Infection 1979; 7 (6): 303-305.

Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H, Miki M, et al. **Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A.** Hepatology 1997 Dec; 26 (6): 1634-9.

Gaspar AM, Vitral CL, Marchevsky RS, Yoshida CF, Schatzmayr HG. **A Brazilian hepatitis A virus isolated and adapted in primate and primate cell line as a chance for the development of a vaccine.** Mem Inst Oswaldo Cruz 1992a jul-sep; 87 (3): 449-50.

Gaspar AM, Vitral CL, Yoshida CF, Schatzmayr HG. **Primary isolation of a Brazilian strain of hepatitis A virus (HAF-203) and growth in a primate cell line (FRhK-4).** Braz J Med Biol Res 1992b; 25 (7): 697-705.

Gust ID. **Epidemiological patterns of hepatitis A in different parts of the world.** Vaccine 1992; 10 (Suppl.1): S56-58.

Havens Jr WP. **Infectious hepatitis in middle-east: a clinical review of 200 cases seen in a military hospital.** J Am Med Assoc 1944; 126: 17-23.

Hillis WD. **An outbreak of infectious hepatitis among chimpanzee handlers at a United States Air Force Base.** Am J Hyg 1961 May; 73: 316-28.

Hollinger FB, Bradley DW, Maynard JE, Dreesman GR, Melnick JL. **Detection of hepatitis A viral antigen by radioimmunoassay.** J Immunol 1975 Nov; 115 (5): 1464-6.

Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. **Fields Virology.** 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. v.1. p.799-840.

Holmes AW, Wolfe L, Rosenblate H, Deinhardt F. **Hepatitis in marmosets: induction of disease with coded specimens from a human volunteer study.** Science 1969 Aug; 165 (895): 816-7.

Hornei B, Kammerer R, Moubayed P, Frings W, Gauss-Muller V, Dotzauer A. **Experimental hepatitis A virus infection in guinea pigs.** J Med Virol 2001 Aug; 64 (4): 402-9.

Hunt R. **Hepatitis viruses.** Microbiology and immunology on-line. University of South Carolina. School of medicine [online]. South Carolina, USA; 2007. [capturado 06 fev. 2007] Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus.htm>

Hussain Z, Das BC, Husain SA, Polipalli SK, Ahmed T, Begum N, et al. **Virological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles.** World J Gastroenterol 2006 Aug 7; 12 (29): 4683-8.

Innis BL, Snitbhan R, Kunasol P, Laorakpongse T, Poopatanakool W, Kozik CA, et al. **Protection against hepatitis A by an inactivated vaccine.** JAMA 1994 May 4; 271 (17): 1328-34.

Jacobsen KH, Koopman JS. **Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis.** Epidemiol Infect 2004 Dec; 132 (6): 1005-22.

Jacobsen KH, Koopman JS. **The effects of socioeconomic development on worldwide hepatitis A virus seroprevalence patterns.** Int J Epidemiol 2005 Jun; 34 (3): 600-9.

Jee YM, Go U, Cheon D, Kang Y, Yoon JD, Lee SW, et al. **Detection of hepatitis A virus from clotting factors implicated as a source of HAV infection among haemophilia patients in Korea.** Epidemiol Infect 2006 Feb; 134 (1): 87-93.

Karayiannis P, Jowett T, Enticott M, Moore D, Pignatelli M, Brenes F, et al. **Hepatitis A virus replication in tamarins and host immune response in relation to pathogenesis of liver cell damage.** J Med Virol 1986 Mar; 18 (3): 261-76.

Karetnyi IuV, Andzhaparidze AG, Orlova TM, Balaian MS. **Study of human and simian hepatitis A virus isolated by an immunoenzyme method using polyclonal and monoclonal antibodies.** Vopr Virusol 1989 Jan-Feb; 34 (1): 50-3.

Karpovich LG, Kalashnikova TV, Gorbunov MA, Pavlova LI, Bektimirov TA, Maidaniuk AG, et al. **Comparative study of the immunogenicity of the inactivated hepatitis A vaccine Hep-A-in-vac from experimental and clinical data.** Vopr Virusol 1995 Nov-Dec; 40 (6): 268-70.

Karron RA, Daemer R, Ticehurst J, D'Hondt E, Popper H, Mihalik K, et al. **Studies of prototype live hepatitis A virus vaccines in primate models.** J Infect Dis 1988 Feb; 157 (2): 338-45.

Keenan CM, Lemon SM, LeDuc JW, McNamee GA, Binn LN. **Pathology of hepatitis A infection in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*).** Am J Pathol 1984 Apr; 115 (1): 1-8.

Koff RS. **Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S15-7.

Korzaia LI, Shevtsova ZV, Krylova RI, Belova EG, Dzhelieva ZN, Bystrova TN, et al. **The modelling of hepatitis A in macaques.** Vopr Virusol 1991 Jan-Feb; 36 (1): 13-6.

Korzaia LI, Esvandzhiia NCh, Lomovskaia IB, Krylova RI, Shevtsova ZV. **Experimental models of hepatitis A in macaques using viral strains isolated from man and monkeys.** Mikrobiol Z 1994 Jan-Feb; 56 (1): 22-9.

Krawczynski KK, Bradley DW, Murphy BL, Ebert JW, Anderson TE, Doto IL, et al. **Pathogenetic aspects of hepatitis A virus infection in enterally inoculated marmosets.** Am J Clin Pathol 1981 Nov; 76 (5): 698-706.

Krober MS, Bass JW, Brown JD, Lemon SM, Rupert KJ. **Hospital outbreak of hepatitis A: risk factors for spread.** Pediatr Infect Dis 1984 Jul-Aug; 3 (4): 296-9.

Krugman S, Ward R, Giles JP. **The natural history of infectious hepatitis.** Am J Med 1962 May; 32: 717-728.

Krugman S, Giles JP, Hammond J. **Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection.** JAMA 1967 May 1; 200 (5): 365-73.

Kusov Iulu, El'bert LB, Kazachkov IuA, Val'iano NM, Nel'ga IV, Grishina GK, et al. **The immunogenicity of a cultured inactivated hepatitis A vaccine.** Vopr Virusol 1991 May-Jun; 36 (3): 206-9.

Kusov YY, Zamjatina NA, Poleschuk VF, Michailov MI, Morace G, Eberle J, et al. **Immunogenicity of a chimeric hepatitis A virus (HAV) carrying the HIV gp41 epitope 2F5.** Antiviral Res 2007 Feb; 73 (2): 101-11.

Kwon OS, Byun KS, Yeon JE, Park SH, Kim JS, Kim JH, et al. **Detection of hepatitis A viral RNA in sera of patients with acute hepatitis A.** J Gastroenterol Hepatol 2000 Sep; 15 (9): 1043-7.

Lankas GR, Jensen RD. **Evidence for hepatitis A infection in immature rhesus monkeys.** Vet Pathol 1987 Jul; 24 (4): 340-4.

Lay LdeLAR, Diaz OL, Casanueva RM, Moreno AG. **Anti-hepatitis A virus immunoglobulin M antibodies in urine samples for rapid diagnosis of outbreaks.** Clin Diagn Lab Immunol 2003 May; 10 (3): 492-4.

LeDuc JW, Escajadillo A, Lemon SM. **Hepatitis A virus among captive Panamanian owl monkeys.** Lancet 1981 Dec 19-26; 2 (8260-61): 1427-8.

LeDuc JW, Lemon SM, Keenan CM, Graham RR, Marchwicki RH, Binn LN. **Experimental infection of the New World owl monkey (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus.** Infect Immun 1983 May; 40 (2): 766-72.

Lemon SM, Leduc JW, Binn LN, Escajadillo A, Ishak KG. **Transmission of hepatitis A virus among recently captured panamanian owl monkeys.** J Med Virol 1982; 10 (1): 25-36.

Lemon SM, Binn LN. **Antigenic relatedness of two strains of hepatitis A virus determined by cross-neutralization .** Infect Immun 1983a Oct; 42 (1): 418-20.

Lemon SM, Binn LN. **Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus.** J Infect Dis 1983b Dec; 148 (6): 1033-9.

Lemon SM, Jansen RW, Brown EA. **Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S40-4.

Lemon SM. **The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products.** Vox Sang 1994a; 67 (Suppl 4): 19-23.

Lemon SM, Murphy PC, Smith A, Zou J, Hammon J, Robinson S, et al. **Removal/neutralization of hepatitis A virus during manufacture of high purity, solvent/detergent factor VIII concentrate.** J Med Virol 1994b May; 43 (1): 44-9.

Liu J, SuY, Dai C, Guo R. **Expressing poliovirus (type I) and hepatitis A virus antigens by recombinant vaccinia virus.** Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 1996 Jun; 18 (3): 209-13.

Luna LG. **Manual of histologic stainig methods of the Armed Forces Institute of Pathology.** 3. ed. New York: McGraw-Hill; 1968.

MacCallum FO, Bradley WH. **Transmission of infective hepatitis to human volunteers.** Lancet 1944; 2: 228-232.

MacCallum FO. **Homologous serum jaundice.** Lancet 1947; 2: 691-692.

Mackiewicz V, Dussaix E, Lê Petitcorps MF, Roque-Afonso AM. **Detection of hepatitis A virus RNA in saliva.** J Clin Microbiol 2004 Sep; 42 (9): 4329-31.

Maier K, Gabriel P, Koscielniak E, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, et al. **Human gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes sensitized during hepatitis A virus infection.** J Virol 1988 Oct; 62 (10): 3756-63.

Mao JS, Go YY, Huang HY, Yu PH, Huang BZ, Ding ZS, et al. **Susceptibility of monkeys to human hepatitis A virus.** J Infect Dis 1981 Jul; 144 (1): 55-60.

Mao JS, Dong DX, Zhang HY, Chen NL, Zhang XY, Huang HY, et al. **Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H2 strain) in humans.** J Infect Dis 1989 Apr; 159 (4): 621-4.

Mao JS, Chai SA, Xie RY, Chen NL, Jiang Q, Zhu XZ, et al. **Further evaluation of the safety and protective efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) in humans.** Vaccine 1997 Jun; 15 (9): 944-7.

Margolis HS, Nainan OV, Krawczynski K, Bradley DW, Ebert JW, Spelbring J, et al. **Appearance of immune complexes during experimental hepatitis A infection in chimpanzees.** J Med Virol 1988 Nov; 26 (3): 315-26.

Martin A, Lemon SM. **Hepatitis A virus: from discovery to vaccines.** Hepatology 2006 Feb; 43 (2 Suppl 1): S164-72.

Mascoli CC, Ittensohn OL, Villarejos VM, Arguedas JA, Provost PJ, Hilleman MR. **Recovery of hepatitis agents in the marmosets from human cases occurring in Costa Rica.** Proc Soc Exp Biol Med 1973 Jan; 142 (1): 276-82.

Mathiesen LR, Feinstone SM, Purcell RH, Wagner JA. **Detection of hepatitis A antigen by immunofluorescence.** Infect Immun 1977 Nov; 18 (2): 524-30.

Mathiesen LR, Feinstone SM, Wong DC, Skinhoej P, Purcell RH. **Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A antigen in stool and antibody to hepatitis A antigen in sera: comparison with solid-phase radioimmunoassay, immune electron microscopy, and immune adherence hemagglutination assay.** J Clin Microbiol 1978a Feb; 7 (2): 184-93.

Mathiesen LR, Drucker J, Lorenz D, Wagner JA, Gerety RJ, Purcell RH. **Localization of hepatitis A antigen in marmosets organs during acute infection with hepatitis A virus.** J Infect Dis 1978b Sep; 138 (3): 369-77.

Mathiesen LR, Moller AM, Purcell RH, London WT, Feinstone SM. **Hepatitis A virus in the liver and intestine of marmosets after oral inoculation.** Infect Immun 1980 Apr; 28 (1): 45-48.

Melnick JL. **History and epidemiology of hepatitis A virus.** J Infect Dis 1995 Mar; 171 (Suppl1): S2-8.

Midthun K, Ellerbeck E, Gershman K, Calandra G, Krah D, McCaughtry, et al. **Safety and immunogenicity of a live attenuated hepatitis A virus vaccine in seronegative volunteers.** J Infect Dis 1991 Apr; 163 (4): 735-9.

Miller MJ. **Viral taxonomy.** Clin Infect Dis 1997 Jul; 25 (1): 18-20.

Mitchell LA, Galun E. **Rectal immunization of mice with hepatitis A vaccine induces stronger systemic and local immune responses than parenteral immunization.** Vaccine 2003 Mar 28; 21 (13-14): 1527-38.

Mitchell LA, Joseph A, Kedar E, Barenholz Y, Galun E. **Mucosal immunization against hepatitis A: antibody responses are enhanced by co-administration of synthetic oligodeoxynucleotides and a novel cationic lipid.** Vaccine 2006 Jun 19; 24 (25): 5300-10.

Morais LM, de Paula VS, Arantes MR, Oliveira ML, Gaspar AM. **Early infection and asymptomatic spread of hepatitis A virus in a public child care center in Rio de Janeiro, Brazil: should attending children under two years of age be vaccinated?** Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Jun; 101 (4): 401-5.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Viral hepatitis: Report of a WHO scientific group.** World Health Organ Tech Rep Ser 1973; 512: 1-52.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Hepatitis A vaccines.** Wkly Epidemiol Rec [online]. 2000 Feb [capturado 27 de set. 2006]; 75 (5): 37-44. Disponível em: <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2000/wer7505.pdf>

Parry JV, Mortimer PP. **The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a simple tissue culture method.** J Med Virol 1984; 14 (3): 277-83.

Peetermans J. **Production, quality control and characterization of an inactivated hepatitis A vaccine.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S99-101.

Pellegrini V, Fineschi N, Matteucci G, Marsili I, Nencioni L, Puddu M, et al. **Preparation and immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine.** Vaccine 1993; 11 (3): 383-7.

Pereira FEL, Gonçalves CS. **Hepatite A**. Rev Soc Bras Med Trop 2003 mai-jun; 36 (3): 387-400.

Pinto MA, Marchevsky RS, Pelajo-Machado M, Santiago MA, Pissurno JW, Franca MS, et al. **Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in liver and splenic T lymphocyte rise are associated with liver histological damage during experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus***. Exp Toxicol Pathol 2000 Mar; 52 (1): 3-10.

Pinto MA, Marchevsky RS, Baptista ML, de Lima MA, Pelajo-Machado M, Vitral CL, et al. **Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: Early detection of HAV antigen and viral fate**. Exp Toxic Pathol 2002a Feb; 53 (6): 413-420.

Pinto MA, Marshevsky RS, Pelajo-Machado M, Pissurno JW, França MS, Motta EM, et al. **Induction of nuclear factor-kB and pro-inflammatory cytokines in liver during experimental hepatitis A virus infection in *Callithrix jacchus***. 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; 2000 Apr 9-13; Atlanta, USA. Atlanta: International Medical Press; 2002b. v.1. p.34-40.

Polotsky YE, Vassell RA, Binn LN, Asher LV. **Immunohistochemical detection of cytokines in tissues of Aotus monkeys infected with hepatitis A virus**. Ann N Y Acad Sci 1994 Aug 15; 730: 318-21.

Poovorawan Y, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Chutsirimongkol S, Tangkijvanich P. **Clinical features and molecular characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in Thailand**. J Clin Virol 2005 Jan; 32 (1): 24-8.

Prevot S, Marechal J, Pillot J, Prevot J. **Relapsing hepatitis A in Saimiri monkeys experimentally reinfected with a wild type hepatitis A virus (HAV)**. Arch Virol 1992; 4 (Suppl): 5-10.

Provost PJ, Ittensohn OL, Villarejos VM, Hilleman MR. **A specific complement-fixation test for human hepatitis A employing CR 326 virus antigen. Diagnosis and epidemiology**. Proc Soc Exp Biol Med 1975 Apr; 148 (4): 962-9.

Provost PJ, Hilleman MR. **Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro**. Proc Soc Exp Biol Med 1979 Feb; 160 (2): 213-21.

Provost PJ, Hughes JV, Miller WJ, Giesa PA, Banker FS, Emini EA. **An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin**. J Med Virol 1986 May; 19 (1): 23-31.

Purcell RH, Wong DC, Moritsugu Y, Dienstag JL, Routenberg JA, Boggs JD. **A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody.** J Immunol 1976 Feb; 116 (2): 349-56.

Purcell RH, D'Hondt E, Bradbury R, Emerson SU, Govindarajan S, Binn L. **Inactivated hepatitis A vaccine: active and passive immunoprophylaxis in chimpanzees.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S148-51.

Purcell RH, Emerson SU. **Animal models of hepatitis A and E.** ILAR J 2001; 42 (2): 161-77.

Purcell RH, Wong DC, Shapiro M. **Relative infectivity of hepatitis A virus by the oral and intravenous routes in 2 species of nonhuman primates.** J Infect Dis 2002 Jun 1; 185 (11): 1668-71.

Reitman S, Frankel S. **A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases.** Am J Clin Pathol 1957 Jul; 28 (1): 56-63.

Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V, et al. **Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection.** Hepatology 2003 Sep; 38 (3): 613-8.

Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, et al. **Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions.** J Gen Virol 1992 Jun; 73 (Pt 6): 1365-77.

Rodrigues DP, Lázaro NS, Reis EMF. **Manual de procedimentos para o diagnóstico laboratorial de *Salmonella spp.*** Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas – LRNCEB/Laboratório de Enterobactérias – LABENT. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2006.

Rowe N. **The pictorial guide to the living primates.** Charlestown: Pogonias Press; 1996.

Schiff ER. **Atypical clinical manifestations of hepatitis A.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S18-20.

Scholz E, Heinricy U, Flehmig B. **Acid stability of hepatitis A virus.** J Gen Virol 1989 Sep; 70 (Pt 9): 2481-5.

Schulman NA, Dienstag JL, Jackson DR, Hoofnagle JH, Gerety RJ, Purcell RH, et al. **Hepatitis A antigen in liver, bile, and stool of chimpanzees.** J Infect Dis 1976 Jul; 134 (1): 80-4.

Shevtsova ZV, Krylova RI, Belova EG, Korzaia LI, Andzhaparidze AG. **Spontaneous hepatitis A with a fatal outcome in rhesus monkeys.** Vopr Virusol 1987 Nov-Dec; 32 (6): 686-90.

Shevtsova ZV, Lapin BA, Doroshenko NV, Krilova RI, Korzaja LI, Lomovskaya IB, et al. **Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys.** J Med Primatol 1988; 17 (4): 177-94.

Shevtsova ZV, Krylova RI, Doroshenko NV, Lomovskaia IB, Belova EG, Zairov GK, et al. **Experimental model of hepatitis A in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) infected with human hepatitis A virus.** Biull Eksp Biol Med 1990 Jun; 109 (6): 536-9.

Shevtsova ZV, Krylova RI, Lapin BA, Lomovskaia IB, Doroshenko NV, Belova EG. **The chronic course of spontaneous and experimental hepatitis A in rhesus monkeys with viral persistence.** Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1991 Jun; (6): 68-73.

Shevtsova ZV, Lomovskaia IB, Lapin BA, Esvandzhiia NCh, D'iachenko AG. **Virus persistence in hepatitis A in monkeys.** Vopr Virusol 1992 May-Jun; 37 (3): 138-41.

Siegel S, Castellan Jr NJ. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento.** 2. ed. São Paulo: Artmed; 2006.

Sjogren MH, Hoke CH, Binn LN, Eckels KH, Dubois DR, Lyde L, et al. **Immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine.** Ann Intern Med 1991 Mar 15; 114 (6): 470-1.

Slighter RG, Kimball JP, Barbolt TA, Sherer AD, Drobeck HP. **Enzootic hepatitis A infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*).** Am J Primatol 1988; 14 (1): 73-81.

Smerdova MA, Usova SV, Isaeva AF, Kutina SN, Netesov SV, Maidaniuk AG, et al. **Safety research of a vaccine preparation in hepatitis A derived from the MB-7 rapidly growing strain.** Vopr Virusol 2004 Sep-Oct; 49 (5): 46-8.

Stapleton JT. **Passive immunization against hepatitis A.** Vaccine 1992; 10 (Suppl 1): S45-7.

Tanaka J. **Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America.** Vaccine 2000 Feb 18; 18 (Suppl 1): S57-60.

Tedeschi V, Purcell RH, Emerson SU. **Partial characterization of hepatitis A viruses from three intermediate passage levels of a series resulting in adaptation to growth in cell culture and attenuation of virulence.** J Med Virol 1993 Jan; 39 (1): 16-22.

Terril LA, Clemons DJ. **The laboratory guinea pig.** Florida: CRC Press; 1997. p.19.

Trahan CJ, LeDuc JW, Staley EC, Binn LN, Marchwicki RH, Lemon SM, et al. **Induced oral infection of the owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) with hepatitis A virus.** Lab Anim Sci 1987 Feb; 37 (1): 45-50.

Vallbracht A, Hofmann L, Wurster KG, Flehmig B. **Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus.** J Gen Virol 1984 Mar; 65 (Pt 3): 609-15.

Vallbracht A, Gabriel P, Zahn J, Flehmig B. **Hepatitis A virus infection and the interferon system.** J Infect Dis 1985 Jul; 152 (1): 211-3.

Vallbracht A, Maier K, Stierhof YD, Wiedmann KH, Flehmig B, Fleischer B. **Liver-derived cytotoxic T cells in hepatitis A virus infection.** J Infect Dis 1989 Aug; 160 (2): 209-17.

Van Damme P, Thoelen S, Cramm M, De Groote K, Safary A, Meheus A. **Inactivated hepatitis A vaccine: reactogenicity, immunogenicity, and long-term antibody persistence.** J Med Virol 1994 Dec; 44 (4): 446-51.

Van Damme P, Banatvala J, Fay O, Iwarson S, McMahon B, Van Herck K, et al. **Hepatitis A booster vaccination: is there a need?** Lancet 2003 Sep 27; 362 (9389): 1065-71.

van Hattum J, Chen XQ. **Hepatitis A: infection, detection, vaccination and immunity.** Neth J Med 1999 Sep; 55 (3): 142-50.

Villar LM, Esteves da Costa Mdo C, de Paula VS, Gaspar AM. **Hepatitis a outbreak in a public school in Rio de Janeiro, Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2002 Apr; 97 (3): 301-5.

Villar LM, Lampe E, Meyer A, Gaspar AM. **Genetic variability of hepatitis A virus isolates in Rio de Janeiro: implications for the vaccination of school children.** Braz J Med Biol Res 2004 Dec; 37 (12): 1779-87.

Villar LM, de Paula VS, Diniz-Mendes L, Lampe E, Gaspar AM. **Evaluation of methods used to concentrate and detect hepatitis A virus in water samples.** J Virol Methods 2006^a Nov; 137 (2):169-76.

Villar LM, Morais LM, Aloise R, Melo MM, Calado IA, Lampe E, et al. **Co-circulation of genotypes IA and IB of hepatitis A virus in Northeast Brazil.** Braz J Med Biol Res 2006b Jul; 39 (7): 873-81.

Vitral CL, Marchevsky RS, Yoshida CF, Coelho JM, Gaspar AM, Schatzmayr HG. **Intragastric infection induced in marmosets (*Callithrix jacchus*) by a Brazilian hepatitis A virus (HAF-203).** Braz J Med Biol Res 1995 Mar; 28 (3): 313-21.

Vitral CL, Yoshida CF, Lemos ER, Teixeira CS, Gaspar AM. **Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A in children and adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of prevalence to environmental factors.** Mem Ins Oswaldo Cruz 1998a Jan-Feb; 93 (1): 1-5.

Vitral CL, Yoshida CF, Gaspar AM. **The use of non-human primates as animal models for the study of hepatitis viruses.** Braz J Med Biol Res 1998b Aug; 31 (8): 1035-48.

Vitral CL, Gaspar AM, Souto FJ. **Epidemiological pattern and mortality rates for hepatitis A in Brazil, 1980-2002--a review.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2006 Mar; 101 (2): 119-27.

Voegt H. **Zur aetiologie der hepatitis epidemica.** MMW Munch Med Wochenschr 1942; 89: 76-79.

Wang XY, Xu Z, Yao X, Tian M, Zhou L, He L, et al. **Immune responses of anti-HAV in children vaccinated with live attenuated and inactivated hepatitis A vaccines.** Vaccine 2004 May 7; 22 (15-16): 1941-5.

Warren KS, Niphuis H, Heriyanto, Verschoor EJ, Swan RA, Heeney JL. **Seroprevalence of specific viral infections in confiscated orangutans (*Pongo pygmaeus*).** J Med Primatol 1998 Feb; 27 (1): 33-7.

Wells R, Fisher D, Fenaughty A, Cagle H, Jaffe A. **Hepatitis A prevalence among injection drug users.** Clin Lab Sci 2006 Winter; 19 (1): 12-7.

Widell A, Hansson BG, Moestrup T, Nordenfelt E. **Increased occurrence of hepatitis A with cyclic outbreaks among drug addicts in a Swedish community.** Infection 1983 Jul-Aug; 11 (4): 198-200.

Winokur PL, Stapleton JT. **Immunoglobulin prophylaxis for hepatitis A.** Clin Infect Dis 1992 Feb; 14 (2): 580-6.

Yesilkaya A, Demir G, Memikoglu KO, Cokca F, Sozen TH. **Prolonged hepatitis A: three case reports.** Mikrobiol Bul 2003 Oct; 37 (4): 301-7.

Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, et al. **Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction.** Hepatology 1996 Jul; 24 (1): 10-3.

Zhuang FC, Qian W, Mao ZA, Gong YP, Jiang Q, Jiang LM, et al. **Persistence efficacy of live attenuated hepatitis A vaccine (H2-strain) after a mass vaccination program.** Chin Med J 2005 Nov 20; 118 (22): 1851-6.