

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ALEXANDRE GOMES VIZZONI

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL
DE INDIVÍDUOS COINFECTADOS PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO PARA CÉLULAS T HUMANAS (HTLV-1) E
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)

Rio de Janeiro

2010

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL DE
INDIVÍDUOS COINFECTADOS PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO PARA CÉLULAS T HUMANAS (HTLV-1) E
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)

ALEXANDRE GOMES VIZZONI

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Doenças Infecciosas, sob a orientação da Prof. Dra. Ana Claudia Celestino. B. Leite e da Dra. Maria José de Andrada-Serpa

Rio de Janeiro

2010

ALEXANDRE GOMES VIZZONI

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA E LABORATORIAL DE
INDIVÍDUOS COINFECTADOS PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO PARA CÉLULAS T HUMANAS (HTLV-1) E
VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Doenças Infecciosas.

Orientadores: Prof^ª. Dra. Ana Claudia Celestino. B. Leite e da Dra. Maria José de Andrada-Serpa

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo
Doutora em Medicina
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC

Prof. Dr. Marco Antonio Sales Dantas de Lima
Doutor em Clínica Médica
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC

Prof. Dr. Adilson José de Almeida
Doutor em Ciências
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Este trabalho é dedicado a minha esposa e ao meu filho, fonte de inspiração constante, pela força nos momentos difíceis que permearam este trabalho.

AGRADECIMENTOS

As minhas orientadoras, Prof^ª. Dr^ª. Ana Claudia Celestino Bezerra Leite e Prof^ª. Dr^ª. Maria José de Andrada-Serpa, pelo exemplo de profissionalismo, ética e dedicação. Por terem respeitado meus limites e minhas dificuldades, permitindo uma trajetória séria e serena para o meu crescimento profissional em múltiplas direções.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Clara Gutierrez Galhardo, por sua participação nos seminários científicos, contribuindo com sábias avaliações e sugestões, as quais foram totalmente acatadas.

Ao Prof. Dr. Adilson José de Almeida, pela valiosa revisão dessa dissertação, pelo apoio na coleta de dados e disponibilidade em compartilhar informações dos pacientes. Por seus ensinamentos e incentivo constante.

Ao Prof. Paulo Marcelo Tenório Cotias, que acreditou no meu potencial e incentivou continuamente a concretização desta jornada.

A Prof^ª. Raquel de Vasconcellos Carvalhães de Oliveira pela importante colaboração na análise estatística.

Ao Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC/FIOCRUZ, pelo apoio nas consultas clínicas dos pacientes e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido.

Ao Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC/FIOCRUZ, pela oportunidade de aprendizado. Em especial, ao Otávio de Mello Espíndola, pelos ensinamentos e importante auxílio na realização dos testes de biologia molecular para diagnóstico de infecção pelo vírus HTLV-1 e imunofenotipagem dos linfócitos T.

Ao Laboratório de Referência Nacional em Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ, pelo acolhimento e oportunidade de realização das técnicas moleculares para o vírus da hepatite C. Em especial, a Vanessa Alves e Lucy Dalva, pela disponibilidade em ensinar e auxiliar na detecção e genotipagem do vírus da hepatite C.

Aos meus pais, que buscaram continuamente através da educação o meu crescimento como ser humano e profissional, muitas vezes sufocando seus desejos para que eu pudesse realizar os meus.

E, com especial gratidão, a todos os pacientes que doaram seu sangue voluntariamente, possibilitando a concretização deste trabalho, e proporcionaram a oportunidade de novos caminhos e esperança aos que necessitam de dias melhores.

Vizzoni, A G. Análise epidemiológica e laboratorial de indivíduos coinfetados pelo vírus linfotrópicos para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e vírus da hepatite C (HCV). **Rio de Janeiro; 2010. 100p. Dissertação. [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.**

RESUMO

A infecção pelo vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1 (HTLV-1) pode levar a alterações funcionais da resposta imune do hospedeiro. O HTLV-1 está associado ao desenvolvimento de duas doenças principais: leucemia de células T do adulto e paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) pode levar ao desenvolvimento de hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. O HCV também está associado à ocorrência de várias doenças extra-hepáticas, como crioglobulinemia mista essencial, porfiria cutânea tardia, poliarterite nodosa, síndrome *sicca* e líquen plano. Devido ao papel da resposta imune celular no desenvolvimento e progressão de doenças associadas ao HCV, espera-se que a interação entre o HTLV-1 e HCV possa modificar o curso natural dessas infecções. Com o objetivo de avaliar aspectos epidemiológicos e laboratoriais foi realizado um estudo transversal envolvendo uma série de casos. Foram incluídos no estudo 50 pacientes coinfetados com HTLV-1/HCV, 46 portadores de infecção pelo HCV e 50 pacientes HTLV-1 monoinfetados selecionados randomicamente. Pacientes portadores de infecção pelo vírus da hepatite B e/ou vírus da imunodeficiência adquirida foram excluídos do estudo. A análise estatística das variáveis avaliadas foi realizada utilizando métodos descritivos, paramétricos ou não-paramétricos. Não houve diferença significativa em relação às características sócio-demográficas entre os grupos. O relato de uso de álcool foi mais frequente no grupo HCV ($p < 0,001$). O passado de transfusão de sangue foi considerado como provável via de infecção em 80,6% dos casos do grupo HCV e 39% dos pacientes HTLV-1/HCV coinfetados. Em 26,8% dos coinfetados a provável via de infecção foi a utilização de drogas injetáveis. Por outro lado, a transmissão sexual (55,6%) predominou no grupo HTLV-1 ($p < 0,001$). O acometimento neurológico foi mais frequente no grupo de coinfetados sendo observado em 72% dos pacientes ($p = 0,001$). Em relação aos dados laboratoriais, a presença de plaquetopenia foi mais frequente no grupo HCV monoinfetados ($p < 0,001$). As concentrações séricas de alanina aminotransferase/transaminase glutâmico oxaloacética, fosfatase alcalina e bilirrubinas totais foram mais elevadas no grupo HCV monoinfetados. Não se observou diferenças na distribuição dos genótipos do HCV entre os dois grupos mono e coinfetados. Os níveis de carga viral do HCV foram semelhantes entre os grupos HCV monoinfetados e HTLV-1/HCV coinfetados. Os níveis de carga proviral do HTLV-1 foram semelhantes entre os grupos infectados por esse vírus. A presença de crioglobulinemia foi percentualmente (19,4%) maior no grupo de pacientes coinfetados embora sem diferença significativa em relação aos outros grupos. Indivíduos coinfetados parecem ter uma maior frequência para o desenvolvimento de doenças neurológicas. Por outro lado, nossos dados sugerem que o acometimento hepático parece ser menor no grupo de coinfetados, sendo necessário o acompanhamento clínico desses pacientes para uma melhor avaliação da interação entre esses dois vírus.

Palavras-chave: 1. HTLV-1 2. HCV 3. Coinfecção HTLV-1/HCV

Vizzoni, A G. Epidemiological and laboratory analysis of patients coinfecting with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and hepatitis C virus (HCV). **Rio de Janeiro; 2010. 100p. Dissertation. [Master's Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.**

ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection may lead to functional alterations of host immune response. HTLV-1 is associated with the development of two major diseases: adult T-cell leukemia/lymphoma and tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy. Hepatitis C virus (HCV) infection may lead to the development of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV is also associated with the occurrence of several extrahepatic diseases, such as essential mixed cryoglobulinemia, porphyria cutanea tarda, polyarteritis nodosa, sicca syndrome and lichen planus. Due to the role of cellular immunity in the development and progression of HCV-associated diseases, one could expect that the interaction between HTLV-1 and HCV might modify the natural course of these infections. with the aim to evaluate the epidemiological and laboratory aspects of these infections, a cross-sectional study with a series of cases was conducted. The study included 50 HTLV-1/HCV coinfecting patients, 46 HCV and 50 HTLV-1 infected patients randomly selected. Patients with hepatitis B virus and/or human immunodeficiency virus infection were excluded. Statistical analysis was performed using descriptive, parametric or nonparametric methods. The socio-demographic characteristics were similar among the three groups of patients. Alcohol drinking was more frequent in HCV group ($p < 0.001$). Past history of blood transfusion was considered as probable route of infection in 80.6% of HCV group cases and in 39% of HTLV-1/HCV coinfecting patients. In 26.8% of coinfecting patients the probable infection route was history of drug addiction. On the other hand, sexual transmission (55.6%) was more frequent in HTLV-1 group ($p < 0.001$). Neurological involvement was more frequent in the coinfecting group and occurred in 72% of patients ($p = 0.001$). In relation to laboratory data the finding of thrombocytopenia was more frequent in HCV group ($p < 0.001$). Serum concentrations of alanine aminotransferase/glutamic oxaloacetic transaminase, alkaline phosphatase and total bilirubins were higher in the HCV group when compared to coinfecting individuals. There was no difference in the distribution of HCV genotypes among the two HCV-infected groups. HCV viral load levels were similar in the HCV and HTLV-1/HCV groups. HTLV-1 proviral load levels were similar in HTLV-1-infected groups. The finding of cryoglobulinemia was higher (19.4%) in HTLV-1/HCV coinfecting patients, but no significant difference was observed when compared to the other groups. Our results suggest that coinfecting patients were associated with a higher frequency of neurological involvement. HTLV-1/HCV coinfecting patients seem to have a less advanced degree of hepatic involvement. On the other hand, being necessary to follow-up of these patients for a better evaluation of the consequences of the interaction between these two viruses.

Key-words: 1. HTLV-1 2. HCV 3. HTLV-1/HCV coinfection

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Representação esquemática da estrutura do HTLV	20
Figura 2	– Representação esquemática da estrutura genômica do HTLV	21
Figura 3	– Distribuição da prevalência do HTLV no Brasil	23
Figura 4	– Algoritmo para diagnóstico laboratorial do HTLV, usando um teste de triagem, <i>Western blot</i> e PCR	28
Figura 5	– Representação esquemática da partícula do vírus da hepatite C	30
Figura 6	– Organização genômica do HCV	31
Figura 7	– Diagrama de caixas da contagem de plaquetas de pacientes HTLV-1, HTLV-1/HCV e HCV	61
Figura 8	– Comparação entre as médias das concentrações séricas de IgG nos três grupos estudados.	64
Figura 9	– Diagrama de caixas das Imunofenotipagens de linfócitos CD8 ⁺ de pacientes HTLV-1, HTLV-1/HCV e HCV	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição das frequências das características sócio-demográficas em relação aos grupos estudados	54
Tabela 2	– Frequência de ingestão de álcool em relação aos grupos estudados	55
Tabela 3	– Comparação entre os grupos das variáveis de risco de exposição às infecções de transmissão sanguínea ou sexual	56
Tabela 4	– Distribuição das frequências do estado neurológico em relação aos grupos estudados	57
Tabela 5	– Comparação entre os grupos HTLV-1 e HTLV-1/HCV referente às principais manifestações neurológicas	58
Tabela 6	– Comparação entre os grupos referente às principais manifestações neurológicas	58
Tabela 7	– Análise univariada e bivariadas dos parâmetros hematológicos em relação aos grupos estudados	59
Tabela 8	– Comparação entre os grupos HTLV-1/HCV e HCV em relação à presença de plaquetopenia	61
Tabela 9	– Comparação das medianas das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos em relação aos grupos estudados	61
Tabela 10	– Comparação entre os grupos HTLV-1/HCV e HCV em relação à presença de enzimas hepáticas aumentadas	62
Tabela 11	– Comparação das concentrações séricas médias de C3, C4, TSH, albumina e imunoglobulinas em relação aos grupos estudados	63
Tabela 12	– Prevalência dos genótipos do HCV nos pacientes com coinfeção pelos vírus HTLV-1/HCV e infecção pelo vírus da hepatite C	65

Tabela 13 – Análise da Carga viral do HCV em pacientes com infecção pelo HCV e coinfeção HTLV-1/HCV	65
Tabela 14 – Análise da carga proviral em pacientes com infecção pelo vírus HTLV-1 e coinfeção pelos vírus HTLV-1/HCV	66
Tabela 15 – Análise da presença da Crioglobulinemia entre pacientes com infecção pelo HCV, HTLV-1 e HTLV-1/HCV	66
Tabela 16 – Distribuição e comparação dos resultados observados nas Imunofenotipagens de linfócitos entre os grupos estudados	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AST/ TGO	Aspartato Aminotransferase / Transaminase glutâmico oxalacética
ALT/ TGP	Alanina Aminotransferase / Transaminase glutâmico pirúvica
BT	Bilirrubinas Totais
CD4	Classe de Diferenciação 4
CD8	Classe de Diferenciação 8
CD19	Classe de Diferenciação 19
CD25	Classe de Diferenciação 25
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPV	Carga Proviral
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
DP	Desvio Padrão
E1	Glicoproteína 1 do envelope do HCV
E2	Glicoproteína 2 do envelope do HCV
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	Ensaio imunoenzimático
FA	Fosfatase alcalina
FAN	Fator Antinuclear
GGT	Gamaglutamiltransferase
HTLV-1	Vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUGG	Hospital Universitário Gaffreé e Guinle
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
LRNHV	Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais
RNC	Região não codificadora
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphate buffered saline / Tampão fosfato salino
FITC	Tiocianato de fluoresceína
PE	Ficoeritrina

PerCP	Complexo peridininina-clorofila proteína
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Trancryptase reversa / reação em cadeia da polimerase
SED	Serviço de estatística e documentação
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UDEV	Usuário de drogas endovenosas
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Infecção pelo vírus linfotrópicos para células T humanas do tipo 1	18
1.1.1	Histórico	18
1.1.2	Classificação taxonômica, estrutura e organização genômica do HTLV-1	19
1.1.3	Aspectos Epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1	22
1.1.4	Mecanismos de transmissão do HTLV-1	24
1.1.5	Imunopatogenia da infecção pelo HTLV-1	25
1.1.6	Diagnóstico da Infecção pelo HTLV-1	26
1.2	Infecção pelo vírus da Hepatite C	29
1.2.1	Histórico	29
1.2.2	Classificação taxonômica, estrutura e organização genômica do HCV	30
1.2.3	Aspectos Epidemiológicos da infecção pelo HCV	32
1.2.4	Imunopatogenia da Infecção pelo HCV	34
1.2.5	Mecanismos de transmissão do HCV	36
1.3	Coinfecção HTLV-1/HCV	39
2	JUSTIFICATIVA	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	42
3.2	Objetivos Específicos	42
4	METODOLOGIA	43

4.1	Delineamento do estudo	43
4.2	Seleção de casos e controles	44
4.3	Critérios de exclusão	45
4.4	Coletas das amostras biológicas	46
4.5	Revisão dos Prontuários Médicos	47
4.6	Avaliação neurológica	47
4.7	Imunofenotipagem de linfócitos	48
4.8	Pesquisa e caracterização das Crioglobulinas	49
4.9	Quantificação da carga proviral (CPV) do HTLV-1	49
4.10	Diagnósticos da infecção pelo HTLV-1 e HCV	50
4.10.1	Diagnóstico de infecção pelo HTLV-1	50
4.10.2	Diagnóstico de infecção pelo vírus da Hepatite C	50
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Análises das variáveis sócio-demográficas e fatores de exposição	53
6.2	Análises das variáveis Laboratoriais	59
7	DISCUSSÃO	69
8	CONCLUSÕES	74
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (Human T-Lymphotropic vírus type 1 ou HTLV-1) infecta aproximadamente 15 a 25 milhões de pessoas em todo mundo (DE THÉ, 1996). O Brasil é um dos países considerados endêmicos para essa infecção, com estimativa de 2 a 3 milhões de indivíduos infectados (CARNEIRO-PROIETTI, 2002). A infecção pelo HTLV-1 é persistente e acarreta numerosas alterações da resposta imune dos indivíduos infectados. A maioria dos portadores permanecerá assintomática ao longo de suas vidas e somente uma pequena parcela (0,5 a 5%) irá desenvolver alguma doença associada a esta infecção (BANGHAM & OSAME, 2005).

Desde sua descoberta, em 1989, o vírus da hepatite C (HCV) é a principal causa de doença hepática crônica no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a prevalência global da infecção pelo HCV em 3%, o que representa aproximadamente 170 milhões de indivíduos infectados (WHO, 2009). A infecção se torna crônica na maioria dos casos, sendo estimado que 74 a 86% dos portadores apresentam viremia. A infecção crônica pode evoluir para complicações mais graves (hepatite crônica e cirrose) em 25 a 30 % dos casos (ALTER, 2007). No Brasil, a prevalência da infecção pelo HCV varia de 0,3% a 5,9% de acordo com a região geográfica, sendo considerada de forma geral entre 1-1,9% (ANDRADE et al., 2006).

A coinfeção HTLV-1/HCV é comum em países endêmicos para a infecção pelo HTLV-1, já que ambos os vírus compartilham as principais formas de transmissão, assim como é esperada em grupos populacionais de risco, tais como: praticantes de relações sexuais sem proteção, usuários de drogas endovenosas e, finalmente, indivíduos com passado de transfusão de sangue realizada antes de 1994 (BOSCHI-PINTO et al., 2000; BERINI et al., 2007). A resposta imunológica celular parece ser essencial para a erradicação ou “*clearance*” viral, já que a diminuição da viremia coincide com o aparecimento de linfócitos T HCV específicos e com a expressão de interferon-gama no fígado (REHERMANN, 2009).

A infecção pelo HTLV-1 acarreta numerosas alterações nas vias de ativação celular envolvidas na resposta imune, levando a certo grau de

imunodeficiência (MUNEOU et al., 1999). Kishihara e colaboradores (2001) sugeriram que a presença de deficiência imunológica possa interferir na eficácia da resposta imune contra o HCV em indivíduos coinfectados com HTLV-1, assim como ocorre na coinfeção com o HIV-1 (SHEPARD et al., 2005). Esses autores relataram que a presença do HTLV-1 foi associada com maior carga viral do HCV em pacientes coinfectados japoneses. Da mesma forma, Boschi-Pinto e colaboradores (2000) descreveram aumento de doença hepática em indivíduos coinfectados, também em população japonesa. Hisada e colaboradores (2003) descreveram aumento da carga viral do HCV em indivíduos coinfectados com HIV-1 e/ou HTLV-2, um aumento bastante evidente em indivíduos brancos caucasianos, menos evidente em afro-descendentes e não detectado em pacientes de origem hispânica. Esses dados sugerem que fatores imunogenéticos como os polimorfismos de antígenos leucocitários humanos (HLA), possam influenciar a diminuição da carga do HCV (HISADA et al., 2003).

No Brasil, a frequência de coinfeção com HCV na maior coorte (n=540) de indivíduos infectados pelo HTLV é de 12,2% (ROJAS, 2007), enquanto que em doadores de sangue a soroprevalência de anticorpos anti-HCV observada foi de 12,3% (MAGALHÃES, 2006). Esses dados indicam a necessidade de estudos voltados para a análise dos fatores epidemiológicos e biológicos que possam influenciar essa coinfeção em nosso País.

1.1 Infecção pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

1.1.1 Histórico

Os retrovírus estão entre os primeiros vírus conhecidos pela ciência, tendo sido descobertos há mais de 100 anos, e sendo responsáveis pelo aparecimento de sarcomas em galinhas (ROUS, 1960). Essa descoberta foi seguida da identificação de um grande número de vírus oncogênicos de animais.

Até que fossem isolados o HTLV-1 e outros retrovírus humanos, duas importantes descobertas foram necessárias: uma foi o achado da transcriptase reversa nos vírus com material genético RNA e causadores de tumores

(TEMIN; MIZUTANI, 1970), e a outra foi o desenvolvimento de técnicas para manter linfócitos T em cultura pelo uso de fatores de crescimento, atualmente chamados de interleucina-2 (MORGAN et al., 1976).

O primeiro retrovírus humano foi, então, isolado de linfócitos do sangue periférico de um indivíduo com linfoma de células T com manifestações cutâneas, em 1980, nos Estados Unidos, tendo sido denominado vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (POIESZ et al., 1980). Em 1982, foi identificado o HTLV-2 a partir de uma linhagem de células T obtidas de um paciente com tricoleucemia (leucemia de células cabeludas) (KALYANARAMAN et al., 1982).

Retrovírus relacionados estão disseminados em primatas dos continentes Europeu, Africano e Asiático. O nome “vírus linfotrópico para células T de primatas” (PTLV) tem sido proposto para agrupar vírus relacionados que têm como hospedeiros primatas humanos (HTLV) e não-humanos (STLV, vírus linfotrópico para células T de símios). A homologia do genoma do HTLV-1 com o do STLV parece ser maior do que entre o HTLV-1 e HTLV-2 (GOUBAU et al., 1996).

1.1.2 Classificação taxonômica, estrutura e organização genômica do HTLV-1

O vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus complexo, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus* (LAIMORE; FRANCHINI, 2007).

O HTLV possui uma estrutura morfológica similar a de outros retrovírus. É constituído por partículas esféricas de 80 a 100 nm de diâmetro contendo uma porção central (core), um envelope, a enzima transcriptase reversa e as proteínas da matriz (OHTSUKI et al., 1982).

A porção central é composta pelo nucleocapsídeo, consistindo de duas fitas idênticas de RNA com polaridade positiva que, durante o ciclo de replicação do vírus, esta fita simples é transcrita em uma fita dupla por ação da transcriptase reversa. A dupla fita de DNA será inserida no DNA da célula hospedeira. Essa forma inserida de um retrovírus é denominada provírus ou DNA proviral (GALLO, 2005).

O envelope é composto por uma camada bilipídica com duas proteínas: uma extracelular e uma proteína transmembrana que atravessa essa estrutura. Junto a membrana do envelope se encontra a proteína da matriz. Outras proteínas também estão presentes no interior do capsídeo, como a transcriptase reversa e a integrase (Figura 1).

A interação das glicoproteínas do envelope viral com receptores situados junto à membrana plasmática das células-alvo é responsável pelo início da infecção pelo HTLV (GOFF, 2007).

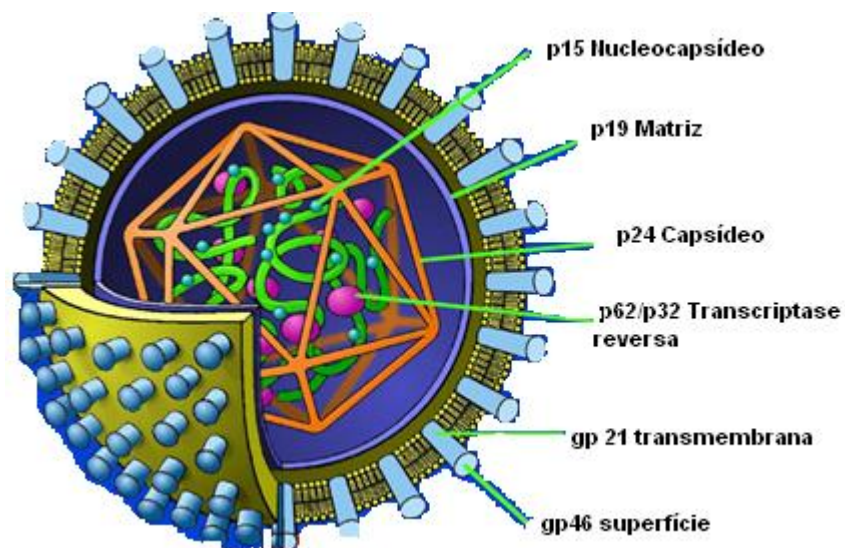


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do HTLV

Fonte: <http://researchnews.osu.edu/archive/htlvil2pics.htm>
[acesso em 25 jan.2010]. (figura adaptada para o português).

A organização do genoma do HTLV é semelhante à de outros retrovírus complexos, possuindo os principais genes (SEIKI et al., 1983):

- *gag*, que codifica as proteínas do core viral, a precursora p52 e suas derivadas p15, p19 e p24;

- *pol*, que codifica as enzimas transcriptase reversa, RNase, endonuclease e protease;
- *env*, responsável pela codificação da glicoproteína externa gp46 do envelope, e da glicoproteína transmembrana gp21;
- região pX, que apresenta quatro fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs);
- segmentos LTR (*Long Terminal Repeat*), segmentos longos repetitivos presentes nas duas extremidades do genoma viral, e contêm elementos reguladores da transcrição viral.

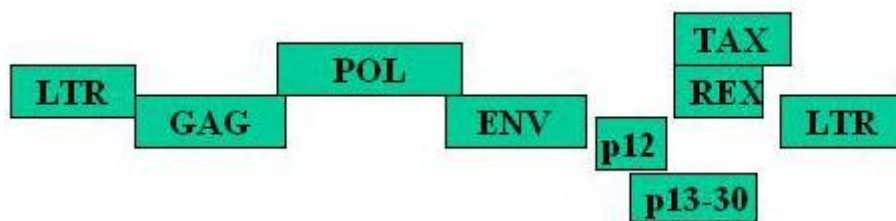


Figura 2: Representação esquemática da estrutura genômica do HTLV

Fonte: Florins A. et al., 2007 – adaptado.

O HTLV-1 é classificado em sete subtipos genéticos: 1a, Cosmopolita; 1b, África Central; 1c, Melanésio; 1d, Pigmeus da República Centro Africana; 1e e 1f identificados na República Democrática do Congo; e 1g, África Central (GASTALDELLO et al., 2008). O subtipo Cosmopolita apresenta cinco subgrupos: Transcontinental (A), Japonês (B), Oeste Africano (C), Norte Africano (D) (GASMI et al., 1994) e Negros do Peru (E) (VAN DOOREN et al., 1998). Parece não existir relação entre o subtipo viral e a doença causada pelo vírus, sendo a variabilidade genômica do HTLV-1 mais dependente da sua origem geográfica (KROON & CARNEIRO-PROIETTI, 2006).

Recentemente, novos tipos de HTLV (HTLV-3 e HTLV-4) foram isolados em populações do sul de Camarões e que apresentam contato com primatas não-humanos (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005). O HTLV-3

apresenta origem recente a partir do vírus linfotrópico de células T em símios tipo 3 (STLV). O HTLV-4 não foi identificado como equivalente ao STLV, sendo distinto, filogeneticamente, dos PTLVs conhecidos. Não há relatos de que os HTLV-3 e 4 possam ser transmitidos entre seres humanos e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (WOLFE et al., 2005).

1.1.3 Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1

Desde a identificação do HTLV-1, ocorrida em 1980, o conhecimento epidemiológico sobre a infecção pelo HTLV-1 tornou-se maior. A sua distribuição geográfica está bem definida, embora algumas questões ainda não completamente esclarecidas persistam, como o fato de existirem áreas de alta prevalência (sudeste do Japão) e regiões vizinhas apresentando baixa prevalência (Coreia, China e região ocidental da Rússia) (PROIETTI , 2006).

Estima-se que, de 15 a 25 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo pelo HTLV-1 (DE THÉ; KAZANJI, 1996). O Japão, Caribe, Américas do Sul e Central, África Equatorial, Oriente Médio e Melanésia, são as principais áreas endêmicas. Todavia, a prevalência nessas áreas não é uniforme (PROIETTI et al., 2005).

Para estimar a soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 na população geral, Taylor e colaboradores (2005) realizaram um estudo em 234.078 gestantes na Europa, obtendo taxa de prevalência de 4,4 por 10.000, com variações de 0,7 por 10.000 na Alemanha até 11,5 por 10.000 na França, superando em 6 vezes a prevalência de 0,07 por 10.000 descrita em candidatos à doação de sangue na população europeia. Entretanto, a maioria dos dados sobre soroprevalência tem demonstrado que estudos conduzidos em populações pouco vulneráveis, como doadores de sangue, ou grupos selecionados (gestantes, pacientes com doenças neurológicas ou hematológicas, familiares de pessoas infectadas, usuários de drogas injetáveis (UDIs) e profissionais do sexo), certamente não são representativos da população geral (MUELLER, 1991; FERREIRA et al., 1997; MANNS et al., 1999).

No Brasil, as estimativas baseadas nas prevalências (Figura 3), estabelecidas em inquéritos soropidemiológicos com doadores de sangue em diferentes regiões do país, apontam que cerca de 2,5 milhões de indivíduos estejam infectados (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

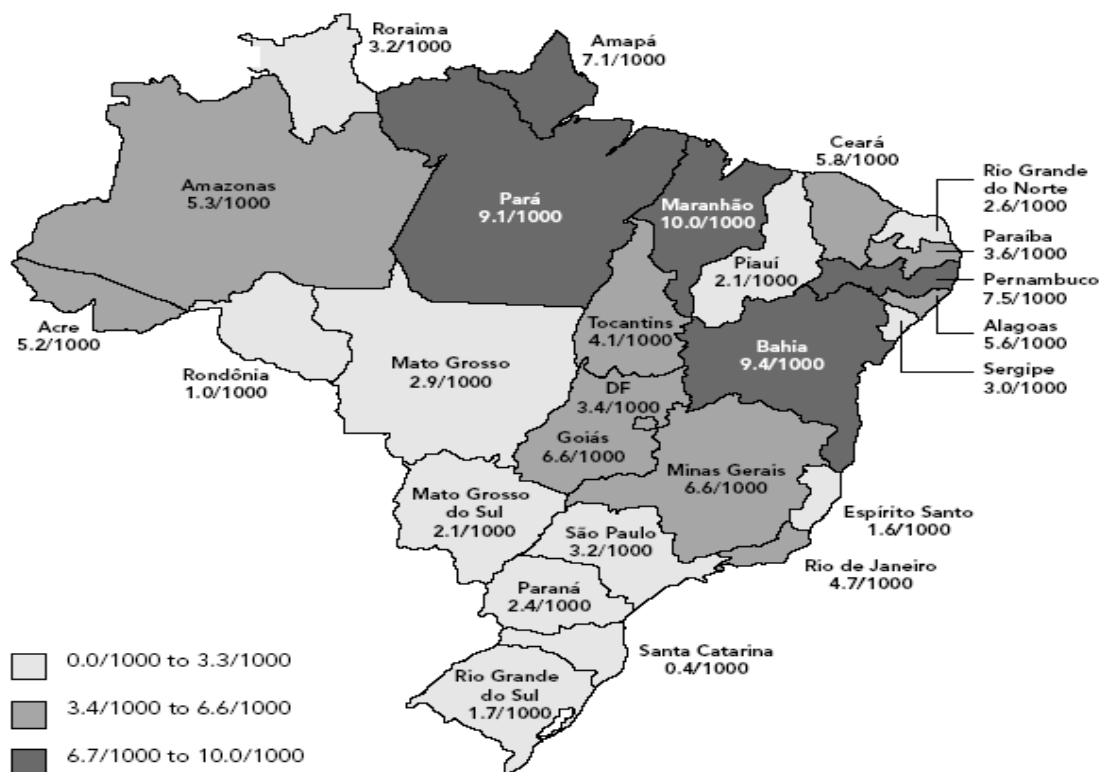


Figura 3- Distribuição da prevalência do HTLV no Brasil.

Fonte: Proietti et al., 2005.

Nesse sentido, o Brasil registra o maior número absoluto de portadores do HTLV no mundo, o que implicaria em cerca de 10 a 60 mil indivíduos afetados por doenças associadas a esta infecção (MOREIRA et al., 1993). A identificação da introdução desse agente viral em nosso país é de difícil determinação devido à heterogeneidade da população, composta por nativos indígenas, imigrantes de países europeus e asiáticos além de descendentes africanos trazidos durante a época da escravidão (ARAÚJO & ANDRADA-SERPA, 1996).

Em um estudo realizado por Galvão-Castro e colaboradores (1997) em cinco capitais brasileiras (Rio de Janeiro, Recife, Salvador, Florianópolis e Manaus), a soroprevalência de infecção pelo HTLV-1 foi de 0,41%. A maior prevalência dentre as cinco cidades foi encontrada em Salvador (1,35%),

provavelmente devido as suas características sócio-demográficas. Em São Paulo, em estudo com 17.063 doadores de sangue, foi encontrada prevalência de 0,15% para a infecção pelo HTLV-1 (FERREIRA JÚNIOR et al., 1995).

Em Salvador, Bahia, um dos raros estudos conduzidos em amostras de base populacional, a soroprevalência para HTLV-1 alcançou 1,76% (23/1238), sendo mais elevada em mulheres (2,0%) quando comparada a indivíduos do sexo masculino (1,2%) (DOURADO et al., 2003).

1.1.4 Mecanismos de transmissão do HTLV-1

Vários comportamentos individuais e exposições foram associados com a soropositividade para HTLV-1. A transmissão do HTLV-1 pode ocorrer da mãe infectada para seu filho, especialmente pelo aleitamento materno (FUJINO et al., 2000; MALONEY et al., 2003); por transmissão parenteral através de transfusão sanguínea de produtos celulares contaminados pelo HTLV-1 (EDLICH et al., 2000); uso comum de objetos contaminados com sangue infectado pelo HTLV-1 (McINTYRE, 2001); compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis (MANNS et al., 1999) e relação sexual (BARTHOLOMEW et al., 1987; MURPHY et al., 1989). A transmissão eficaz é dependente da presença de células infectadas pelo HTLV-1.

Roucoux e colaboradores (2005), em estudo de coorte com 30 casais heterossexuais e com relação estável acima de 6 meses, sendo um dos parceiros infectado pelo HTLV-1, acompanhados por 10 anos, estimaram a incidência de infecção pelo HTLV-1 em 0,9% pessoa/ano (IC 95% 0,1–3,3). Estudos transversais sugeriram maior eficiência na transmissão de homens para mulheres do que de mulheres para homens (KAJIYAMA et al., 1986), entretanto, estudos prospectivos demonstraram que essa diferença parece ser menos importante (FIGUEROA et al., 1997).

A via mais eficaz de transmissão do HTLV-1 é através de componentes celulares do sangue contaminado. No passado, isso ocorria, principalmente, por transfusões de sangue não testado sorologicamente para o HTLV-1 (OKOSHI et al., 1984; MANNS et al., 1992). O risco maior está associado à transfusão de concentrados de hemácias, plaquetas e sangue total, quando comparados com plasma (MANNS et al., 1992), uma vez que a conservação em baixas temperaturas parece diminuir o risco de transmissão, possivelmente,

em decorrência da destruição dos linfócitos infectados (DONEGAN et al., 1990).

1.1.5 Imunopatogenia da infecção pelo HTLV-1

A maioria dos indivíduos mono infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática ao longo da vida, e o risco acumulado de desenvolver alguma doença associada à infecção varia de 0,5 a 5%. Esta infecção está associada, principalmente, a dois grupos de síndromes distintas: uma síndrome linfoproliferativa maligna, agressiva, conhecida como Leucemia/Linfoma de células T CD4+ do adulto (LLTA) (TAKATSUKI et al. 1979), e um grupo de síndromes inflamatórias crônicas, cuja principal é o complexo neurológico ligado ao HTLV-1, representado, principalmente, pela paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (ARAUJO & SILVA, 2006), além de uveíte, polimiosite e artrite, Síndrome de Sjögren, tireoidite, alveolite linfocítica, dermatite e certo grau de imunodeficiência expresso pela frequência de manifestações infecciosas observadas como estrogiloidíase, escabiose, dermatite infectiva e tuberculose (UCHIYAMA et al., 1997; VERDONCK et al., 2007).

A LLTA foi descrita, originalmente, no Japão, sendo caracterizada por leucemia de linfócitos T maduros, com incidência predominante em adultos (UCHIYAMA et al., 1977). Apresenta-se, clinicamente, com adenomegalia generalizada, acompanhada de hepatoesplenomegalia, hipercalcemia, lesões osteolíticas e frequentes manifestações cutâneas, como a eritrodermia (YAMAGUCHI, 1994).

A PET/MAH é definida como uma doença que provoca uma crônica e progressiva desmielinização na medula espinhal, usualmente, de início insidioso, que acomete de 1 a 2% dos portadores de HTLV-1. Está associada a um grau variável de disfunções esfinterianas e sensitivas, que afeta mais mulheres do que homens, geralmente, na quarta e na quinta décadas de vida (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1986). Estima-se que cerca de 1% dos pacientes pode desenvolver PET/MAH, após décadas de infecção e com média de 43 anos de idade (KAPLAN et al., 1990; OSAME et al., 1990; UCHIYAMA, 1997).

A PET/MAH é caracterizada por paraparesia espástica nos membros inferiores, evoluindo com graus variáveis de disfunção vesical, além de distúrbios sensitivos (OSAME et al., 1990). Os principais sintomas observados são dificuldades na marcha, fraqueza e espasticidade nos membros inferiores, além de distúrbios esfinterianos (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1990).

A presença de anticorpos IgG contra o vírus HTLV-1 foi constatada, em 1985, no soro de 65% dos pacientes com quadro de mielopatia, na Martinica, sugerindo que o HTLV-1 poderia ser o agente causador desta síndrome (GESSAIN et al., 1985). No mesmo ano, estes achados foram confirmados em pacientes da Jamaica e da Colômbia (RODGERS-JOHNSON et al., 1985). Em 1986, Osame e colaboradores relataram doença semelhante no sul do Japão, classificando como mielopatia associada ao HTLV-1(MAH). Em seguida, verificou-se tratar da mesma doença (PET e MAH), e foi denominada de PET/MAH (ROMAN & OSAME, 1988).

No Brasil, foram relatados casos suspeitos de PET em Fortaleza, Ceará, sem a pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 (COSTA et al., 1989). Em São Paulo - SP, anticorpos contra HTLV-1 foram identificados em 37,5% dos pacientes atendidos com mielopatia, de origem obscura (MARTINS-CASTRO et al., 1989). Em Salvador, Bahia, foi confirmado que 50% dos pacientes com paraparesia espástica tropical apresentavam anticorpos anti-HTLV-1 (GOMES et al., 1999).

1.1.6 Diagnóstico da infecção pelo HTLV-1

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV-1 está fundamentado na detecção de anticorpos específicos contra o vírus, os quais estão presentes em fluidos orgânicos, sendo gerados a partir da resposta imunológica do hospedeiro direcionada contra antígenos virais codificados por genes estruturais e reguladores. Os testes sorológicos, com desempenhos diagnósticos diferentes, são classificados como testes de triagem e de confirmação.

Os ensaios de triagem são utilizados obrigatoriamente em Hemocentros nacionais desde 1993 (MIISTÉRIO DA SAÚDE, 1993), ou frente à suspeita clínica de doença associada a esse retrovírus. Permitem a detecção de

anticorpos contra o HTLV-1 e HTLV-2, porém, não apresentam capacidade discriminatória entre essas infecções, fazendo-se necessária a confirmação do resultado por ensaios com alta especificidade.

O principal teste utilizado na triagem sorológica do HTLV é o ensaio imunoenzimático (EIE), como, por exemplo, o teste ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), que apresenta alta sensibilidade, é de fácil e rápida execução, podendo ser realizado de forma automatizada.

A confirmação diagnóstica da infecção pelo HTLV pode ser realizada a partir de diferentes métodos sorológicos, sendo o *Western Blot* (WB) o mais utilizado. Esse teste permite reconhecer a presença de anticorpos para diferentes antígenos virais. O critério de positividade é a presença de anticorpos contra proteínas codificadas para dois genes diferentes, conforme RDC 153 de 14/06/2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

As técnicas de biologia molecular, para o diagnóstico confirmatório e diferencial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, fundamentam-se na detecção do ácido nucléico viral na forma de DNA proviral (SABINO et al., 2007). O HTLV não apresenta viremia plasmática detectável, ou seja, a presença de RNA viral circulante em grandes quantidades no soro ou plasma. Mediante essa característica, a procura do DNA proviral, obtido de células mononucleares do sangue periférico, é o método de escolha mais adequado para o diagnóstico molecular da infecção pelo HTLV. Dentre os métodos baseados na amplificação genômica destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested-PCR* (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2003).

Com o objetivo de realizar o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV, é recomendado o cumprimento dos procedimentos sequenciados na Figura 4, agrupados em 3 etapas: triagem sorológica, confirmação sorológica por realização do teste de WB e confirmação da infecção pelo HTLV-1 e/ou HTLV-2 por PCR (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

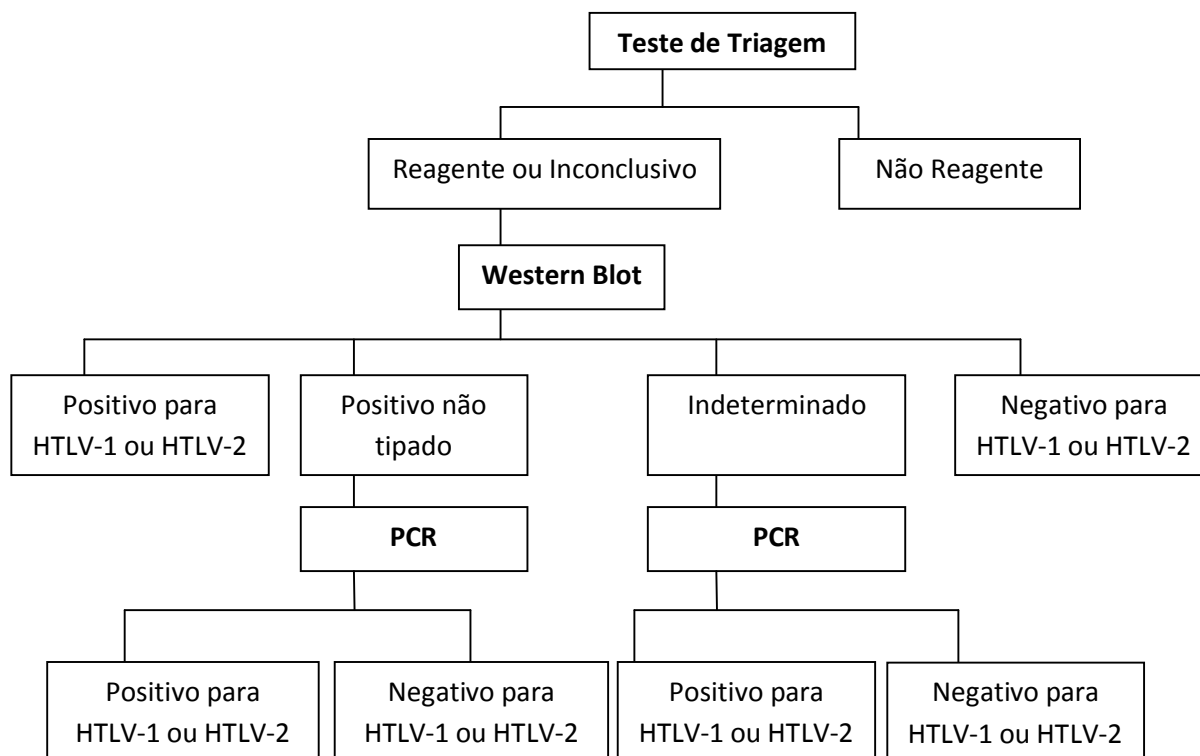


Figura 4 – Algoritmo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV, com base em teste de triagem (ELISA), *Western blot* e PCR.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003.

1.2 Infecção pelo vírus da hepatite C

1.2.1 Histórico

Vários anos se passaram desde a caracterização da hepatite não-A, não-B (NANB), por Feinstone e colaboradores (1975), até a descoberta do vírus da hepatite C (*Hepatitis C vírus* ou HCV), em 1989, por Choo e colaboradores.

Muitos esforços foram realizados durante quase 15 anos na tentativa de elucidar o agente etiológico das hepatites NANB. Durante esse período, um grupo de pesquisadores desenvolveu um painel de soros que consistia em amostras em duplicata codificadas, que haviam sido testadas e reconhecidas como infecciosas e não-infecciosas em chimpanzés e humanos. Entretanto,

não havia conhecimento sobre o agente etiológico, assim como não existiam testes sorológicos disponíveis para sua detecção (ARAUJO & BARONE, 2010).

No ano de 1989, estudos realizados por pesquisadores do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* ou CDC) e da corporação *Chiron*, dos Estados Unidos da América (EUA), culminaram na elucidação da natureza do vírus responsável pela hepatite NANB pós-transfusional, então denominado vírus da hepatite C.

A metodologia empregada na descoberta do novo agente baseou-se em isolar os ácidos nucleicos de amostra de soro de chimpanzé, sabidamente portador de hepatite NANB, e a partir desse material, obtiveram uma grande quantidade de fragmentos de DNA. Após extração dos ácidos nucleicos, sintetizou-se a molécula de DNA complementar (cDNA), que foi inserida em fagos vetores e expressos em *Escherichia coli*. Tais clones expressaram suas proteínas e estas foram testadas com soros de pacientes com hepatite NANB. Após cerca de 1 milhão de testes terem sido realizados, um único clone, denominado 5-1-1, mostrou-se reativo aos anticorpos dos soros infectados. A clonagem e expressão desse gene em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* resultaram na identificação do antígeno C100-3, o primeiro a ser utilizado em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o HCV (KUO et al., 1989).

1.2.2 Classificação taxonômica, estrutura e organização genômica do HCV

O HCV é um vírus classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, sendo membro da família *Flaviviridae* (SIMMONDS et al., 2005). É um vírus esférico e envelopado com diâmetro que varia de 55 a 65 nm. A partícula viral (Figura 5) é formada por um envelope lipídico, apresentando proteínas virais E1 e E2, e pelo capsídeo proteico formado pela proteína core, em cujo interior há uma fita simples de RNA com orientação positiva.

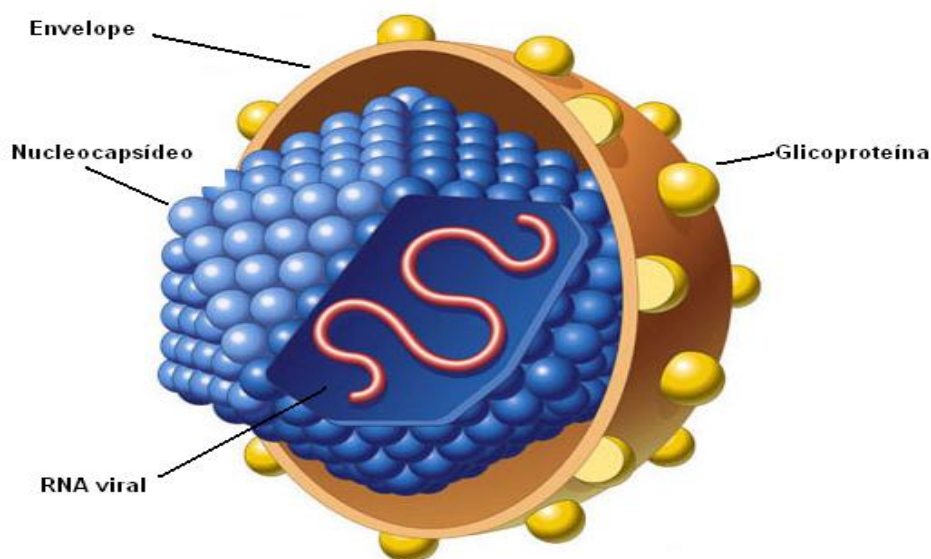


Figura 5- Representação esquemática da partícula do vírus da hepatite C.

Disponível em: http://www.trugene.com/Labs/HCV/Page_1HCV_Tech_Bulletin.pdf.

[Acesso em 25 mar.2003] (Figura adaptada para o português).

O genoma do HCV (Figura 6) contém aproximadamente 9600 nucleotídeos, e apresenta duas regiões terminais altamente conservadas, denominadas regiões 5' UTR e 3' UTR (*untranslated region* ou UTR), que flanqueiam uma longa região de leitura aberta (*open reading frame* ou ORF). Esta ORF codifica uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos, que é processada por proteases celulares e virais, fornecendo proteínas estruturais (core, E1, E2 e p7) e não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS6A). A região 5' UTR exibe uma alta similaridade genética entre os isolados de HCV estudados em todo mundo, indicando possuir um papel regulador importante durante a replicação viral (ZEIN, 2000).

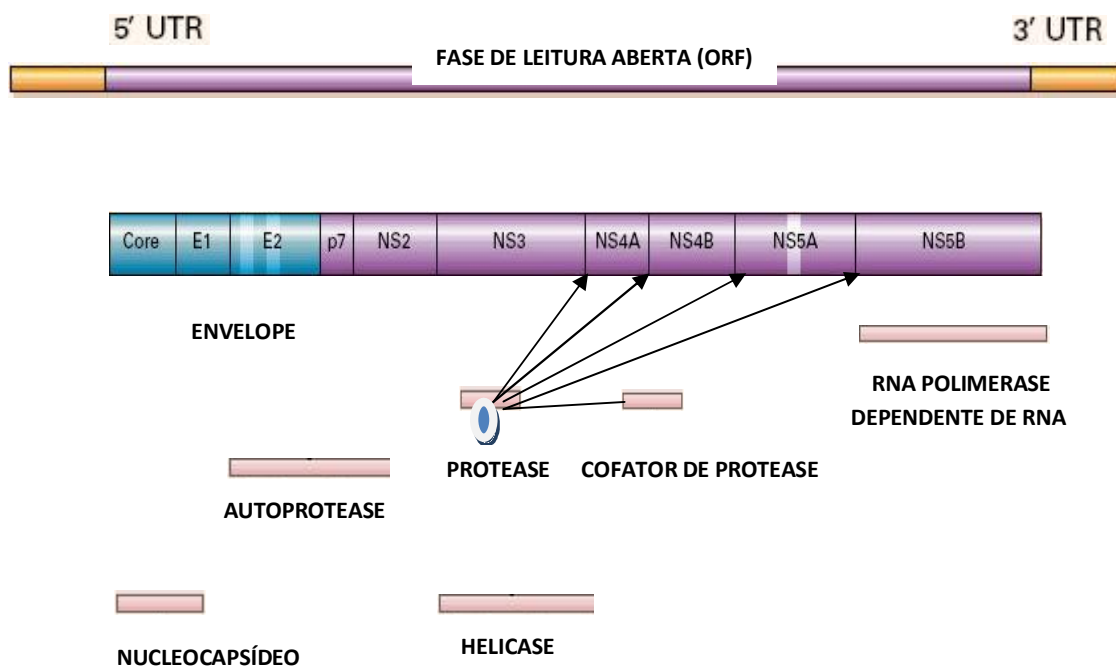


Figura 6– Organização genômica do HCV (Fonte: Lauer GM, Walker BD, 2001).

UTR; *untranslated region*, E; *envelope*, NS; *Nonstructural*

A análise das sequências de ácidos nucleicos do HCV demonstraram diversidade de até 30%, de forma que, devido a essa variabilidade, o HCV está classificado em quatro categorias: tipos, subtipos, isolados e *quasispecies*.

Os genótipos de HCV são identificados por numerais arábicos e os subtipos por letras minúsculas do alfabeto, sendo ambos por ordem de descoberta. Dessa forma, seis genótipos principais (1, 2, 3, 4, 5 e 6), apresentando diferentes subtipos (a, b, c...) foram sugeridos como padrão de nomenclatura para o HCV (SIMMONDS et.al, 1994; PETER et al.,2005). Recentemente, Murphy e colaboradores (2007) encontraram um novo genótipo na África Central, sendo proposta a classificação como genótipo 7.

1.2.3 Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HCV

Estudos sorológicos são utilizados para estimar a prevalência da infecção pelo HCV, uma vez que muitos portadores com viremia detectável não

apresentam sintomas clínicos. A infecção pelo HCV é considerada endêmica no mundo, com variabilidade geográfica na sua distribuição (ALTER, 2007).

Existem, aproximadamente, 170.000.000 de portadores do HCV no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009). A estimativa de prevalência da infecção pelo HCV no mundo é de aproximadamente 3,0 %, entretanto, esses dados são baseados mais em médias ponderadas de regiões do que de países individuais, uma vez que faltam dados de muitos países. Países com maiores taxas de prevalência descritas estão localizados na África e na Ásia, e áreas com prevalências menores incluem nações industrializadas na América do Norte e regiões norte e ocidental da Europa (LAUER & WALKER, 2001; ALTER, 2007).

Prevalências baixas e moderadas (0,3 a 3,5%) são encontradas em coortes de doadores de sangue em todo mundo. Prevalência muito baixa (<0,3%) foi relatada em algumas áreas das regiões norte e central da Europa, EUA, Jamaica, Nova Zelândia, Iêmen, Irã e áreas do Japão. Moderada a alta prevalência (2,5 a 5%) foi relatada na cidade do Rio de Janeiro (Brasil), Togo, Ruanda e Guiné. Prevalência muito alta (5 a 10%) foi encontrada, particularmente, em países da África, como Nigéria, Camarões e Tanzânia, na cidade de Pequim (China) e também em Latina, província da Itália. As maiores taxas de prevalência (> 10%) foram descritas no Egito (13,6 a 24,8%), em Jacarta (Indonésia) (24,3%), no Vietnã (20,6%) e na Nigéria (12,3%). Essas altas taxas de prevalência podem ser decorrentes de intervenções humanas, como tratamento parenteral para esquistossomose no Egito, ou condições sanitárias inadequadas durante e após a guerra do Vietnã (TENGA; FOCACCIA, 2010).

Na América do Norte, Canadá e EUA apresentam prevalências de 0,3% e 0,6%, respectivamente. O perfil epidemiológico da transmissão do HCV é representado por uma prevalência maior em adultos, com pico ocorrendo entre 30 a 49 anos de idade. Na maioria dos casos, a transmissão do HCV parece ter ocorrido recentemente (entre 10 a 30 anos atrás), sobretudo em adultos jovens (BOTTÉ; JANOT, 1996).

Na América do Sul, as prevalências de infecção pelo HCV variam entre 0,9% na Argentina até 1,7% no Brasil, entretanto neste último, devido à sua vasta dimensão e diferentes etnias, foram relatadas frequências diversas. Os dados provenientes de estudos de base populacional sobre a prevalência de

hepatite C no Brasil não são muitos. A maioria dos estudos foi realizada em grupos específicos, como doadores de sangue, soldados, pacientes em hemodiálise, prisioneiros etc., os quais não representam a população em geral. Focaccia e colaboradores (1988) realizaram o primeiro estudo de base populacional para avaliar a prevalência da infecção pelo HCV no Município de São Paulo, e foi demonstrada uma prevalência de 1,42% (variando de 0,70 - 2,2%).

Conforme estudo de Fonseca (1999), a prevalência média em doadores de sangue é de 1,1% (variando de 0,36 a 5,6%), a região Norte apresentando a maior prevalência e a região Sul contribuindo com a menor taxa de doadores de sangue anti-HCV positivos.

No Estado do Amazonas, a maioria dos dados disponíveis está relacionada aos doadores de sangue, pacientes hemodialisados e hemofílicos. A prevalência em doadores de sangue na Amazônia foi de 0,79%, em 1999, enquanto a média brasileira foi de 0,88% (FOCCACIA et al., 2003). Em hemodialisados, a prevalência pode chegar a 45,5 %. No estudo multicêntrico de Fonseca (1999), a região Norte apresentou prevalência de 2,12%, considerada a maior prevalência do Brasil. No entanto, a prevalência encontrada no Estado do Amazonas foi de 0,8 %.

A prevalência mundial dos genótipos do HCV é diferenciada, predominando os subtipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3a no Brasil, Europa Ocidental e Estados Unidos. No Japão e Taiwan, frequentemente, são encontrados os tipos 1b, 2a e 2b. O tipo 3 é mais prevalente na Índia e em outras partes da Ásia. O tipo 4, no Oriente Médio. O tipo 5, na África do Sul, e o tipo 6, em Hong Kong e Macau (CAVALHEIRO, 2003).

1.2.4 Imunopatogenia da infecção pelo HCV

As células-alvo naturais do HCV são os hepatócitos e, possivelmente, os linfócitos B (OKUDA et al., 1999). Ao entrar no hospedeiro, a replicação viral é extremamente robusta e estima-se que mais de 10 trilhões de partículas de vírus são produzidas por dia, mesmo na fase crônica da infecção. A grande variabilidade genética do HCV associada à alta taxa de mutação dificulta o

reconhecimento imunológico pelas células do sistema imune do hospedeiro (NEUMANN et al., 1998).

A qualidade da resposta imunológica mediada por células parece ser crucial para a eliminação ou persistência do HCV. Os linfócitos T CD4⁺ apresentam respostas distintas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 seria responsável pela incapacidade de eliminação do HCV, assim como pela maior ou menor gravidade da lesão hepática. Os elementos que condicionam o desenvolvimento de um ou outro tipo de resposta imunológica permanecem ainda desconhecidos (MISSALE et al., 1996).

O HCV pode provocar hepatite aguda que, em 15% dos casos, evolui para a cura espontânea, mas não confere imunidade permanente. Por outro lado, em aproximadamente 85% dos casos, a infecção torna-se crônica, podendo evoluir para cirrose em 10 a 20% dos casos após 20 anos de infecção e carcinoma hepatocelular (variando de 1 a 4% ao ano) em pacientes com cirrose relacionada ao HCV (PAWLOTSKY, 2004).

Tong e colaboradores (1995), em estudo de coorte com 131 pacientes com infecção crônica pelo HCV, adquirida após transfusão sanguínea, identificaram como manifestações clínicas mais frequentes a fadiga (67,2%), dor abdominal (19,8%), anorexia (14,5%) e perda de peso (6,1%).

Admite-se que o processo inflamatório contínuo e ineficiente, visando à erradicação do vírus, constitui o principal fator responsável pela fibrogênese hepática. Entretanto, como não existe uma correlação direta entre processo inflamatório e estágio de fibrose hepática, outros fatores como, por exemplo, o sexo, a idade do indivíduo quando este se infectou e a duração da infecção, parecem contribuir para progressão da fibrose hepática (HAUSHOFER et al., 2001).

Ainda assim, o fator mais importante relacionado ao hospedeiro parece ser o seu estado imunológico. Uma resposta imunológica vigorosa pode causar a eliminação do HCV em 15% dos indivíduos que se expõem ao vírus, enquanto que nos pacientes crônicos ou nos imunossuprimidos a infecção evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos imunocompetentes (STRAUSS, 2001).

O HCV-RNA pode ser detectado no sangue 1-3 semanas após a exposição. No período de 15-150 dias após a exposição, praticamente todos os

pacientes apresentam lesão dos hepatócitos, evidenciada pela elevação da ALT/TGP. Porém, apenas 25-35% dos pacientes apresentam algum sintoma como mal-estar, fraqueza, anorexia e icterícia. Anticorpos anti-HCV são detectados durante o curso da infecção, sendo que em 50-70% dos casos podem ser detectados já no início dos sintomas, e em 90% após três meses do início da infecção (NIH, 2002).

Várias manifestações extra-hepáticas foram relatadas na história natural da infecção pelo HCV, tais como: crioglobulinemia, porfiria cutânea tarda, poliarterite nodosa, líquen plano, *diabetes mellitus* e síndrome *sicca* (AGNELLO, 2000). De acordo com diferentes estudos, 40-74% dos pacientes infectados com HCV poderão desenvolver pelo menos uma manifestação extra-hepática durante o curso da doença (CACOUB et al., 2000; GALOSI et al., 2007).

As crioglobulinas são classificadas de acordo com a composição das imunoglobulinas (BROUET et al., 1974), sendo divididas em tipo I (exclusivamente monoclonal), tipo II (IgM monoclonal e IgG policlonal) e tipo III (exclusivamente policlonal). Podem ser encontradas entre 19-50% dos pacientes com infecção pelo HCV de acordo com diferentes estudos (LUNEL et al., 1994; WONG et al., 1996).

A crioglobulinemia mista é a mais conhecida e estudada síndrome associada à infecção pelo HCV. É uma vasculite sistêmica caracterizada pela deposição de crioglobulinas, (imunoglobulinas que se precipitam em temperaturas < 37°C) e de imunocomplexos séricos em vasos de pequeno e médio calibre. O mecanismo pelo qual a infecção pelo HCV leva à formação de crioglobulinas é incerto, mas pode estar relacionado com a persistência do HCV nas células do sistema imune e/ou com a estimulação crônica da resposta imune pelo HCV (MISIANI et al., 1992; ZIGNEGO et al., 1997).

A presença de crioglobulinas no soro, valores elevados de fator reumatóide (FR) e redução dos valores de C4 são os achados laboratoriais mais frequentes nas alterações extra-hepáticas da infecção pelo HCV (ZIGNEGO; CRAXI, 2008). A maioria dos pacientes com crioglobulinemia é assintomática, entretanto, os sintomas mais comuns em pacientes com crioglobulinemia mista são fraqueza, artralhas e púrpura (MELTZER et al., 1966), embora febre, citopenia, envolvimento renal, doenças pulmonares,

fenômeno de Reynaud, neuropatia periférica e síndrome sicca também tenham sido observados (FERRI et al.,2005).

1.2.5 Mecanismos de transmissão do HCV

O HCV é transmitido, principalmente, pela exposição ao sangue contaminado, sendo encontrado em elevadas concentrações no sangue periférico (LAM, 1999).

Até o início da década de 90, a transfusão de sangue constituía o mais importante mecanismo de transmissão de hepatite C em todo mundo. A partir da implementação de procedimentos de inativação de partículas virais no sangue e seus derivados, e também da utilização de testes sorológicos para detecção do HCV, o risco de transmissão associado à hemotransfusão foi reduzido substancialmente, sendo, atualmente, estimado em 0,01- 0,001% por unidade de bolsa transfundida (ALTER et al.,1999; MEMOM & MEMOM, 2002).

Em contraste com o perfil da década de 90, o uso de drogas injetáveis passou a responder por 68% dos casos atuais de HCV nos EUA e 80% das infecções pelo HCV na Austrália (SHEPARD et al., 2005). Nos usuários de drogas endovenosas (UDEV), a infecção é adquirida rapidamente, com 50-80% dos novos usuários infectando-se dentro de um período de 6-12 meses (ALTER et al.,1997), e mais de 90% apresentam anticorpos anti-HCV após cinco anos de uso de drogas.

O uso de cocaína inalatória como modo de transmissão do HCV ainda precisa ser mais bem estabelecido. Embora a transmissão possa ocorrer pelo compartilhamento de canudos e outros objetos contaminados com HCV, novos estudos demonstrando a associação do uso da cocaína intranasal e o HCV, independentemente do uso de drogas injetáveis, devem ser realizados (WASLEY & ALTER, 2000).

Pacientes submetidos à hemodiálise estão sob alto risco de infecção pelo HCV devido a fatores como transfusão sanguínea, imunossupressão parcial e frequentes intervenções parenterais (CARNEIRO et al., 2001). O risco de contaminação pode estar relacionado ao próprio procedimento, por transmissão horizontal, por via percutânea durante a punção das fístulas,

acidentes da diálise com derramamento de sangue e contato com material contaminado (NAGHETTINI et al., 1997).

A importância da transmissão sexual do HCV ainda é controversa. São observadas baixas prevalência de infecção em parceiros fixos de indivíduos com infecção crônica, o que levanta dúvidas sobre a transmissão sexual pelo HCV (WASLEY & ALTER, 2000). Esta forma de transmissão é de difícil comprovação, uma vez que outras vias de infecção podem estar presentes entre os membros do casal, como o uso compartilhado de utensílios que podem causar lesão e transmissão viral (TENGAN et al., 2001).

Há alguma evidência de transmissão ocupacional ou nosocomial. Porém, como a maioria dos indivíduos infectados com o HCV apresenta sintomas leves ou ausentes, a constatação dos casos de transmissão nosocomial nem sempre é facilmente estabelecida, e os episódios detectados representam uma pequena proporção dos casos. Portanto, é possível que eles ocorram mais frequentemente do que são geralmente detectados. Embora os profissionais da área da saúde estejam sujeitos à exposição ao sangue contaminado (ROSS et al., 2000), o risco de infecção nesta população não parece ser maior do que o encontrado na população geral de sua região de origem (WASLEY & ALTER, 2000).

Além das formas de transmissão mais frequentes, existe a possibilidade de contaminação através de procedimentos médicos, odontológicos, de acupuntura ou de tatuagem, uma vez que qualquer material cortante ou perfurante pode constituir um veículo transmissor do vírus de uma pessoa para outra. Objetos como alicate de unhas, lâmina de barbeiro ou mesmo escovas de dentes compartilhadas por cônjuges ou filhos podem ser potenciais formas de transmissão (STRAUSS, 2001).

1.3 Coinfecção HTLV-1/HCV

O interesse pela infecção do HTLV-1 e HCV tem adquirido enorme importância a partir dos estudos da coorte de Miyazaki, no Japão, que desde Novembro de 1984, acompanha a população de dois vilarejos do sul do Japão,

cuja característica principal é a presença de alta endemicidade para infecção pelo HTLV-1.

Nesse contexto, foram realizados, inicialmente, estudos de prevalência de coinfeção HTLV-1/HCV (BOSCHI-PINTO et al., 2000), sendo observadas altas taxas de ocorrência, calculadas em 28% dos adultos da população estudada.

Sabidamente, o HTLV é um vírus que compromete o sistema imune do hospedeiro, sendo associado de forma causal, com o desenvolvimento de LLTA e PET/MAH. Adicionalmente ao seu papel patogênico direto nessas doenças, a infecção pelo HTLV-1 é postulada para ser associada com outras doenças, em consequência de seus efeitos modulatórios, nos quais estão incluídas: uveíte, polimiosite, artropatia inflamatória crônica e insuficiência renal crônica (FERREIRA & NAVARRO, 2010).

O mecanismo exato da lesão hepática associado ao HCV não foi estabelecido. O HCV pode ser diretamente citotóxico aos hepatócitos infectados ou pode ocasionar danos mediante mecanismos imunomediados, relacionados à formação de complexos imunes ou à estimulação de resposta citotóxica rápida de linfócito T, podendo, indiretamente, conduzir à lesão hepática (ALTER, 1995).

Alguns trabalhos descrevem que a presença dos linfócitos T citotóxicos reativos ao HCV no tecido hepático é sugestiva de lise dos hepatócitos de origem imunomediada (KOZIEL et al., 1993; ZELDIS & JENSEN, 1994).

Por causa do papel postulado da imunidade celular no desenvolvimento e na progressão da doença hepática associada ao HCV (SHOUKRY et al., 2004), é razoável esperar que a infecção concomitante pelo HTLV-1 e o HCV possa contribuir para mudar a história natural de tal doença. Assim, é possível que a coinfeção pelo HTLV-1/HCV possa afetar o desenvolvimento de outras doenças e possa conduzir à mortalidade aumentada entre aqueles com a infecção combinada.

Enquanto a associação entre o HCV e o carcinoma hepatocelular está amplamente avaliada na literatura em sua relação causa-efeito, o mesmo não acontece quanto à interação do HTLV-1 sobre esse efeito. Alguns estudos sugerem que a coinfeção pelo HTLV-1/HCV aumente a chance de desenvolvimento do carcinoma ao acelerar a progressão da doença hepática associada ao HCV (OKAYAMA et al., 1995). Entretanto, outros estudos relatam

exatamente o contrário, não confirmando o aumento da incidência de carcinoma hepatocelular em indivíduos com hepatite C crônica coinfectados pelo HTLV-1 quando comparados com indivíduos mono infectados pelo HCV (STUVER et al.,1996).

Kishihara e colaboradores (2001) demonstraram alta prevalência de anticorpos anti-HCV (17,5%) e anti-HTLV-1 (30,3%) em 1106 pacientes acompanhados em clínicas ou hospitais na Ilha de Iki, no Japão. Demonstrou-se que ambas as infecções virais são endêmicas na ilha. Em um estudo preliminar, verificou-se que a transfusão de sangue poderia ser uma via comum para a disseminação do HTLV-1 e HCV (NAKASHIMA et al.,1994).

Estes dados da Ilha de Iki, no Japão, sugerem que a infecção pelo HTLV-1 pode estar relacionada à eliminação viral ineficaz, que é visto em pacientes com infecção pelo HCV. O comprometimento da resposta imunológica pelo HTLV-1 pode ajudar a explicar a reduzida eficácia do interferon (IFN) no tratamento de pacientes coinfectados com HTLV-1/HCV. Os resultados suportam a hipótese de que a coinfecção pelo HTLV-1 pode afetar o curso da doença hepática crônica causada pelo HCV (KISHIHARA et al.,2001).

2. JUSTIFICATIVA

O contexto exposto anteriormente ressalta a importância dos aspectos epidemiológicos e laboratoriais das infecções pelo HTLV-1 e HCV, de forma isolada, ou ainda na coinfeção (HTLV-1/HCV).

De forma a contribuir na compreensão dos fatores associados a essa coinfeção, evidenciando aspectos laboratoriais, o presente estudo se fez necessário. Sua realização justifica-se também pela importância epidemiológica que as infecções causadas pelo HTLV-1 e HCV apresentam em nosso país, sendo desde a sua descoberta, um problema de saúde pública no Brasil e no mundo.

As manifestações clínicas associadas à infecção pelo HCV se sobrepõem às observadas na infecção pelo HTLV-1, tornando necessário o estudo sistemático dos pacientes coinfectados com estes vírus.

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral:

Estudar aspectos epidemiológicos e biológicos relacionados à coinfeção (HTLV-1/HCV).

3.2 - Específicos:

- Estudar e comparar as variáveis sócio-demográficas nos pacientes coinfectados (HTLV-1/HCV) e mono infectados (HTLV-1 e HCV): sexo, idade, naturalidade, etilismo, uso de preservativos, aleitamento materno, uso de drogas, doenças sexualmente transmissíveis (DST), provável via de infecção, número de parceiros sexuais;
- Descrever e comparar as variáveis laboratoriais (hematológicas, imunológicas e bioquímicas) dos pacientes coinfectados (HTLV-1/HCV) e mono infectados (HTLV-1 e HCV);
- Determinar e comparar os níveis de carga viral do HCV nos pacientes coinfectados com HTLV-1 e mono infectados;
- Determinar e comparar a carga proviral do HTLV-1 nos pacientes coinfectados com HCV e mono infectados;

4. METODOLOGIA

4.1 - Delineamento do estudo

Trata-se de estudo transversal em uma coorte de paciente portadores da infecção pelo HTLV-1. Foram selecionados três grupos de pacientes, atendidos no período entre 2007 e 2009:

- Pacientes coinfectados com HTLV-1/HCV – Grupo HTLV-1/HCV;
- Pacientes monoinfectados com HTLV-1 – Grupo HTLV-1
- Pacientes monoinfectados com HCV – Grupo HCV.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/FIOCRUZ, tendo sido aprovado sob o número 028/2009 (Anexo A). Os pacientes monoinfectados pelo HCV tiveram origem no Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), incluídos em trabalho de Tese de Doutorado “Avaliação de fatores virais envolvidos na patogênese da trombocitopenia associada ao vírus da Hepatite C”, aprovada no CEP do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), nº 32/2004, de 30 de Agosto de 2004.

4.2 - Seleção de casos e controles

Foram considerados elegíveis como casos os pacientes adultos, com idade mínima de 18 anos, com diagnóstico de coinfecção pelo HTLV-1 e HCV (grupo HTLV-1/HCV), matriculados no IPEC e acompanhados no ambulatório de portadores do vírus HTLV.

Como controles, foram considerados elegíveis os pacientes monoinfectados pelo HTLV-1 (grupo HTLV-1), com idade mínima de 18 anos, matriculados no IPEC e atendidos no ambulatório de portadores do vírus HTLV.

Ainda como controles, foram considerados elegíveis os pacientes monoinfectados pelo HCV (grupo HCV), com idade mínima de 18 anos, matriculados no Hospital Universitário Gaffrée Guinle, com avaliação

neuroológica realizada no ambulatório do Grupo de atendimento para Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Os pacientes do grupo HTLV-1/HCV, definidos como casos, formaram uma amostra de conveniência compreendendo todos os pacientes coinfectados da coorte de HTLV-1. Os pacientes definidos como controles, grupo HTLV-1, foram selecionados de forma aleatória no banco de dados da coorte de HTLV-1, enquanto que o grupo HCV foi selecionado de forma aleatória de um banco de dados da coorte de pacientes com hepatite C crônica.

Os algoritmos de diagnóstico sorológico para os grupos mono infectados e coinfectado serão descritos de forma detalhada a seguir.

Todas as variáveis de interesse foram armazenadas em um banco de dados do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 16, e utilizado para análise estatística.

4.3 - Critérios de exclusão

Na seleção dos pacientes foram excluídos os indivíduos que:

- Apresentavam coinfecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), definida pela sorologia positiva pelo método enzimático (ELISA) e confirmado por reatividade pelo método *Western blot*;
- Apresentavam coinfecção pelo vírus da hepatite B (HBV), definida por reatividade ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAb) ou presença de anticorpos ao antígeno do core viral (anti-HBc total) por método imunoenzimático;
- Não compareceram para avaliação clínica e/ou laboratorial;
- Não concordância com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B).

4.4 - Coleta das amostras biológicas

Foram coletados 15 ml de sangue venoso periférico de cada indivíduo. Essas amostras foram divididas em três alíquotas: uma em tubo vacutainer

(Beckton & Dickinson, EUA) com EDTA foi utilizada para a realização de hemograma completo, carga proviral para o HTLV-1, contagem de linfócitos CD4+, CD8+, CD19+ e CD25+ por citometria de fluxo; as duas outras amostras foram coletadas em tubo vacutainer sem anticoagulante e foram utilizadas para realização dos testes laboratoriais, sendo uma alíquota armazenada a -30°C para futuros testes imunoenzimáticos e de biologia molecular. A coleta da amostra utilizada nos testes de detecção de crioglobulinas foi obtida após o pré-aquecimento por 30 minutos a 37°C de todo o material envolvido no procedimento (luvas, seringas, agulhas, tubos, algodão e garrote), sendo a amostra incubada em banho-Maria em igual período e temperatura antes da centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.

4.5 - Revisão dos prontuários médicos

Para coleta de dados dos pacientes foram analisados os prontuários médicos arquivados no Serviço de Estatística e Documentação (SED) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC). As seguintes informações, quando disponíveis, foram obtidas:

- Dados demográficos: sexo, idade, naturalidade.
- Fatores de risco: uso de drogas endovenosas, etilismo, histórico de transfusão sanguínea, número de parceiros sexuais, utilização de preservativos, passado de doenças sexualmente transmissível (DST), parceria sexual com indivíduos portadores de hepatite, HTLV-1 ou com usuários de drogas endovenosas, dentre outros.
- Dados Laboratoriais: concentração da hemoglobina, contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos, número de plaquetas, aspartato aminotransferase/Transaminase Glutâmico Oxalacética (AST/TGO), fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase/Transaminase glutâmico Pirúvica (ALT/TGP), gamaglutamiltransferase (GGT), hormônio estimulante da tireóide (TSH), bilirrubina total (BT), albumina, globulinas, fator reumatóide (FR), Complemento

C3 e C4, Imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, contagem de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD25⁺.

4.6 – Avaliação neurológica

Objetivando identificar manifestações neurológicas nos grupos estudados, os participantes do estudo foram submetidos a uma consulta com uma neurologista do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções, obtendo-se informações clínicas e epidemiológicas.

4.7 - Imunofenotipagem de linfócitos

A imunofenotipagem de linfócitos foi realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que são capazes de reconhecer antígenos na membrana da célula. Os anticorpos foram selecionados para reconhecer diferentes populações e subpopulações linfocitárias, permitindo estudar as populações de linfócito T (CD3⁺) e linfócito B (CD19⁺) e as subpopulações de T, linfócito T auxiliar (CD4⁺) e linfócito T citotóxico (CD8⁺). Representa também um marcador prognóstico utilizado em conjunto com a análise da carga viral, indicando a resposta imunológica celular e a evolução clínica da doença.

Para a quantificação dos linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD25⁺, 30µL de sangue total de cada indivíduo, coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA, foram incubados com 20µL dos anticorpos monoclonais (diluídos 1:10), anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE ou -PerCP, anti-CD19-PE e anti-CD25-PE humanos (Becton & Dickinson Biosciences, EUA), por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Como controles negativos foram utilizados 30µL de sangue total sem a marcação com anticorpos.

Após a incubação, as hemácias foram lisadas com a adição de solução de lise (BD Facs™ Lysing Solution, San Jose, EUA), sendo os leucócitos separados por centrifugação a 200 x g por 8 min. e, posteriormente, lavados com tampão fosfato (PBS). Por fim, as células foram fixadas em paraformaldeído a 1% em PBS (pH 7,4). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FacsCalibur (Becton & Dickinson Biosciences, EUA) utilizando o programa CellQuest, sendo adquiridos 10.000 eventos. A análise dos dados foi

realizada com o programa WinMDI 1.9, selecionando-se as células da região de linfócitos em uma janela de tamanho *versus* granulosidade (FS x SS), com os resultados emitidos em valores percentuais. Os valores absolutos das populações foram calculados indiretamente, multiplicando-se o valor percentual obtido pelo número total de linfócitos mensurado no contador de células Sysmex XT-1800i (Roche Diagnostics, EUA).

4.8 - Pesquisa e caracterização das crioglobulinas

A pesquisa de crioglobulinas no sangue foi realizada através do método de crioprecipitação, segundo o qual os tubos de Wintrobe foram preenchidos com 1 mL do soro dos pacientes e 10 μ L de azida sódica a 0,001% e mantidos a 4°C por até 7 dias, sendo observados diariamente a formação de precipitados ou floculação. Ao término desse período, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 minutos a 4°C e, posteriormente, quando presentes, os precipitados foram lavados por 4 vezes com tampão fosfato (PBS) em centrífuga refrigerada a 4°C para eliminação de possíveis proteínas inespecíficas. Após a lavagem foram adicionados 1 mL de PBS ao precipitado e procedeu-se a incubação em banho-maria a 37°C por uma hora. Precipitados constituídos de crioglobulinas se dissolvem após este aquecimento, confirmando a presença de crioglobulinas.

4.9 – Quantificação da carga proviral (CPV) do HTLV-1

A quantificação da carga proviral para HTLV-1 em leucócitos totais e células mononucleares do sangue periférico foi realizada por meio da técnica da PCR em tempo real (Smartcycler, Cepheid, EUA), utilizando o conjunto de reagentes comercial para amplificação TaqMan (Applied BioSystems, EUA). O fragmento amplificado foi a região *tax*. Uma curva-padrão foi gerada utilizando-se o gene β -globina e o gene *tax* da linhagem celular TARL-2, que contém uma única cópia do provirus HTLV-1. A carga proviral em 10⁴ células foi calculada pela seguinte

fórmula: [número de cópias do gene *tax*/(número de cópias do gene globina/2)] x 10⁴ (SILVA et al., 2007).

4.10 – Diagnósticos da infecção pelo HTLV-1 e HCV

4.10.1 - Diagnóstico da infecção pelo HTLV-1

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 foi realizado através dos seguintes métodos:

- Detecção de anticorpos específicos no soro dos pacientes, por ensaio imunoenzimático (ELISA) de segunda ou terceira geração, com resultado positivo em uma primeira amostra de sangue periférico, realizado segundo recomendações do fabricante;
- Confirmação de sororreatividade pelo método Western Blot.
- Amplificação genômica de sequências provirais de HTLV-1/2 pela técnica da PCR (Heneine et al., 1992), realizada em uma segunda amostra de sangue periférico, quando os resultados do Western blot foram indeterminados ou inconclusivos.

4.10.2 - Diagnóstico de infecção pelo HCV

O diagnóstico de infecção pelo HCV foi realizado através dos seguintes métodos:

- Teste imunoenzimático (ELISA/EIE) de segunda ou terceira geração, com resultado positivo em uma primeira amostra de sangue periférico, realizado segundo recomendações do fabricante;
- Amplificação genômica do RNA do HCV (Amplicor[®] HCV Test, v 2.0), por meio de reação em cadeia de polimerase após síntese de cDNA por transcrição reversa (RT-PCR), a partir de uma segunda amostra de sangue periférico.

De modo complementar, realizou-se a genotipagem do vírus da hepatite C (Versant™ HCV Genotype Assay – LiPA, Bayer Corporation, Tarrytown, Nova Iorque, EUA), utilizando-se um teste de hibridação reversa com sondas de oligonucleotídeos, capaz de identificar os genótipos 1 a 6 do HCV, e a quantificação da carga viral do HCV (Cobas™ Amplicor HCV Monitor Test, v 2.0, Roche).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Foi criado um banco de dados no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 16, para as análises estatísticas.

Foram descritas as frequências simples das variáveis categóricas sócio-demográficas (sexo, naturalidade, idade) e clínico-epidemiológicas (uso de preservativos, quantidade de parceiros sexuais, uso de drogas, aleitamento materno, histórico de DST, transfusão, etilismo). As variáveis contínuas foram descritas através das medidas-resumo de acordo com cada variável como: média, mediana, desvio-padrão e intervalo-interquartilico (IQR).

A comparação das variáveis categóricas segundo os diferentes grupos foi feita por teste qui-quadrado de Pearson com correção de Yates e qui-quadrado para tendência, no caso de tabelas com baixas contagens (menores que 5) ou tabelas formadas por duas linhas e duas colunas (2x2).

O teste não-paramétrico de Kolmogorov-Smirnov foi empregado na verificação da normalidade das variáveis contínuas, com p-valor <0,05 indicando rejeição da hipótese de normalidade dos dados. A comparação da distribuição das variáveis contínuas segundo diversos grupos (monoinfectado HTLV-1, monoinfectado HCV e coinfectado HTLV-1/HCV) foi realizada por testes paramétricos (teste t e One-Way ANOVA sem replicação) e, no caso de distribuição não-normal, foram empregados testes não paramétricos (Mann-Whitney para a comparação entre dois grupos e Kruskal Wallis para comparação de mais de dois grupos). Quando aplicável, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni.

As medidas de correlação entre as variáveis contínuas foram realizadas pelas provas de Pearson ou Spearman, de acordo com a distribuição da variável contínua. P-valor <0,05 foi considerado estaticamente significativa.

6. RESULTADOS

Participaram desta pesquisa 146 pacientes, sendo 50 (34,2%) coinfectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 e vírus da hepatite C (grupo HTLV-1/ HCV), 46 (31,6%) monoinfectados pelo vírus da hepatite C (grupo HCV) e 50 (34,2%) monoinfectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas (grupo HTLV-1).

6.1 Análises das variáveis sócio-demográficas e de fatores de exposição

Em seu conjunto, a série de casos e controles estudada envolveu 73 (50,0%) pacientes do sexo masculino (HTLV-1/HCV, $n=32$; HTLV-1, $n=21$; HCV, $n=20$) e 73 (50,0%) do sexo feminino (18 HTLV-1/HCV coinfectados, 29 HTLV-1 monoinfectados, 26 HCV monoinfectados), com idades compreendidas entre 21 e 80 anos (com média de idade de 51,3 anos \pm 13,81 anos. Houve predomínio de indivíduos naturais do Estado do Rio de Janeiro ($n=93$; 63,7%).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação às características sócio-demográficas analisadas, segundo sua classificação nos grupos HTLV-1, HTLV-1/HCV ou HCV (tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das frequências das características sócio-demográficas em relação aos grupos estudados

Variável	Grupo (n=146)						p-valor
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	n	%	
Gênero							0,050 *
Masculino	21	42,0	32	64,0	20	43,5	
Feminino	29	58,0	18	36,0	26	56,5	
Faixa etária (anos)							**
de 20 a 39	16	32,0	6	12,0	7	15,2	
de 40 a 59	21	42,0	34	68,0	23	50,0	
> 60	13	26,0	10	20,0	16	34,8	
Naturalidade							0,333 *
Rio de Janeiro	32	64,0	33	66,0	28	60,9	
Outros Estados	18	36,0	17	34,0	18	39,1	

* Qui-Quadrado de Pearson

** Qui-Quadrado de Pearson para tendência

HTLV-1 vs HTLV-1/HCV, $p= 0,2967$;

HTLV-1 vs HCV, $p= 0,0879$;

HTLV-1/HCV vs HCV, $p=0,3634$

Em relação ao uso de álcool, verificou-se o relato desse hábito em 42 (32,3%) dos pacientes, sendo mais frequente nos pacientes mono infectados pelo HCV, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – Frequência de ingestão de álcool em relação aos grupos estudados

Variável	Grupo (n=146)						p-valor
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	n	%	
Ingestão de álcool							0,001 *
Não	41	87,2	23	62,2	24	52,2	
Sim	6	12,8	14	37,8	22	47,8	

* Qui-quadrado de Pearson

HTLV-1 vs HTLV-1/HCV, $p=0,0074$;

HTLV-1/HCV vs HCV, $p= 0,3614$

HTLV-1 vs HCV, $p=0,0002$;

HTLV-1 vs HTLV-1/HCV + HCV, $p= 0,0003$

Na tabela 3 é apresentada a distribuição das frequências das variáveis de risco de exposição em relação aos grupos estudados.

Ao se avaliar as variáveis de risco de exposição às infecções de transmissão sanguínea ou sexual, observamos diferença estatisticamente significativa na proporção de pacientes que relataram terem sido usuários de drogas endovenosas (UDEV) ($p<0,001$), especialmente no grupo de pacientes HTLV-1/HCV ($n=17$). Enquanto que somente 2,0% ($n=1$) e 4,3% ($n=2$) dos indivíduos alocados nos grupos HTLV-1 e HCV referiram tal exposição, respectivamente.

Observamos, nos grupos estudados, a presença de passado de doenças sexualmente transmissíveis (DST) em 45 pacientes (31,5%) , assim como, 90,0% dos indivíduos declararam a não utilização do uso de preservativos nas relações sexuais. Por outro lado, a maioria (58,8%) declarou ter tido menos de 5 parceiros sexuais durante toda a vida.

Em relação às outras variáveis de risco de exposição a infecções de transmissão sanguínea ou sexual, o histórico de transfusão sanguínea e o número de parceiros sexuais, mostraram significância estatística ($p<0,001$) entre os grupos analisados, sendo o passado de transfusão sanguínea

presente em 63% dos pacientes do grupo HCV e 41,3% no grupo HTLV-1/HCV.

Ao analisar a provável via de infecção para aquisição de ambos os vírus, observamos que a via sexual foi mais frequente no grupo HTLV-1 enquanto que o passado de transfusão sanguínea foi mais frequente nos indivíduos portadores de HCV ($p < 0,001$).

Tabela 3 – Comparação entre os grupos das variáveis de risco de exposição às infecções de transmissão sanguínea ou sexual.

Variável	Grupo (n=146)						p-valor *
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	n	%	
Uso de Drogas (UDEV)							< 0,001
Sim	1	2,0	17	38,6	2	4,3	
Não	48	98,0	27	61,4	44	95,7	
DST							0,012
Ausente	34	69,4	26	54,2	38	82,6	
Presente	15	30,6	22	45,8	8	17,4	
Uso de Preservativos							0,089
Sempre	4	11,8	0	-	7	15,2	
Nunca	30	88,2	30	100	39	84,8	
Nº parceiro sexual							0,091
< 5	21	77,8	11	39,3	29	63,0	
5 - 10	1	3,7	6	21,4	7	15,2	
11 - 20	2	7,4	3	10,7	4	8,7	
> 20	3	11,1	8	28,6	6	13,1	
Hemotransusão							< 0,001
Sim	8	16,3	19	43,2	29	63,0	
Não	41	83,7	25	56,8	17	37,0	
Provável via de infecção							< 0,001
Sexual	25	55,6	12	29,3	7	19,4	
Transusão	6	13,3	16	39,0	29	80,6	
Uso de drogas	0	0	11	26,8	0	0	
Amamentação- vertical	14	31,1	2	4,9	0	0	

* Qui-quadrado de Pearson com correção de Yates

Em relação à presença de manifestações neurológicas, observamos que os indivíduos alocados no grupo HTLV-1/HCV apresentaram, de forma significativa, maior frequência de manifestações neurológicas, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição das frequências do estado neurológico em relação aos grupos estudados

Variável	Grupo						<i>p</i> -valor *
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	n	%	
Estado Neurológico							<0,001
Assintomático	25	50,0	14	28,0	34	73,9	
Sintomático	25	50,0	36	72,0	12	26,1	

* Qui-quadrado de Pearson

HTLV-1/HCV vs HCV, $p < 0,0001$ (OR=7,286; IC 95%= 2,955 - 17,966);

HTLV-1 vs HCV, $p = 0,0162$ (OR=2,833; IC 95%= 1,198 - 6,700);

HTLV-1 vs HTLV-1/HCV, $p = 0,0241$ (OR= 0,3889; IC 95%= 0,1696 – 0,8918).

A comparação entre o grupo monoinfetado pelo HCV com o grupo HTLV-1/HCV revelou que a presença da coinfeção aumenta significativamente a presença da manifestação neurológica, principalmente a mielopatia ($p < 0,0001$; OR=7,286, IC 95% = 2,955 – 17,966) (tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre os grupos HTLV-1 e HTLV-1/HCV referente às principais manifestações neurológicas

Variável	Grupos				<i>p</i> -valor *
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		
	n	%	n	%	
Estado Neurológico					<0,011
Mielopatia	15	30,0	26	52,0	
Mielopatia + NP	7	14,0	6	12,0	
NP isolada	0	0	4	8,0	
BN isolada	3	6,0	0	0	

* Qui-quadrado de Pearson; NP, Neuropatia Periférica; BN, Bexiga Neurogênica

A tabela 6 discrimina as manifestações neurológicas encontradas, sendo a mielopatia observada somente nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e a neuropatia periférica predominando nos portadores do HCV

Tabela 6 – Comparação entre os grupos referente às principais manifestações neurológicas

Variável	Grupos						<i>p</i> -valor *
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	n	%	
Estado Neurológico							<0,001
Mielopatia	15	30,0	26	52,0	0	0	
Mielopatia + NP	7	14,0	6	12,0	0	0	
NP isolada	0	0	4	8,0	9	19,6	
BN isolada	3	6,0	0	0	0	0	
ONA	0	0	0	0	3	6,5	

* Qui-quadrado de Pearson ONA, Outras Anormalidades Neurológicas; NP, Neuropatia Periférica; BN, Bexiga Neurogênica

6.2 Análise das variáveis laboratoriais

No que se refere à avaliação hematológica, a determinação da concentração plasmática da hemoglobina, o número total de leucócitos, neutrófilos e linfócitos em sangue periférico não foram observadas diferenças entre os grupos estudados (tabela 7).

Tabela 7 – Análise univariada e bivariada dos parâmetros hematológicos em relação aos grupos estudados

Variável	Grupo	Média	DP	Mínimo	Máximo	p-valor *
Hemoglobina (g/dL)	HTLV-1	13,25	1,53	9,0	16,5	0,225
	HTLV-1/HCV	13,37	2,09	7,9	17,5	
	HCV	13,84	1,56	9,4	16,9	
Leucócitos (mil/mm ³)	HTLV-1	6,30	1,72	2,6	10,8	0,606
	HTLV-1/HCV	6,44	1,89	3,0	10,7	
	HCV	6,06	2,02	3,4	11,6	
Neutrófilos (mil/mm ³)	HTLV-1	3,46	1,31	1,34	6,78	0,975
	HTLV-1/HCV	3,41	1,22	1,51	6,63	
	HCV	3,46	1,39	1,49	7,58	
Linfócitos (mil/mm ³)	HTLV-1	2,13	0,81	0,52	5,25	0,847
	HTLV-1/HCV	2,23	0,89	0,66	4,44	
	HCV	2,20	1,02	0,90	6,15	
Plaquetas (mil/mm ³)	HTLV-1	242,32	78,79	121,00	540,00	< 0,001
	HTLV-1/HCV	218,31	57,65	105,00	396,00	
	HCV	175,98	78,49	60,00	356,00	

* One-Way ANOVA , sem replicação

Pós-teste de Bonferroni (Plaquetas):

HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p=0,301;

HTLV-1/HCV vs HCV, p= 0,015;

HTLV-1 vs HCV, p < 0,001

Entretanto, em relação à contagem de plaquetas, observamos valores medianos significativamente menores no grupo HCV (Figura 7), assim como a frequência de plaquetopenia (plaquetas $< 150.000/\text{mm}^3$) foi maior no grupo HCV, mesmo quando comparado com o grupo de coinfectados ($p < 0,001$) (tabela 8).

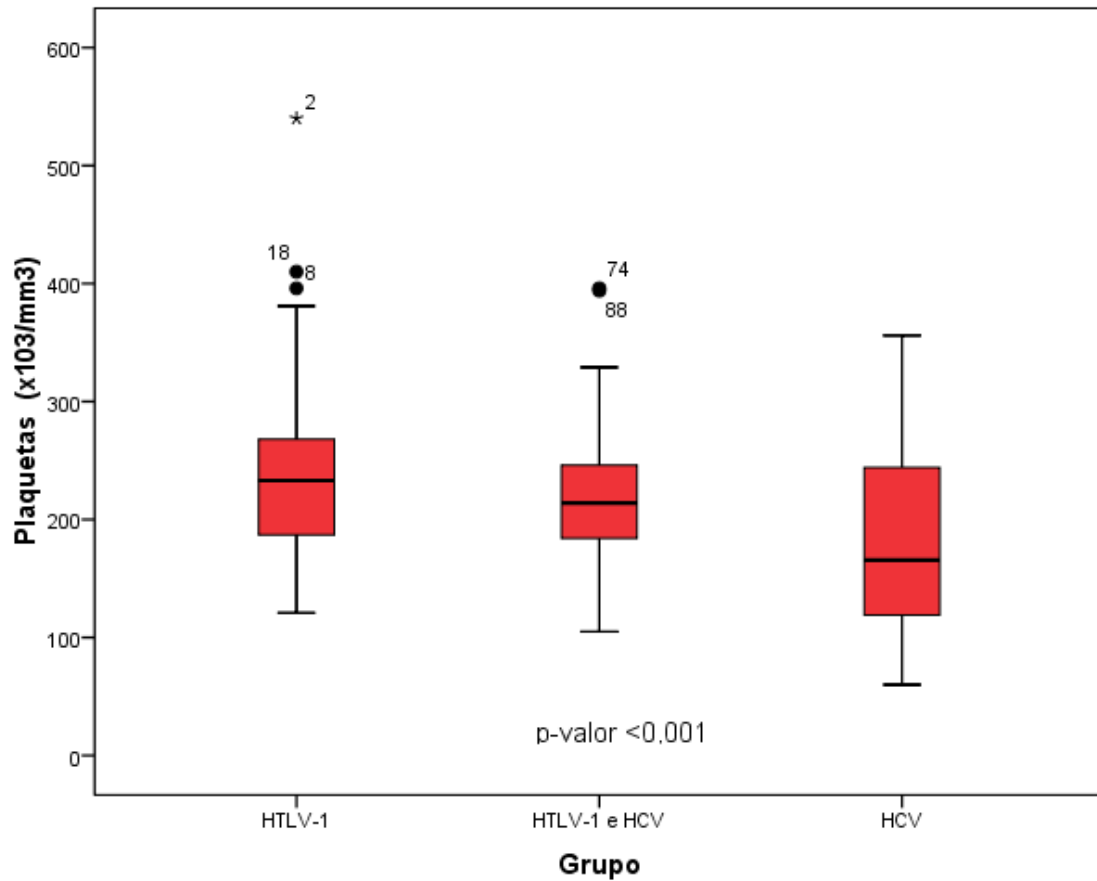


Figura 7. Diagrama de caixas da contagem de plaquetas de pacientes dos grupos HTLV-1 (Md=233,00), HTLV-1/HCV (Md= 214,00) e HCV (Md=165,50). A caixa central representa os valores do primeiro quartil (25%) ao terceiro quartil (75%) e a mediana é mostrada como uma linha média horizontal. Valores atípicos foram observados nos grupos HTLV-1 e HTLV-1/HCV.

Tabela 8 – Comparação entre os grupos HTLV-1/HCV e HCV em relação à presença de plaquetopenia

Variável	Grupos (n=95)				p-valor *
	HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	
Plaquetopenia					0,0028
Ausente	43	87,76	27	58,7	
Presente	6	12,24	19	41,3	

* Teste qui-quadrado de Pearson com correção de Yates
(p=0,0028, OR=5,351; IC 95%=1,875 – 14,853)

Em relação à análise bioquímica, verificamos diferenças estatísticas significativas das concentrações de AST/TGO, ALT/TGP, GGT, FA e BT entre os grupos, conforme descrito na tabela 9.

Tabela 9 – Comparação das medianas das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos em relação aos grupos estudados

Variável	Grupos (n=146)						p-valor *
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	Md	IQR	Md	IQR	Md	IQR	
TGO/AST (U/L)	24,00	17,50 - 35,00	37,50	23,75 - 52,09	58,50	31,00 - 90,75	<0,001
TGP/ALT (U/L)	30,5	23,00 - 35,25	54,50	34,25 - 79,91	63,00	36,00 - 136,00	<0,001
GGT (U/L)	27,00	19,00 - 45,00	58,00	35,81 - 150,75	64,00	24,40 - 120,00	<0,001
FA (U/L)	101,00	101,00 - 149,75	81,15	65,25 - 100,00	189,00	139,00 - 225,75	<0,001
BT (mg/dL)	0,60	0,40 - 0,60	0,52	0,42 - 0,73	0,70	0,50 - 1,04	0,009

* Kruskal-Wallis; Md, Mediana; IQR, Intervalo Interquartilico

Pós-teste de Bonferroni:

TGO/AST - HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p= 0,002; HTLV-1/HCV vs HCV, p<0,001; HTLV-1 vs HCV, p<0,001

TGP/ALT - HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p= 0,013; HTLV-1/HCV vs HCV, p<0,010; HTLV-1 vs HCV, p<0,001

Gama GT - HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p= 0,027; HTLV-1/HCV vs HCV, p=1,000; HTLV-1 vs HCV, p<0,250

FA - HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p= 0,330; HTLV-1/HCV vs HCV, p<0,001; HTLV-1 vs HCV, p<0,001

BT - HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p= 1,000; HTLV-1/HCV vs HCV, p=0,366; HTLV-1 vs HCV, p=1,000

Na comparação entre os grupos em relação à presença de parâmetros bioquímicos com valores aumentados no soro, verificamos diferenças estatísticas significativas de AST/TGO e FA entre os grupos estudados, conforme descrito na tabela 10.

Tabela 10 – Comparação entre os grupos HTLV-1/HCV e HCV em relação à presença de enzimas hepáticas aumentadas

Variável	Grupos				p-valor *
	HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	
TGO/AST (n=88)					0,068
Normal (VR=12 - 46 U/L)	26	54,2	13	32,5	
Aumentada	22	45,8	27	67,5	
TGP/ALT (n=87)					0,327
Normal (VR=3 - 50 U/L)	32	66,7	22	56,4	
Aumentada	16	33,3	17	43,6	
FA (n=88)					0,001
Normal (VR=65 - 300 U/L)	42	91,3	9	22,5	
Aumentada	4	8,7	31	77,5	
GGT (n=82)					0,687
Normal (VR=11 - 50 U/L)	26	57,8	23	62,2	
Aumentada	19	42,2	14	37,8	
BT (n=82)					0,063
Normal (VR=12-46 mg/dL)	38	90,5	30	75,0	
Aumentada	4	9,5	10	25,0	

* Teste qui-quadrado de Pearson com correção de Yates

Com relação aos resultados laboratoriais das dosagens séricas de C3, C4, TSH, albumina, IgA e IgM, não observamos diferenças significativas entre os grupos (Tabela 11). Entretanto, a média da concentração de IgG foi superior no grupo HTLV-1/HCV ($p=0,005$) (Figura 8). Os grupos com infecção pelo HCV apresentam níveis anormalmente elevados quando comparados ao grupo HTLV-1 isolado ($p=0,035$, $\chi^2= 6,690$).

Tabela 11 – Comparação das concentrações séricas médias de C3, C4, TSH, albumina e imunoglobulinas em relação aos grupos estudados

Medida	Grupo	Média	DP	Mínimo	Máximo	p -valor *
C3 (mg/dL)	HTLV-1	124,74	28,06	83,40	209,00	0,994
	HTLV-1/HCV	124,69	30,93	76,80	187,00	
C4 (mg/dL)	HTLV-1	29,26	11,02	9,60	63,00	0,055
	HTLV-1/HCV	24,60	8,68	8,1	46,00	
TSH μ UI/L	HTLV-1	2,98	3,95	0,84	21,65	0,512
	HTLV-1/HCV	2,18	1,75	0,59	8,16	
	HCV	2,40	1,80	0,37	10,30	
Albumina (mg/dL)	HTLV-1	4,25	0,75	2,8	5,9	0,762
	HTLV-1/HCV	4,15	0,63	3,1	6,2	
	HCV	4,23	0,43	2,8	4,9	
IgG (mg/dL)	HTLV-1	1530,84	389,34	179,00	2296,00	0,005
	HTLV-1/HCV	1920,39	583,81	1093,00	3375,00	
	HCV	1797,80	606,51	708,00	3930,00	
IgA (mg/dL)	HTLV-1	337,72	138,35	150,00	665,00	0,068
	HTLV-1/HCV	294,70	116,00	103,00	589,00	
IgM (g/dL)	HCV	269,01	143,46	84,00	794,00	0,244
	HTLV-1	179,94	106,26	46,90	670,00	
	HTLV-1/HCV	172,49	114,15	50,8	709,00	
	HCV	143,46	72,98	52,60	426,00	

* One-Way ANOVA sem replicação

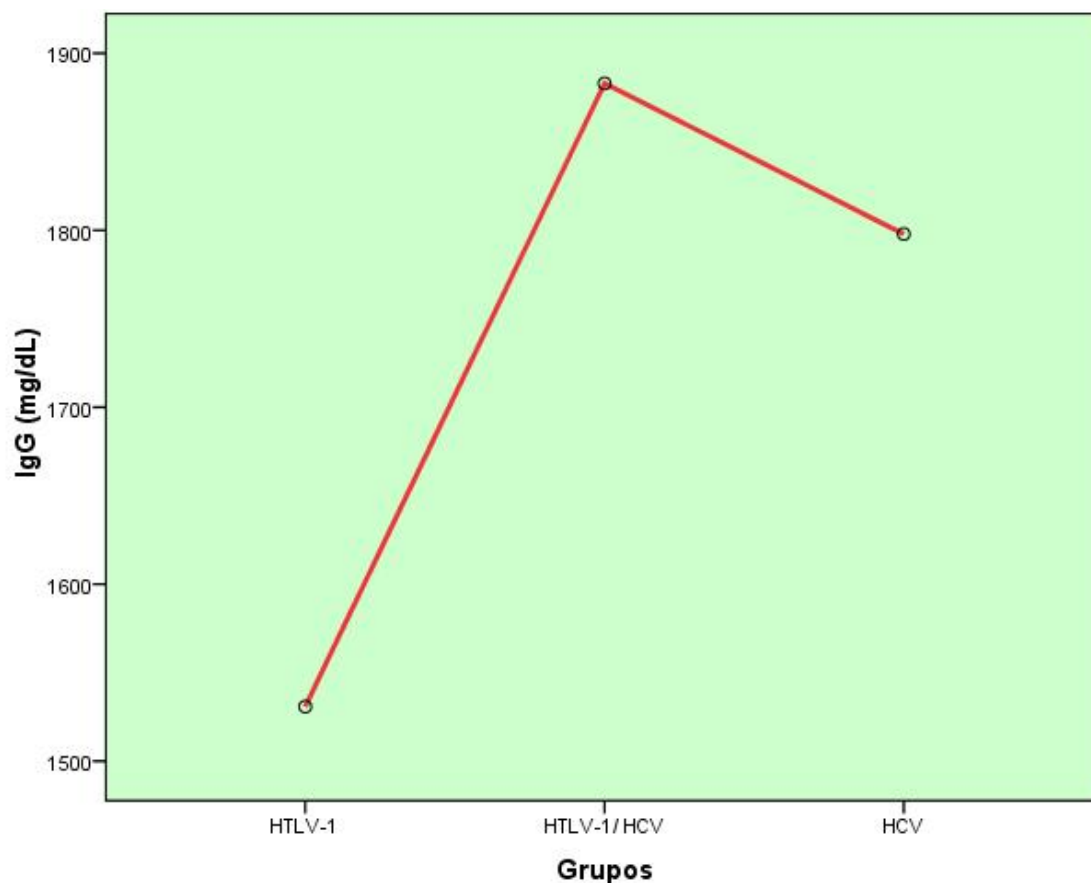


Figura 8. Comparação entre as médias das concentrações séricas de IgG nos três grupos estudados.

A análise da genotipagem do vírus da hepatite C demonstrou uma maior prevalência do genótipo 1 em ambos os grupos HTLV-1/HCV e HCV ($p= 0,452$) (Tabela 12). Doze pacientes do grupo HTLV-1/HCV não tiveram o genótipo determinado por apresentarem carga viral inferior ao limite mínimo de detecção quantitativa do HCV-RNA (600 a 700.000 UI/mL para o teste Monitor Amplicor versão 2.0). Alguns resultados relacionados a genotipagem não foram incluídos porque estavam em processo de realização durante esta pesquisa. Cabe destacar que esses pacientes apresentavam história epidemiológica e sucessivas reatividades ensaios imunoenzimáticos (ELISA), inclusive de 3ª geração, tornando-os compatíveis com a infecção pelo HCV.

Tabela 12 – Prevalência dos genótipos do HCV nos pacientes com coinfeção pelos vírus HTLV-1/HCV e infecção pelo vírus da hepatite C

Genótipo HCV	Grupo				
	HTLV-1/HCV		HCV		Total
	n	%	n	%	
1	24	82,76	34	91,89	58
3	5	17,24	3	8,11	8
Total	29	100	37	100	66 *

* Genótipo não disponível para 21 indivíduos do grupo HTLV-1/HCV e 09 indivíduos do grupo HCV.

A comparação da carga viral do HCV entre os grupos HTLV-1/HCV e HCV não evidenciou diferenças estatísticas significativas (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise da carga viral do HCV em pacientes com infecção pelo HCV e coinfeção HTLV-1/HCV

Medida	Grupo		p-valor*
	HTLV-1/HCV	HCV	
Carga viral do HCV (UI/mL)			0,434
Média	1.177.430	1.696.539	
Mediana	847.500	850.000	
DP	1.120.465	2.106.224	
Valor Mínimo	17.800	146.713	
Valor Máximo	4.190.000	7.780.374	

* Mann-Whitney

A quantificação do número de leucócitos infectados pelo HTLV-1 – carga proviral- forneceu valores medianos semelhantes entre os grupos infectados pelo HTLV-1 (HTLV-1/HCV e HTLV-1) (Tabela 14). A presença da coinfeção não alterou o aumento de carga proviral observado nos indivíduos com acometimento neurológico.

Tabela 14 - Análise da carga proviral em pacientes com infecção pelo HTLV-1 e coinfeção pelo HTLV-1/HCV

Variável	Grupos				<i>p</i> -valor *
	HTLV-1 (n=45)		HTLV-1/HCV (n=45)		
	Md	IQR	Md	IQR	
Carga Proviral (%) **	5,30	1,19 – 12,51	5,95	1,06 – 9,32	0,779

* Mann-Whitney; ** leucócitos infectados; Md, Mediana; IQR, Intervalo Interquartilício ;

Ao avaliarmos a presença de crioglobulinemia nos grupos estudados não se observou diferenças estatísticas significativas (Tabela 15) , mesmo quando a comparação foi realizada apenas entre os grupos HTLV-1/HCV e HCV($p=0,1871$).

Tabela 15 - Análise da presença de Crioglobulinemia entre pacientes com infecção pelo HCV, HTLV-1 e coinfeção HTLV-1/HCV

Variável	Grupos						<i>p</i> -valor *
	HTLV-1		HTLV-1/HCV		HCV		
	n	%	n	%	n	%	
Crioglobulinemia							0,4043
Presente	2	11,80	6	19,40	3	8,30	
Ausente	15	88,20	25	80,60	33	91,70	
Total	17		31		36		

* Qui-quadrado de Pearson

A análise das populações e subpopulações de linfócitos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Observou-se um aumento do número de células T CD8⁺ nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, mais acentuado no grupo de coinfectados (tabela 16 e figura 9).

Tabela 16 - Distribuição e comparação dos resultados observados nas imunofenotipagens de linfócitos entre os grupos estudados

Medida	Grupos			p-valor *
	HTLV-1	HTLV-1/HCV	HCV	
CD4⁺ (células/mm³)				0,053
Média	1114,44	987,31	849,00	
DP	391,09	386,39	374,19	
Valor mínimo	409,00	353,00	459,00	
Valor máximo	2051,00	1693,00	1742,00	
CD8⁺ (células/mm³)				0,006
Média	676,64	787,89	457,00	
DP	354,27	439,70	179,96	
Valor mínimo	145,00	139,00	169,00	
Valor máximo	1580,00	1662,00	810,00	
CD19⁺ (células/mm³)				0,752 **
Média	-	223,22	210,00	
DP	-	141,89	120,71	
Valor mínimo	-	44,00	90,00	
Valor máximo	-	545,00	534,00	
CD25⁺ (células/mm³)				0,354 **
Média	-	616,33	526,13	
DP	-	356,46	250,24	
Valor mínimo	-	79,00	245,00	
Valor máximo	-	1546,00	1244,00	

* One-Way ANOVA sem replicação ** Teste t de Student não-pareado

Pós-teste de Bonferroni (CD8⁺):

HTLV-1/HCV vs HTLV-1, p=0,6030 (IC 95%= 99,49 – 321,97);

HTLV-1/HCV vs HCV, p= 0,0045 (IC 95%= 84,29-577,49);

HTLV-1 vs HCV, p=0,1076 (IC 95%= 31,90-471,19)

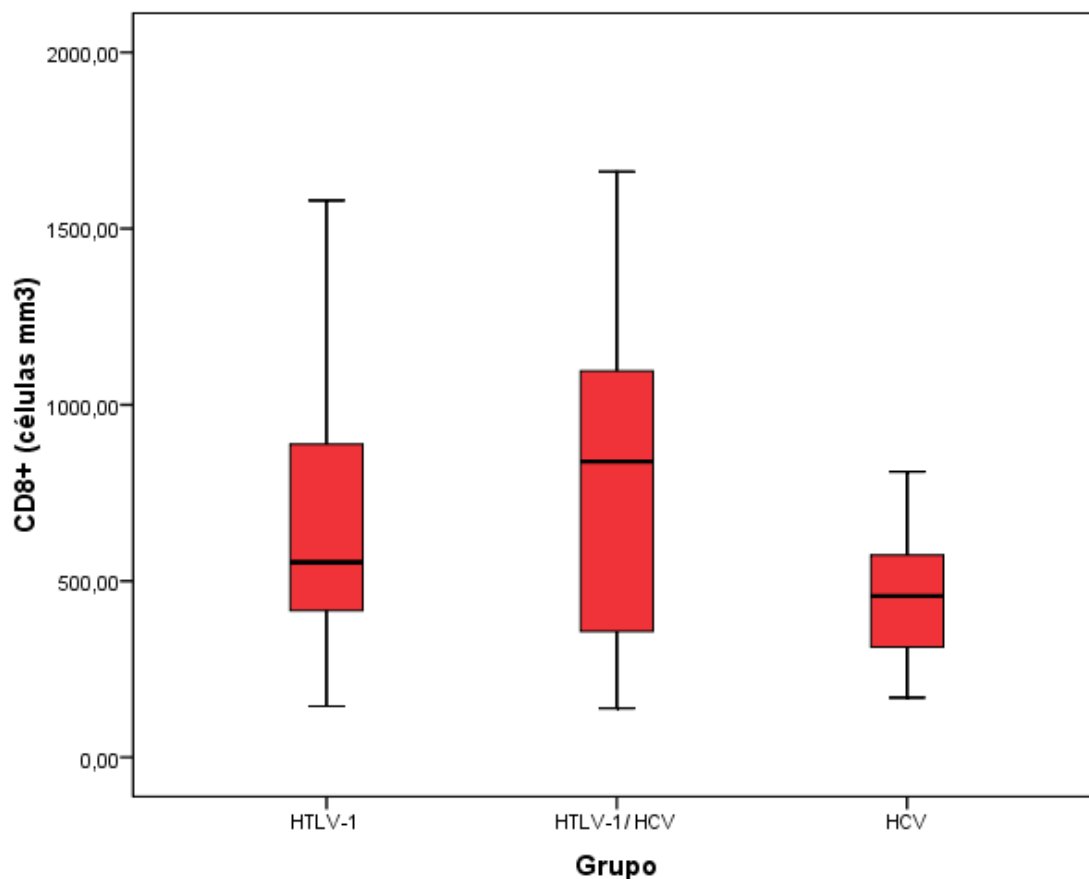


Figura 9. Diagrama de caixas das imunofenotipagens de linfócitos CD8⁺ de pacientes dos grupos HTLV-1 (Md=553,50), HTLV-1/HCV (Md= 839,00) e HCV (Md=457,50). A caixa central representa os valores do primeiro quartil (25%) ao terceiro quartil (75%) e a mediana é mostrada como uma linha média horizontal.

7. DISCUSSÃO

A coinfeção pelo vírus da hepatite C (HCV) e vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) constitui tema de grande interesse em função da relevância epidemiológica dessas infecções em nossa população; no entanto, existem poucas referências bibliográficas sobre o assunto. Em nosso estudo, visando estudar aspectos epidemiológicos e biológicos dessa coinfeção, comparamos três grupos de pacientes: coinfectados HTLV-1/HCV, monoinfectados com HCV e monoinfectados com HTLV-1. É importante salientar que, na seleção de pacientes, excluímos aqueles que apresentaram evidência de infecção pregressa ou atual de hepatite B (HBV) e/ou HIV, devido ao viés que poderiam trazer ao estudo, em função do potencial dano hepatocelular e imunodepressão que esses vírus podem acarretar.

Em relação aos aspectos epidemiológicos, não se evidenciou qualquer variável relacionada a infecção pelo HTLV-1, de forma isolada ou concomitantemente ao HCV, excetuando-se histórico de DST e uso de álcool. A monoinfecção pelos vírus HCV e HTLV-1 predominou em pacientes do sexo feminino (56,5% e 58,0%, respectivamente), enquanto que a coinfeção HTLV-1/HCV esteve presente em 64,0% dos pacientes do sexo masculino. Quanto à faixa etária, houve predomínio nos grupos HTLV-1, HTLV-1/HCV e HCV de indivíduos com idades entre 40 a 59 anos. Estes achados enfatizam o característico aumento da prevalência de infecção pelo HTLV-1 com o aumento da idade, conforme descrito por Catalan-Soares e colaboradores (2001).

A predominância do sexo masculino no grupo HTLV-1/HCV sugere um padrão de acometimento diferente do habitual, já que em monoinfectados HTLV-1 espera-se o predomínio da infecção entre as mulheres (CATALAN-SOARES et al., 2001). Este padrão também se repetiu nos estudos de Okayama e colaboradores (1995) e de Magalhães (2006), nos quais o sexo masculino foi o mais prevalente entre os coinfectados (66,6% e 73,3%, respectivamente).

De modo curioso e a despeito da orientação médica sobre a importância da abstenção alcoólica, o relato do uso de álcool foi estatisticamente mais frequente nos grupos HTLV-1/HCV e HCV. Cabe destacar ainda que essa variável pode ter sido avaliada de forma imprecisa, uma vez que não se

conseguiu obter de forma adequada a informação sobre a quantidade de álcool ingerida ou seu tempo de uso.

Quanto às categorias de exposição aos vírus, a transfusão sanguínea constituiu a provável via de infecção mais frequente no grupo HCV (80,6%) e HTLV-1/HCV (39,0%), entretanto, observamos uma frequência significativa maior de UDEV na coinfeção, sugerindo que esta categoria de exposição seja mais importante para aquisição desses vírus na coorte estudada. Já foi relatada como mais comum a presença de coinfeção HCV/HTLV-2 em usuários de drogas injetáveis (HISADA et al 2003). A transmissão sexual (55,6%) ocorreu com maior predominância no grupo HTLV-1 ($p < 0,001$). A transmissão da hepatite C por via sexual apresenta baixa prevalência e, portanto, menor importância epidemiológica. Por outro lado, embora, na atualidade, haja uma maior frequência de casos novos de hepatite C em usuários de drogas injetáveis, a transmissão relacionada à hemotransfusão prévia (anterior a 1994) ainda constitui o fator de exposição ao HCV mais prevalente (MEMON & MEMON, 2002).

A infecção crônica pelo HCV está associada ao desenvolvimento de diversas manifestações extra-hepáticas, incluindo complicações neurológicas (ACHARYA & PACHECO, 2008). A classificação dos pacientes com base na presença ou ausência dos sintomas neurológicos (sintomáticos e assintomáticos) apresentou diferenças estatísticas significativas, com uma maior frequência de indivíduos sintomáticos no grupo HTLV-1/HCV (72,0%). Os indivíduos coinfectados apresentaram mais sintomatologia neurológica, sugerindo que a presença dos dois vírus aumenta a possibilidade de lesão do sistema nervoso. Esse dado deverá ser confirmado com o aumento da casuística e através do seguimento desses pacientes em estudo de coorte.

Em relação a avaliação laboratorial dos parâmetros hematológicos, apenas observamos diferenças estatísticas no número absoluto de plaquetas no sangue periférico, que apresentou médias e medianas significativamente menores no grupo HCV, sendo a presença de plaquetopenia mais frequente nesse grupo (41,3%). A plaquetopenia é uma das manifestações hematológicas mais comuns em indivíduos com HCV, sendo sua ocorrência estimada em 40-50% dos casos. Numerosas são as causas que contribuem para sua ocorrência em pacientes virgens de terapia antiviral: a) anticorpos antiplaquetas e revestimento das plaquetas por imunocomplexos; b) diminuição

de trombopoetina produzida, principalmente, pelo fígado; c) sequestro de plaquetas nos casos de esplenomegalias; d) depressão medular e/ou infecção de megacariócitos causada pelo HCV; e) e, finalmente, a plaquetopenia causada pela interação HCV-plaquetas(DE ALMEIDA et al., 2004; CINES et al.,2009; STASI et al., 2009). Em nosso estudo, não observamos diferenças em relação às contagens de plaquetas ou a presença de plaquetopenia entre os indivíduos mono infectados com HTLV-1 (4,0%) e os co infectados (11,8%). O mecanismo pelo qual a co infecção HTLV-1/HCV foi associada a uma menor frequência de plaquetopenia do que nos pacientes mono infectados HCV permanece desconhecida.

Ainda com relação aos achados laboratoriais, ao se compararem as concentrações séricas de AST/TGO, ALT/TGP, FA, GGT e BT, observou-se que os valores foram significativamente mais altos nos pacientes mono infectados pelo HCV ($p < 0,001$). Alguns trabalhos sugerem que na presença do HTLV-1 ocorra redução da imunidade celular (TACHIBANA et al.,1988), sendo que essa imunossupressão pode acarretar maior lesão hepática nos indivíduos co infectados por HTLV-1/HCV. Realmente, Boschi-Pinto e colaboradores (2000) observaram maior morbidade e mortalidade nos co infectados, e Kishihara e colaboradores (2001), observaram uma diminuição do “*clearance*” de HCV com o tratamento antiviral. Por outro lado, estudo recente realizado no Brasil sugeriu que a presença da co infecção HTLV-1/HCV possa minimizar o dano imunomediado hepático agudo, reduzindo assim, a liberação de enzimas hepáticas (CARDOSO, 2008).

Em nosso estudo, os níveis menores de AST e ALT não puderam ser explicados por diferenças nos genótipos do HCV, já que em ambos os grupos houve uma predominância do genótipo 1, particularmente o 1b, observado em 41,37% dos pacientes co infectados HTLV-1/HCV e 30,77% dos pacientes infectados pelo HCV. A carga viral do HCV foi semelhante em ambos os grupos, sendo observada carga elevada, superior a 600.000UI/mL, nos dois grupos. Esses dados sugerem que os níveis da carga viral do HCV não parecem ser influenciados pela presença ou ausência de co infecção. Corroborando nossos resultados, Hisada e colaboradores (2003), ao estudarem a carga viral do HCV em co infecções com HIV e/ou HTLV-2, observaram possível papel da etnia dos pacientes nos níveis de carga viral de HCV, e demonstraram que a presença do HTLV-2 aumenta significativamente

a carga viral do HCV em indivíduos brancos caucasianos e não em pacientes de origem hispânica ou afro-descendentes. Esses resultados sugerem que polimorfismos de genes envolvidos na resposta imunológica devem influenciar os níveis de HCV nos diferentes grupos étnicos.

No que se refere à carga proviral do HTLV-1, não houve diferenças significativas entre os grupos HTLV-1 e HTLV-1/HCV que permitam distinguir os pacientes dos diferentes grupos estudados. Nos pacientes coinfectados, a carga proviral permanece semelhante aos mono infectados, isto é, os indivíduos com acometimento neurológico apresentam níveis mais elevados do que os assintomáticos. Esses dados sugerem que o número de células circulantes infectadas pelo HTLV-1 não é influenciado pela coinfeção com HCV.

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) está associada à numerosas manifestações extra-hepáticas como a crioglobulinemia mista. A presença de crioglobulinemia mista é muito variável (19- 60%) nos portadores de HCV, estando relacionada a faixa etária e ao nível de acometimento hepático da população estudada (WONG et al.,1996; SAADOUN et al., 2007). Apesar da alta frequência de crioglobulinemia relatada, menos de 5% desenvolvem vasculite (SAADOUN et al.,2008).

A presença de crioglobulinemia foi percentualmente (19,4%) maior no grupo de pacientes coinfectados, embora sem relevância estatística. Entretanto, ainda faltam dados complementares que possam elucidar a baixa positividade encontrada no grupo HCV, uma vez que esta associação é sabidamente descrita. Diferente de nosso estudo, Margarida (2005), em pesquisa de auto-anticorpos em portadores de hepatite C, identificou crioglobulinas no soro de 39/60 (65%) portadores de HCV, através do método de criócrito e da imunodifusão em gel de agarose a 1%.

Deve-se enfatizar que, infelizmente, não há uma padronização universalmente aceita para a detecção de crioglobulinemia, bem como valores de referência para a normalidade; a maneira variável com que os laboratórios realizam o teste dificulta a comparação de estudos. Alguns estudos apenas referem o resultado de forma qualitativa, como positivo ou negativo, ressaltando-se que o limite para detecção visual varia de 0,001 a 0,005 mg/mL. Além disso, há diferenças nas técnicas de coleta, transporte, centrifugação e período de incubação a 4°C, que interferem fortemente nos resultados. Na

tentativa de padronizar a coleta e a forma de detecção, Vermeersch e colaboradores (2008) publicaram, recentemente, um guia para sua detecção .

Os pacientes com HCV apresentaram níveis séricos significativamente mais elevados de imunoglobulina G, o que parece refletir uma ativação policlonal. Cabe ressaltar, que não foram evidenciadas manifestações clínicas relacionadas a presença de imunocomplexos circulantes, exceto plaquetopenia, esta descrita como sendo de etiopatogênese multifatorial em pacientes com infecção pelo HCV (DE ALMEIDA et al., 2005; SAADOUN et al., 2007).

A avaliação imunológica dos pacientes não mostrou prejuízo quantitativo da resposta imune, embora a contagem de linfócitos T CD8⁺ tenha demonstrado valores aumentados no grupo HTLV-1/HCV, alguns estudos demonstraram resultados semelhantes em pacientes infectados pelo HTLV-1. O aumento do número de linfócitos T CD8⁺ estaria relacionado a uma forte resposta dos linfócitos T citotóxicos, estando, principalmente, direcionados à proteína Tax do HTLV (URETA-VIDAL et al., 2001; CARDOSO et al., 2008).

Esse estudo representa a fase inicial de um estudo de coorte que possibilitará uma análise mais aprofundada em relação aos dados obtidos.

8. CONCLUSÕES

Neste estudo, a comparação de uma série de casos de pacientes monoinfectados pelo HTLV-1 e monoinfectados pelo HCV com coinfectados pelo HTLV-1/HCV permitiu concluir que:

- Os grupos HTLV-1/HCV, HTLV-1 e HCV apresentam características sócio-demográficas similares;
- Transfusão de sangue antes de 1994 foi a mais provável via de infecção para os indivíduos do grupo HCV e do grupo HTLV-1/HCV, enquanto que a transmissão sexual predominou no grupo HTLV-1. A segunda provável via de infecção para o grupo de coinfectados foi a utilização de drogas injetáveis.
- Indivíduos coinfectados HTLV-1/HCV apresentam mais sintomatologia neurológica, sugerindo que a presença concomitante desses vírus pode contribuir para aumentar a possibilidade de lesão do sistema nervoso;
- A plaquetopenia ocorre com menor frequência em indivíduos coinfectados pelo HTLV-1/HCV quando comparados aos indivíduos monoinfectados pelo HCV.
- O acometimento hepático, com base nos níveis séricos de AST e ALT, parece ser menor nos coinfectados quando comparados com os monoinfectados pelo HCV.
- Os pacientes coinfectados pelo HTLV-1/HCV apresentam prevalência de crioglobulinemia semelhante aos demais grupos estudados (HTLV-1 e HCV).
- A presença de coinfecção não influenciou os níveis de carga viral do HCV.
- A presença de coinfecção não influenciou os níveis e o padrão da carga proviral para HTLV-1.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya JN, Pacheco VH. Neurologic complications of hepatitis C. *The Neurologist*. 2008;14:151-56.

Agnello V. Mixed cryoglobulinemia and other extrahepatic manifestations of HCV infection. In: Liang TJ, Hoofnagle JH (Eds.). *Hepatitis C*. New York: Academic Press; 2000:295-315.

Alter HJ. To C or not to C: these are the questions. *Blood*. 1995;85:1681-95.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*. 1997; 26:62-65.

Alter MJ, Kruszon-Moran D, Naivan OV, McQuilan GM, Gao F, Moyler LA et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1998 through 1994. *N Engl J Med*. 1999;341:556-62.

Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(17):2436-41.

Andrade AFB, Oliveira-Silva M, Silva SGC, Motta IJF, Bonvicino CR. Seroprevalence of hepatitis B and C virus markers among blood donors in Rio de Janeiro, Brazil, 1998-2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(6): 673-76.

Araújo AQC, Andrada-Serpa. Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1996;3:S33-7.

Araújo AQC, Silva MTT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol*. 2006;5:1068-76.

Araújo ESA, Barone AA. *Hepatite C*. São Paulo: Manole; 2010:2-5.

Bangham CRM, Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*. 2005;24:6035-46.

Bartholomew C, Saxinger WC, Clark JK, Gail M, Dudgeon A, Mahabir B et al. Transmission of HTLV-I and HIV among homosexual men in Trinidad. *JAMA*. 1987;257:2604-08.

Berini CA, Pando MA, Bautista CT, Eirin ME, Martinez-Peralta L, Weissenbacher M et al. HTLV-1/2 among high-risk groups in Argentina: molecular diagnosis and prevalence of different sexual transmitted infections. *J Med Virol*. 2007;79:1914-20.

Botté C, Janot C. Epidemiology of HCV infection in the general population and blood transfusion. *Nephrol Dial transplant*. 1996;11:19-21.

Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H et al. A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis*. 2000; 181:35-41.

Ministério da Saúde. Portaria n°. 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. Brasília, 1993.

Ministério da Saúde. Resolução – RDC n°. 153 de 14 de junho de 2004. Aprova o regulamento técnico para os procedimentos de hemoterapia, para coleta, processamento, testagem, armazenamento, transporte, esterilização, utilização e controle de qualidade do sangue e seus componentes obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea para o uso humano. Brasília, 2004.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Guia do manejo clínico do HTLV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med*.1974;57:775-788.

Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Loury I, Loustaud-Ratti V et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C vírus infection. A prospective multicenter study of 321 patients. *Groupe d'Etude et de Recherche en Medecine Interne et Maladies Infectieuses sur le Virus de l'Hepatitis C. medicine*. 2000;79:47-56.

Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 2005; 2:31-34.

Cardoso DF. Influência da infecção pelo vírus linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1) em parâmetros laboratoriais de pacientes com Hepatite C crônica. São Paulo; 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Carneiro MA, Martins RM, Teles SA, Silva SA, Lopes CL, Cardoso DD et al. Hepatitis C prevalence and risk factors in hemodialysis patients in Central

Brazil: a survey by polymerase chain reaction and serological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(6):765-69.

Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Martins-Filho AO et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:499-508.

Catalan-Soares BC, Proietti FA, Carneiro-Proietti AB. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): Aspectos epidemiológicos. *Rev Bras Epidemiol.* 2001; 4(2): 81-95.

Cavalheiro NP. Prevalência Global de Genótipos. In: Focaccia R. (Ed): *Tratado de Hepatites Virais.* São Paulo: Atheneu. 2003. p. 301-05.

Cines DB, Liebman H, Stasi R. Pathobiology of secondary immune thrombocytopenia *Semin Hematol.* 2009;46(Suppl 2):2-14.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overly LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989; 244:359-62.

Costa CM, Salgueiro MR, Carton H, Vale OC, Arruda AM. Tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 1989;47:134-38.

De Almeida AJ, Campos-Magalhães M, Marçal OPM, Brandão-Mello CE, Okawa MY, De Oliveira RV et al. Hepatitis C vírus-associated thrombocytopenia: a controlled prospective, virological study. *Annals of Hematology.* 2004;83,7:434-40.

De Almeida AJ, Campos-Magalhães M, Brandão-Mello CE, De Oliveira RV, Yoshida CFT, Lampe E. Prevalence of serum immunoglobulins alterations in patients with C vírus (HCV) associated thrombocytopenia. In: *Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia (Hemo 2005).* Rio de Janeiro. Trasso Comunicação e Assessoria Ltda. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27:41-41.

De Thé G, Kazanji M. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S191-8.

Donegan E, Busch MP, Galleshaw JA, Shaw GM, Mosley JW. Transfusion of blood components from a donor with HTLV-II infection. The Transfusion Safety Study Group. *Ann Intern Med.* 1990;113:555-6.

Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;34:527-31.

Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med*. 2000;18:109-19.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 1975; 292:767-70.

Ferreira Jr OC, Planelles V, Rosenblatt JD. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology and pathogenesis. *Blood*.1997;11: 91-104.

Ferreira Júnior OC, Vaz RS, Carvalho MB, Guerra C, Fabron AL, Roseblit J et al. Human T-lymphotropic vírus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. *Transfusion*. 1995;35:258-63.

Ferreira PRA, Navarro RMC. Coinfecção por VHC/HIV, VHB/VHC/HIV, VHC/HTLV. In: Araújo ESA, Barone AA. *Hepatite C*. São Paulo: Manole; 2010:299-301.

Ferri C, Zignego AL, Pileri S. Cryoglobulins. In: Yong NS, Gerson SL, High KA (eds). *Clinical Hematology*. Elsevier;2005.625-36.

Figuroa JP, Ward E, Morris J, Brathwaite AR, Peruga A, Blattner W et al. Incidence of HIV and HTLV-1 infection among sexually transmitted disease clinic attenders in Jamaica. *J Acquir Immune Defic Hum Retrovirol*. 1997;15: 232-37.

Florins A, Gillet N, Ashit B, Boxus M, Burteal C, Twizere JC et al. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci*. 2007;12:1520-31.

Focaccia R, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. *Braz J Infec Dis*.1998;6: 269-84.

Focaccia R, Baraldo DCO, Souza FV. *Hepatite C Epidemiologia*. In:Focaccia R (Ed). *Tratado de Hepatites Virais*. 2003. São Paulo: Atheneu. p.221-30.

Fonseca JC. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Gastroenterologia Endoscopia Digestiva. 1999; 18 (supl 1): S3-S8.

Fujino T, Nagata Y. HTLV-I transmission from mother to child. J Reprod Immunol. 2000;47:197-206.

Gallo RC. The Discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. Retrovirology. 2005; 2: 17.

Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. J Gastrointest. 2007;16:65-7.

Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LGM, Sereno A, Ferreira Jr. OC, Franco LGP et al. Geographic distribution on human T-lymphotropic vírus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. Transfusion.1997; 37: 242-43.

Gasmi M, Farouqi F, d'Incam M, Desgranges C. Long Terminal Repeat Sequence Analysis of HTLV Type I Molecular Variants Identified in Four North African Patients. AIDS Res Hum Retroviruses. 1994;10:1313-15.

Gastaldello R, Iniguez AM, Otsuki K, Lamas G, Balangero M, Barbas MG, Mangano A et al.HTLV type 1 genetic types among native descendants in Argentina. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008;24:1139-46.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis.Lancet. 1985;2:407-10.

Goff SP. Retroviridae: The Retroviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (Eds). Fields Virology. 5th ed. New York (NY): Lippincott Williams & Wilkins; 2007. v.2: 2007-8.

Gomes I, Melo A, Proietti FA, Moreno-Carvalho O, Loures LA, Dazza MC et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. J Neurol Sci. 1999;165:84-89.

Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J. Questions on the evolution of primate T-lymphotropic viruses raised by molecular and epidemiological studies of divergent strains. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996; 13 (supp 1): S242-47).

Haushofer AC, Koptý C, Hauer R, Brunner H, Halbmayr WM. HCV genotypes and age distribution in patients of Vienna and surrounding areas. J Clin Virol. 2001;20:41-7.

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1605-07.

Hisada M, Chatterjee N, Zhang M, Battjes RJ, Goedert JJ. Increased hepatitis C virus load among injection drug users infected with human immunodeficiency virus and human T lymphotropic virus type II. *J Infect Dis.* 2003;188:891–7.

Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. *J Infect Dis.* 1986; 154:851-57.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. New subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 1982; 218:571-73.

Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y et al. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1990;3:1096-101.

Kishihara Y, Furusyo N, Kashiwagi K, Mitsutake A, Kashiwagi S, Hayashi J. T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis.* 2001;184:1114-19.

Koziel MJ, Dudley D, Afdhal N, Choo QL, Houghton M, Ralston R et al. Hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes recognize epitopes in the core and envelope proteins of HCV. *J Virol.* 1993;67(12):7522-32.

Kroon EG, Carneiro-Proietti AB. Vírus linfotrópico de células T Humanas do Tipos 1 e 2 (HTLV-1/2). Histórico, Estrutura e Ciclo de Multiplicação Viral. *Cadernos Hemominas. HTLV. Volume XIII, 4ª. ed, Belo Horizonte.* 2006;11-45.

Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989;244:362-64.

Laimore MD, Franchini G. Human T-cell Leukemia Virus types 1 and 2. p 2071-2105. In: *Fields Virology.* Ed Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Lam NP. Hepatitis C: natural history, diagnosis and management. *Am J Health Syst Pharm.* 1999;56:961-76.

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

Lunel F, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Cresta P, Perrin M et al. Cryoglobulinemia in chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology*.1994;106:1291-300.

Magalhães GAP. Contribuição ao estudo da co-infecção HTLV-HCV: análise epidemiológica. Rio de Janeiro; 2006. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Maloney EM, Wiktor SZ, Palmer P, Cranston B, Pate EJ, Cohn S, et al. A cohort study of health effects of human T-cell lymphotropic virus type I infection in Jamaican children. *Pediatrics*. 2003;112:136-42.

Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnet M et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*. 1992;51:886-891.

Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*.1999;353:1951-8.

Margarida PE. Produção de auto-anticorpos em pacientes portadores de hepatite viral C crônica. Bahia; 2005. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Universidade Federal da Bahia.

Martins-Castro LH, Chaves CJ, Callegaro D, Nobrega JPS, Scaff M. HTLV-1 associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. *Arq Neuropsiquiatr*. 1989;47:501-2.

McIntyre PG, Hill DA, Appleyard K, Taylor A, Hutchinson S, Goldberg DJ. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus, HIV and human T-cell leukaemia/lymphoma viruses in injecting drug users in Tayside, Scotland, 1993-7. *Epidemiol Infect*. 2001;126:97-101.

Meltzer M, Franklin EC, Elias K, McCluskey RT, Cooper N. Cryoglobulinemia - a clinical and laboratory study. II. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med*. 1966 Jun; 40(6):837-56.

Memom MI, Memom MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat*. 2002; 9:84-100.

Milagres FAP. Coinfecção pelos vírus da hepatite C (VHC) e vírus linfotrópicos de células humanas dos tipos 1 (HTLV-1) ou 2 (HTLV-2) em ambulatório de referência de São Paulo: avaliação epidemiológica, clínica, laboratorial e

histológica. São Paulo; 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Misiani R, Bellavita P, Fenili D, Borelli G, Marchesi D, Massazza M et al. Hepatitis C infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med.* 1992;117:553-77.

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

Moreira ED, Ribeiro TT, Swanson P. Seroepidemiology of HTLV-I/II in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993; 6: 959-63.

Morgan DA, Ruscetti FW. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science.* 1976; 193(4257): 1007-8.

Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control.* 1991;2:37-52.

Muneou S, Dezzutti CS, Okayama A, Tachibana N, Tsubouchi H, Mueller N et al. Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type 1-Infected Individuals. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6: 713-17.

Murphy D, Chamberland J, Dandavino R, Sablon E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Hepatology.* 2007;46(4), suppl.1.

Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Brathwaite A, Holding-Cobham M, Waters D et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med.* 1989;111:555-60.

Naghettini AV, Daher RR, Martin RM, Doles J, Vanderborght B, Yoshida CF, Rouzere C. Survival of the hepatitis C virus in a dialysis population in Goiânia, Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(2):113-17.

Nakashima K, Hayashi J, Hirata M, Kashiwagi S, Eda F. Hepatitis C virus infection on Iki Island, Japan, an area endemic for human T-lymphotropic virus type-I: a preliminary study in patients at clinics or hospitals. *J Epidemiol.* 1994;4:17-23.

Neumann AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR, Wiley TE, Layden TJ et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science*.1998;282:103-07.

NIH. National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement. Management of Hepatitis C. 2002. Disponível em: <http://consensus.nih.gov/2002/2002HepatitisC2002116PDF.pdf>. Acesso em 06 Jan 2010.

Ohtsuki Y, Akagi T, Takahashi K, Miyishi I. Ultrastructural study on type C virus particles in human cord T-cell line established by co-cultivation with human T-cell leukemia cells. *Arch Virol*.1982; 73: 69-73.

Okayama A, Maruyama T, Tachibana N, Hayashi K, Kitamura T, Mueller N, Tsubouchi H. Increased prevalence of HTLV-I infection in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Jpn J Cancer Res*.1995.86:1-4.

Okoshi K, Sato H, Hinuma YA. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang*. 1984; 46:245-53.

Okuda M, Hino K, Korenaga M, Yamaguchi Y, Katoh Y, Okita K. Differences in hypervariable region 1 quasispecies of hepatitis C virus in human serum, peripheral blood mononuclear cells, and liver. *Hepatology*.1999;29:217-22.

Osame, M. Review of WHO Kagoshima Meeting and Diagnostic Guidelines for HAM/TSP. In: Blattney WA (ed). *Human Retrovirology: HTLV*. New York, Raven Press, 1990;191-97.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. 1986;1:1031-32.

Pawlotsky J. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12:96-102.

Peter S, Bukh J, combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone J et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42:962-73.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 7415-19.

Proietti ABF (org). Caderno Hemominas: HTLV – 4° ed. Atualizada e aumentada. Belo Horizonte. 2006.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005; 24:6058-68.

Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest*. 2009;119:1745–54.

Rodgers-Johnson P, Gajdusek DC, Morgan OS, Zaninovic V, Sarin PS, Graham DS. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*.1985;2:1247-48.

Rojas HFR. Estudo clínico-laboratorial de pacientes infectados com HTLV e pacientes co-infectados com HIV atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz

Roman GC, Osame M. Identity of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet*.1988;1:651.

Ross RS, Viazov S, Gross T, Hofmann F, Seipp HM, Roggendorf M. Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med*. 2000; 343; 1851-54.

Rous P. Leo Loeb (1869-1959). *Cancer*.1960; 13:437-8.

Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, et al. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis*. 2005;191:1490-7.

Saadoun D, Landau DA, Calabrese LH, Cacoub PP. Hepatitis C-associated mixed cryoglobulinaemia: a crossroad between autoimmunity and lymphoproliferation. *Rheumatology*. 2007;46:1234-42.

Saadoun D, Delluc A, Piette JC, Cacoub P. Treatment of hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20:23-8.

Sabino EC, Barreto CC, Salles NA. Testes moleculares para triagem de doenças transmissíveis por transfusão. In: Hemoterapia – Fundamentos e prática. Bordin JO, Junior DML, Covas DT (orgs). Editora Atheneu, 2007;p:85-92.

Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994;19:1321-24.

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

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80: 3618-22.

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

Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:391-424.

Silva MTT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load in asymptomatic carriers, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. *CID*. 2007; 44:689-92.

Stasi R, Willis F, Shannon MS, Gordon-Smith EC. Infectious causes of chronic immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(6): 1275-97.

Stuver SO, Okayama A, Tachibana N, Tsubouchi H, Mueller NE, Tabor E. HCV infection and liver cancer mortality in a Japanese population with HTLV-1. *Int J Cancer*. 1996;1:35-7.

Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34:69-82.

Takatsuki K, Uchiyama T, Ueshima Y, Hattori T. Further clinical observations and cytogenetic and functional studies of leukemic cell. *Jpn J Clin Oncol*. 1979; 9: 312-24.

Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K et al. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int J Cancer*. 1988;42(6):829-31.

Taylor GP, Bodeus M, Cortouis F, Pauli G, Del Mistro A, Machucha A et al. The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses: types I and II in Europe: a prospective study of pregnant women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 38:104-109.

Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970; 226(5252): 1211-13.

Tengan FM, Focaccia R. Aspectos epidemiológicos da hepatite C no Brasil e no mundo. In: Araújo ESA, Barone AA. *Hepatite C*. São Paulo: Manole; 2010:6-7.

The Ohio State University. Representação esquemática da estrutura do HTLV. Disponível em: <http://researchnews.osu.edu/archive/htlvil2pics.htm> [acesso em 25 jan.2010]. (figura adaptada para o português).

Tong MJ, El Farre NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med*. 1995;332:1463-66.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977;50:481-92.

Uchiyama T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Ann Rev Immunol*. 1997; 15:15-37.

Ureta-Vidal A, Pique C, Garcia Z, Déheé A, Tortevoyer P, Desiré N et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection induces greater expansions of CD8 lymphocytes in persons with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis than in asymptomatic carriers. *J Infect Dis*. 2001; 183:857-64.

Van Dooren S, Gotuzzo E, Salemi M, Watts D, Audenaert E, Duwe S et al. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *J Gen Virol*. 1998; 79: 2695-08.

Vermeersch P, Gijbels K, Mariën G, Lunn R, Egner W, White P, Bossuyt X. A critical appraisal of current practice in the detection, analysis, and reporting of cryoglobulins. *Clin Chem*. 2008;54(1):39-43.

Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis*. 2007;266-81.

Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Sem Liver Dis*. 2000;20:1-16.

WHO (World Health Organization). Hepatitis C. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html. Acesso em: dez. 2009.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U et al. Emergence of primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005;102:7994-99.

Wong VS, Egner W, Elsey T, Brown D, Alexander GJ. Incidence, character and clinical relevance of mixed cryoglobulinaemia in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* 1996;104(1):25-31.

Yamaguchi K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet.* 1994;343:213-16.

Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13:223-35.

Zeldis JB, Jensen P. Hepatitis C virus pathogenicity: the corner pieces of the jigsaw puzzle are found. *Gastroenterology.* 1994;106:1118-20.

Zignego AL, Ferri C, Giannini C, La Civita L, Careccia G, Longombardo G, et al. Hepatitis C infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol.* 1997;142:545-55.

Zignego AL, Craxi A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2008;12:611-36.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 028/2009

Protocolo 0020.0.009.000-09

1. Identificação:

Título do Projeto: “Análise laboratorial de indivíduos coinfectados pelo HTLV-I e hepatite C – Estudo caso-controle aninhado à coorte”.

Pesquisadora Responsável: Ana Claudia Celestino Bezerra Leite.

Mestrando: Alexandre Gomes Vizzoni.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 08/04/2009.

2. Sumário:

Trata-se de um estudo transversal de caso-controle aninhado a uma coorte de pacientes infectados pelo HTLV. O projeto principal “Estudo clínico e laboratorial da coinfeção vírus linfotrópico para células T humanas do tipo (HTLV-I) e hepatite C” foi submetido ao CEP/IPEC, tendo sido aprovado em 29/10/2008, sob o número 056/2008. Atualmente a coorte de HTLV do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) tem cerca de 700 pessoas. Observa-se uma frequência de 12,2% de pacientes coinfectados com hepatite C (HCV). Este projeto visa a estudar aspectos clínico-epidemiológicos e biológicos relacionados a esta coinfeção, avaliar se a coinfeção HTLV/HCV oferece um risco maior para o desenvolvimento de alguma das doenças associadas a estes dois vírus, avaliar se a coinfeção HTLV/HCV oferece um risco adicional para a progressão da doença hepática e/ou de doenças associadas ao HTLV, avaliar se a carga proviral e viral do HTLV relaciona-se à presença de qualquer manifestação associada a estes vírus, comparar clinicamente pacientes monoinfectados com HTLV com os coinfectados com HCV, avaliar a resposta imunológica dos pacientes monoinfectados com HTLV e dos coinfectados com HCV, avaliar os níveis de carga viral do HCV nos pacientes monoinfectados com HCV e nos coinfectados com HTLV e estudar as alterações hematológicas e imunológicas associadas à coinfeção. Serão selecionados três grupos de pacientes atendidos no período entre 2007 e 2009: 1) 50 indivíduos HTLV monoinfectados; 2) 50 indivíduos coinfectados HTLV/HCV e 3) 50 pacientes HCV monoinfectados. O estudo será dividido em duas etapas. Inicialmente será feito o levantamento dos indivíduos HTLV monoinfectados e HTLV/HCV coinfectados que já são acompanhados no IPEC. Após a análise dos dados obtidos nestes dois grupos, se fará o recrutamento dos pacientes HCV monoinfectados para entrevista clínica no Grupo de Atendimento para Hepatites Virais do Laboratório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Será utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto principal. Este estudo será financiado pelo CNPq.

"Análise laboratorial de indivíduos coinfectados pelo HTL-I e hepatite C – Estudo caso-controlado aninhado à coorte".

4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

5. Parecer: APROVADO.

Data: 16 de julho de 2009.

Assinatura do Coordenador:



Dr.^a Léa Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Rio de Janeiro

TÍTULO DO PROJETO: Estudo clínico e laboratorial da co-infecção vírus linfotrópico para células T humanas do tipo I (HTLV-I) e hepatite C.

COORDENADOR DO PROJETO: Ana Claudia Celestino Bezerra Leite, MD, PhD e Maria José de Andrada-Serpa, MD, PhD

Eu, _____, declaro que sou voluntário no estudo clínico e laboratorial da co-infecção vírus linfotrópico para células T humanas do tipo I (HTLV-I) e hepatite C. Fui informado que este estudo visa obter um maior conhecimento sobre a evolução da co-infecção HTLV-I e HCV e determinar os aspectos clínicos e laboratoriais que caracterizam esta co-infecção. Também, tem por objetivo verificar se a ocorrência de doenças associadas a estes vírus é maior no grupo de pacientes co-infectados. A caracterização dos aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes com esta co-infecção possibilitará a elaboração de uma rotina de acompanhamento adaptada a estes pacientes.

A minha participação é inteiramente voluntária e caso não queira participar, isto de forma alguma afetará meu atendimento no IPEC.

Os resultados são confidenciais e serão fornecidos somente ao interessado, sendo arquivados no Laboratório de Virologia, sob responsabilidade da Dra. Maria José de Andrada-Serpa. Os resultados deste estudo poderão não me beneficiar diretamente, mas poderão fornecer subsídios para um maior conhecimento sobre a co-infecção pelo HTLV-I/HCV e serão divulgados na forma de comunicação científica, não sendo permitido divulgar a minha identidade.

Declaro que fui informado de que:

1. Poderei recusar-me a participar da pesquisa, sem que este fato me venha causar qualquer constrangimento e que o meu atendimento clínico em nada será modificado pela minha recusa;
2. Os exames aplicados serão gratuitos;
3. Antes de assinar este Termo, devo ser informado plenamente sobre a pesquisa, não hesitando em fazer perguntas de qualquer natureza que julgar conveniente esclarecer;
4. Este projeto visa estudar a co-infecção HTLV-I/HCV;
5. Nesta investigação serão coletados de 15 a 20ml de sangue. O sangue será colhido assepticamente por punção de uma veia do braço. Este procedimento será realizado junto com a coleta dos exames de rotina, não implicando em uma punção venosa separada. A coleta de sangue é um exame seguro, podendo causar pequeno desconforto, como um pequeno hematoma, ou seja, extravasamento de sangue da veia para o tecido, no local da punção;
6. Caso haja alguma alteração de pele, o médico dermatologista poderá realizar uma biópsia de pele que consiste na coleta de um pequeno fragmento de pele lesada, mediante uma injeção com anestésico local, para que você não sinta dor

durante o procedimento. Após o mesmo serão dados três pontos que serão retirados sete dias após. O curativo poderá ser retirado por você em sua residência;

7. Esta pesquisa poderá não trazer benefícios imediatos para o meu acompanhamento clínico, mas trará um maior conhecimento a respeito da co-infecção por HTLV-I/HCV;
8. O material biológico coletado, após exames, será estocado, podendo ser usado posteriormente, em outras pesquisas com fins semelhantes, mas somente após a avaliação, pelo Comitê de Ética em Pesquisa, que poderá dispensar a assinatura de um novo Termo de Consentimento, todavia mantendo sempre a identidade do doador em sigilo;

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer momento.

Declaro dar meu consentimento para participar deste estudo recebendo uma cópia do Termo de Consentimento, e estando ciente, de que a outra cópia será arquivada sob a responsabilidade do Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral do IPEC.

Local: _____ Data: _____

Nome completo do voluntário: _____

Endereço: _____

Assinatura do participante

Nome do médico responsável: _____

Assinatura do médico

Médicos Responsáveis pelo Atendimento: Maria José de Andrada-Serpa, IPEC
 Ana Claudia Celestino Leite, IPEC
 Marcus Tullius Teixeira da Silva, IPEC
 Marco Antonio Dantas de Lima, IPEC

Coordenadores do Projeto: Ana Claudia Celestino Bezerra Leite e Maria José de Andrada-Serpa, IPEC

Assinatura do coordenador

Telefone para contato: 3865 9506 ou 3865 9608

ANEXO C – Protocolo Clínico-Epidemiológico

Ministério da Saúde
IPEC - FIOCRUZ
Laboratório de Pesquisa em Neuroinfecção

PROTOCOLO CLÍNICO

Número do Prontuário: _____

Data do preenchimento deste protocolo: ____/____/____

Examinador: _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Estado neurológico: [] Assintomático, [] Neuropatia qual (ais): _____

Se neuropata, há quanto tempo: _____ meses

Estado Clínico: [] Hepatopatia [] Tiroidite, [] Sind. Sjogren [] outras colagenoses, []

Dermatopatia(s) Qual (ais): _____

1 - Variáveis Sócio-Demográficas:

Sexo: [] Masculino, [] Feminino Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Cor da pele: [] Branca, [] Negra, [] Amarela/Ameríndia, [] Mestiça

Naturalidade: _____ Profissão: _____

Escolaridade: [] Analfabeto; [] até 4 anos estudos; [] 4-8 anos; [] 8-11 anos; [] > 12 anos

Renda Familiar: [] até 1 salário; [] 1-5 salários; [] 5-10 salários; [] mais de 10 salários.

Estado civil atual (formal ou informal): _____ Há quanto tempo: _____

Casamentos anteriores: [] Sim, [] Não Por quanto tempo: _____

Filhos: [] Sim; [] Não; Quantos: [] Feminino; [] Masculino

Foram Amamentados: [] Sim; [] Não; [] Não sabe; Por quanto tempo: _____

EPIDEMIOLOGIA

1 - Antecedentes sexuais:

Sexualidade: [] Hetero; [] Homossexual; [] Bissexual

Idade de início da atividade sexual (em anos): _____ anos

Número de parceiros sexuais na vida inteira: _____

Uso de preservativos: [] Nunca; [] Raramente; [] Quase sempre; [] Sempre

DSTs: [] Sim; [] Não Qual (ais)?: _____

(sífilis, gonorréia, herpes, condiloma, HIV, hepatites e outras)

Sexo com usuário de drogas endovenosas? [] Sim; [] Não
 Sexo com indivíduo sabidamente HCV positivo? [] Sim; [] Não
 Sexo com indivíduo sabidamente HIV positivo? [] Sim; [] Não

2 - Antecedentes mórbidos:

Uso de drogas endovenosas: [] Sim; [] Não; Em caso afirmativo, qual droga: _____ Há e por quanto tempo: _____;
 Outras drogas por outras vias: [] Sim; [] Não; Caso afirmativo, qual: _____
 Etilismo crônico: [] Sim; [] Não; Quantitativo semanal: _____
 Alcoolista atual: [] Sim; [] Não;
 Hemotransfusão: [] Sim; [] Não; Quantas: _____; Ano da última transfusão: _____
 Passado de acidente perfurante com sangue ou derivados? [] Sim; [] Não; Ano: _____
 História de abortamentos (para mulheres)? [] Sim; [] Não; Em caso positivo, indique o tipo: [] Auto-induzido; [] Espontâneo

3 - H.P.P.

Alcoolismo? [] Sim; [] Não;
 Linfadenomegalias? [] Sim; [] Não; Local: _____
 Hepatite? [] Sim; [] Não; Em caso afirmativo, informe qual: _____
 Diabetes mellitus? [] Sim; [] Não; [] Sim; [] Não;
 Doença de Pela? [] Sim; [] Não; Qual? _____
 Doença tireoidiana? [] Sim; [] Não; Qual? _____

4 - H.Familiar

Familiar com de HCV? [] Sim; [] Não;
 Em caso positivo, grau de parentesco: _____
 Doença associada ao HCV, se houver: [] Sim; [] Não. Qual: _____

Provável via de Infecção: [] sexual, [] transfusão, [] Drogas EV, [] amamentação, [] Ignorada

EXAME FÍSICO GERAL

Estado clínico atual: _____
 Em caso de outras doenças, descreva o tipo: _____
 - PA: _____ mmHg FC: _____ ppm
 - Exame das mucosas: _____
 - Linfonodomegalia?: [] Sim; [] Não; _____

- Exame da tireóide: _____
- Exame cardiovascular: _____
- Ausculta Pulmonar: _____
- Hepatomegalia/esplenomegalia?: _____
- Lesões Cutâneas?: _____
- Sabe o genótipo do HCV?
- Sabe a Carga Viral do HCV?
- Fez tratamento para HCV? [] Sim [] Não. Em caso afirmativo, assinale esquema: [] IFN Alfa; [] IFN Alfa + RBV [] RBV [] IFN Pegilado [] UFN Pegilado + RBV.
- Se fez tratamento, houve alguma complicação do mesmo? [] Sim [] Não. Caso afirmativo, assinale: _____

HISTÓRIA E EXAME NEUROLÓGICO

1 - Queixa(S) Principal(is): [] Assintomático; Neuropatia.

Caso tenha sintomas, descreva conforme o esquema: *Início há _____ anos com _____.* Houve então [] curso flutuante com melhoras e piores; [] piora progressiva; [] estabilidade, [] melhora progressiva, *queixando-se agora de*

2- Mês e ano de início da doença: _____ / _____

3- Tempo total de doença: _____ meses

4- Idade do paciente ao aparecimento dos primeiros sintomas: _____ anos

5- Usou algum medicamento prévio para controle dos sintomas anteriores? [] Sim; [] Não;

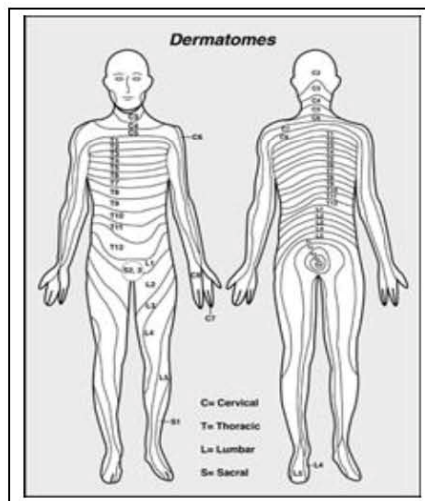
Em caso positivo, indique qual(ais): _____

6- EXAME NEUROLÓGICO ATUAL

- Tremor postural? [] Sim; [] Não;
- Reflexo mandibular exaltado? [] Sim; [] Não;
- Síndrome piramidal de MMSS? [] Sim; [] Não; [] > Direita; [] > Esquerda; [] Simétrica
- Síndrome piramidal de MMII? [] Sim; [] Não; [] > Direita; [] > Esquerda; [] Simétrica
- Síndrome miopática? [] Sim; [] Não;
- Síndrome de ELA? [] Sim; [] Não;
- Hipo/arreflexia: [] Sim; [] Não; [] Aquileana; [] MMII; [] Generalizada

- Paresia flácida? [] **Sim**; [] **Não**; Em caso positivo, especifique: _____
- Síndrome cordonal posterior de MMII? [] **Sim**; [] **Não**;
- Síndrome cordonal posterior de MMSS? [] **Sim**; [] **Não**;
- Síndrome sensitiva superficial: distal de MMII? [] **Sim**; [] **Não**; distal de MMSS? [] **Sim**; [] **Não**;
nível sensitivo? [] **Sim**; [] **Não**; - Em caso positivo, qual: _____
- Síndrome cerebelar? [] **Sim**; [] **Não**; Em caso positivo: hemisférica D [] **Sim**; [] **Não**;
hemisférica E [] **Sim**; [] **Não**; vermiana [] **Sim**; [] **Não**; holocerebelar [] **Sim**; [] **Não**;
- Síndrome de Nn cranianos? [] **Sim**; [] **Não**; – Em caso positivo, assinale qual (is)? _____
- Síndrome radicular? [] **Sim**; [] **Não**; – Em caso positivo, assinale o local: _____ Raiz acometida: _____
- Hipotensão postural? [] **Sim**; [] **Não**;
- Outra(s) síndrome(s)? [] **Sim**; [] **Não**; Qual(is)? _____
- Outros sinais neurológicos isolados? [] **Sim**; [] **Não**; Em caso positivo, descreva livremente:

MAPA DE DERMÁTOMOS (assinalar anormalidades, quando houver)



ANEXO D – Ficha de Investigação Laboratorial

Ficha de Investigação Laboratorial

Nome: _____
 Registro: _____
 Hemoglobina (g/dl): _____
 Leucometria (x 10³): _____, _____ Neu _____ TSH _____
 Linfócitos (%): _____
 Plaquetas (x 10³): _____, _____
 VHS: _____
 FAN (R/NR): _____
 Se positivo titulação: _____/_____
 Fre: (R/NR): _____
 Se positivo titulação: _____/_____
 C3: _____
 C4: _____
 IGG: _____
 IGA: _____
 IGM: _____
 Eletroforese de Ptns:
 - Alb: _____
 - Globulina: _____
 - Gama: _____
 CPV: _____
 CV HTLV: _____
 CD4: _____
 CD8: _____
 CD25: _____
 CD19: _____
 HCV Genótipo: _____
 Uso de IFN (S/N): _____
 Uso de Ribavirina (S/N): _____
 CV de HCV: _____
 Biópsia hepática (S/N): _____
 Descrição das alterações: _____
 TGO: _____
 TGP: _____
 GGT: _____
 FA: _____
 PCRreativa: _____
 Bb: _____
 ENMG (S/N): _____
 Descrição da ENMG: _____
 Biópsia de nervo (S/N): _____
 Descrição da biópsia: _____
 Parestesias (S/N): _____
 Crioglobulinemia (S/N): _____
 Titulação: _____
 Tipo de Crioglobulinemia: _____
 Vasculite (S/N): _____
 Tipo: _____
 Alteração cutânea (S/N): _____
 Descrição: _____

ANEXO E – Cartão para leitura e interpretação da genotipagem do HCV

versant®



Bayer HealthCare

HCV Genotype Assay (LiPA)

