

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

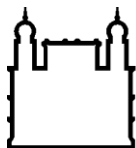
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES
PORTADORES DE HEPATITE C**

Luciana Abdalla Rosa Gasparoni

Rio de Janeiro
Outubro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LUCIANA ABDALLA ROSA GASPARONI

**INFECÇÃO POR CITOMEGALOVIRUS EM PACIENTES PORTADORES DE
HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre. Área de
concentração: Doença Infecto Parasitária

Orientadora: Prof. Dr^a. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO
Outubro de 2020

Gasparoni, Luciana Abdalla Rosa.

Infecção por Citomegalovírus em pacientes portadores de hepatite C /
Luciana Abdalla Rosa Gasparoni. - Rio de Janeiro, 2020.
90 f.; il.

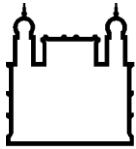
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2020.

Orientadora: Vanessa Salete de Paula.

Bibliografia: f. 74-83

1. Vírus da hepatite C. 2. Citomegalovírus, . 3. Coinfecção . 4. Hepatite.
5. Fibrose hepática. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LUCIANA ABDALLA ROSA GASPARONI

INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PORTADORES DE HEPATITE C

ORIENTADORA: Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: 07/ 10 / 2020.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Patricia Carvalho de Sequeira - Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz (presidente e revisora)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Brandão Mello - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro / UNIRIO

Prof. Dr. Jorge Reis Almeida - Universidade Federal Fluminense / UFF

Suplentes

Prof. Dra. Marcelle Bottecchia - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro / UNIRIO

Prof. Dra. Debora Ferreira Barreto Vieira - Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz

Dedico esse estudo à minha família: meus pais, meu marido e minhas filhas, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e me apoiando.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Vanessa Salete de Paula, que desde o início das minhas atividades na Fiocruz me inspirou com a sua dedicação e competência, sempre solícita, e disposta a ajudar, de capacidade e inteligência admiráveis. Obrigada pela paciência e incentivo na realização desse trabalho.

A Livia Melo Villar, chefe do laboratório de Hepatites Virais, IOC/Fiocruz, por toda ajuda e disponibilidade, pela contribuição com dados, amostras e análises laboratoriais, imprescindíveis para a realização do trabalho.

A Jéssica Vasques Raposo, pela ajuda na realização das etapas da pesquisa.

A Katrini Guidolini, da Universidade Federal do Estado do Espírito Santo, pela brilhante contribuição com as análises estatísticas.

A toda a equipe pertencente aos serviços dos ambulatorios de hepatites virais da FIOCRUZ, UFF, UFRJ e UNIRIO, que fizeram conosco parceria na coleta de amostras e dados de seus pacientes, gentilmente compartilhado suas informações em prol da nossa pesquisa científica.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) e à Coordenação do Mestrado em Medicina Tropical, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço em especial à Dra. Martha Cecilia Suárez-Mutis e à Dra Vanessa Salete de Paula, por conduzirem de forma espetacular esse programa, formando mestres médicos da turma DIP.

Aos membros da banca pela contribuição científica.

Aos amigos da turma de mestrado de DIP, pela cumplicidade.

Aos meus pais, Otavio Teixeira da Rosa e Rosane Abdalla Rosa, desde sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todas as fases de minha vida pessoal e acadêmica.

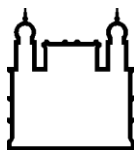
Ao meu marido Mauro Poggiali Gasparoni Júnior, meu amor, meu companheiro e meu porto seguro em todos os caminhos da minha vida.

Às minhas lindas filhas Sophia Abdalla Gasparoni e Betina Abdalla Gasparoni, minhas razões de viver, meus maiores motivos para crescer e ser sempre melhor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES)- código de financiamento 001.

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é
assim: esquenta e esfria, aperta e daí
afrouxa, sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é sempre
coragem.”*

Guimarães Rosa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C

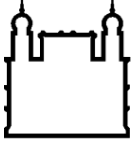
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Luciana Abdalla Rosa Gasparoni

São amplamente discutidas na literatura as ações do vírus da hepatite C no organismo humano, em especial, sua atividade no tecido hepático, que gera um processo de agressão, destruição celular e cicatrização a longo prazo culminando com extensas áreas de fibrose hepática e ainda podendo contribuir para o surgimento de carcinoma hepatocelular. Por outro lado, em estudos realizados em pacientes submetidos a transplante hepático foi observado que pacientes com o citomegalovírus (HCMV) tiveram um estágio mais alto de fibrose. A vitamina D tem um importante papel imunomodulador e está associada a várias doenças infecciosas. Este estudo teve como objetivo avaliar a presença do citomegalovírus em portadores do vírus da hepatite C (HCV), avaliar os níveis de enzimas hepáticas e fibrose hepática nos pacientes mono infectados e co infectados, verificando se a co infecção poderia piorar o dano hepático, e verificar a associação com os níveis de vitamina D. Para isto foi realizado um estudo observacional que incluiu 113 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C, recrutados em ambulatório ou hospitais públicos do Rio de Janeiro. Foram realizadas anamnese, análise de prontuários médicos, PCR quantitativo para detecção do citomegalovírus, dosagens de enzimas hepáticas, aferição do grau de fibrose hepática, dosagem de vitamina D. A análise estatística comparativa foi realizada entre os grupos com pacientes mono infectados pelo HCV e co infectados HCV/HCMV. Entre os pacientes analisados 18,58% estavam co infectados com HCV e HCMV, a maioria (52,4%) era do sexo feminino. Na análise das variáveis contínuas observou-se que a mediana dos níveis de carga viral do HCV e vitamina D foram maiores nos pacientes co infectados. Não foi possível encontrar significância estatística nos resultados referentes as enzimas hepáticas e fibrose hepática. Dados na literatura comprovam que a co infecção HCV/HCMV pode afetar a progressão da doença hepática, portanto, é importante monitorar os pacientes portadores de HCV para a infecção pelo HCMV.

Palavras -chave: Vírus da hepatite C, Citomegalovírus, co infecção, hepatite, fibrose hepática, HCV, HCMV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN PATIENTS WITH HEPATITIS C

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Luciana Abdalla Rosa Gasparoni

The actions of the hepatitis C virus in the human body are widely discussed in the literature, in particular, its activity in the liver tissue, generating a process of aggression, cell destruction and long-term healing culminating in extensive areas of liver fibrosis and the appearance of hepatocellular carcinoma. On the other hand, studies carried out in patients undergoing liver transplantation, showed that patients with cytomegalovirus (HCMV) had a higher stage of fibrosis. Vitamin D has an important immunomodulatory role and is associated with several infectious diseases. This study aimed to evaluate the presence of cytomegalovirus in patients with hepatitis C virus (HCV), to evaluate the levels of liver enzymes and liver fibrosis in mono-infected and coinfecting patients, verifying whether coinfection could worsen liver damage, and to verify the association with vitamin D levels. For this, an observational study was carried out that included 113 patients with chronic hepatitis C virus infection, recruited from an outpatient clinic or public hospitals in Rio de Janeiro. Anamnesis, analysis of medical records, quantitative PCR for detection of cytomegalovirus, measurements of liver enzymes, measurement of the degree of liver fibrosis, measurement of vitamin D were performed. Comparative statistical analysis was performed between groups with HCV mono-infected and HCV coinfecting patients. / HCMV. Among the patients analyzed, 18.58% were co-infected with HCV and HCMV, the majority (52.4%) were female. In the analysis of continuous variables, it was observed that the median levels of HCV and vitamin D viral load were higher in co-infected patients. It was not possible to find statistical significance in the results regarding liver enzymes and liver fibrosis. Data in the literature prove that HCV-HCMV co-infection can affect the progression of liver disease, so it is important to monitor patients with HCV for HCMV infection.

Keywords: Hepatitis C vírus, Cytomegalovirus, coinfection, hepatitis, liver fibrosis, HCV, HCMV.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Histórico da hepatite C	20
1.2 Vírus da hepatite C	21
1.2.1 Diversidade genômica viral	22
1.2.2 Patogênese viral.....	24
1.3 Epidemiologia hepatite C	25
1.3.1 Aspectos epidemiológicos no mundo	25
1.3.2 Aspectos epidemiológicos da hepatite C no Brasil.....	30
1.4 Transmissão do HCV	35
1.5 Manifestações clínicas Hepatite C	36
1.5.1 Hepatite aguda.....	36
1.5.2 Hepatite crônica.....	37
1.5.3 Hepatite fulminante.....	37
1.6 Diagnóstico laboratorial Hepatite C	37
1.6.1 Diagnóstico laboratorial inespecífico	38
1.6.2 Métodos sorológicos	39
1.6.3 Técnicas moleculares de amplificação de ácidos nucleicos.....	39
1.6.3.1 Métodos de amplificação não isotérmica.....	40
1.6.3.1.1 RT PCR	40
1.6.3.1.2 PCR em tempo real	40
1.6.3.2 Métodos de amplificação isotérmica	40
1.6.3.2.1 Amplificação baseada em sequência de ácido nucleico (NASBA)	41
1.6.3.2.2 Transcrição mediada por amplificação	41
1.6.3.2.3 Amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP).....	41
1.6.3.2.4 Método de Rolling Circle Amplification (RCA)	41
1.6.4 Tecnologias de transdutor.....	42
1.6.4.1 Ensaio de reconhecimento bioelétrico (BERA)	42
1.6.5 Nanotecnologia.....	42

1.6.6 Genotipagem.....	42
1.7 Métodos nao invasivos para avaliação da fibrose hepática.....	43
1.7.1 APRI, FIB-4, índice de Forns	44
1.8 Histórico do HCMV	45
1.9 O Citomegalovirus.....	46
1.10 Epidemiologia do HCMV.....	48
1.10.1 Aspectos epidemiológicos do HCMV no mundo	48
1.10.2 Aspectos epidemiológicos do HCMV no Brasil.....	49
1.11 Transmissão HCMV.....	50
1.12 Patogenia e reativação da infecção por HCMV.....	51
1.13 Hepatite por HCMV	52
1.14 Diagnóstico HCMV	53
1.14.1 Sorologia.....	53
1.14.2 Cultura celular.....	53
1.14.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	54
1.15 Vitamina D	54
2. JUSTIFICATIVA	55
3. OBJETIVOS	56
3.1. Objetivo Geral	56
3.2. Objetivos Específicos	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1. Desenho do estudo.....	57
4.2. Exames laboratoriais.....	57
4.3. Considerações éticas	59
4.4. Análise estatística.....	59
5. RESULTADOS	61
5.1. Características demográficas e epidemiológicas da população do estudo.....	61
5.2. Análise dos fatores relacionados à coinfeção hepatite C e citomegalovírus.....	63

6.DISSCUSSÃO	67
7.CONCLUSÕES	73
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
9.ANEXOS	84
Anexo 1 Parecer do Comitê de Ética.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Modelo da estrutura da partícula do HCV	21
Figura 1.2	Esquema da organização genômica do HCV	22
Figura 1.3	Distribuição global dos genótipos do vírus hepatite C	23
Figura 1.4	Distribuição de infecções HCV prevalentes e incidentes, por região da OMS em 2015	26
Figura 1.5	Número de casos de hepatite C aguda relatados e infecções estimadas Estados nos Unidos, 2011–2018	27
Figura 1.6	Taxas de hepatite C aguda relatadas, por faixa etária Estados Unidos, 2003–2018	28
Figura 1.7	Taxas de hepatite C aguda relatada, por sexo - Estados Unidos, 2003–2018	28
Figura 1.8	Número de casos de hepatite C crônica recém-notificados por sexo e idade - Estados Unidos, 2018 (N = 137.713)	29
Figura 1.9	Prevalência global da Hepatite C	29
Figura 1.10	Proporção de casos de hepatites virais notificados segundo as regiões. Brasil, 1999 a 2017	30
Figura 1.11	Taxa de incidência/deteção de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017	31

Figura 1.12	Distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2016	31
Figura 1.13	Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017.	32
Figura 1.14	Taxa de incidência de casos de hepatite C segundo UF e capital de residência. Brasil, 2017.	33
Figura 1.15	Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo sexo, razão de sexos e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2017	34
Figura 1.16	Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2017.	35
Figura 1.17	Proporção de casos de hepatite C segundo provável fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017	36
Figura 1.18	Evolução dos marcadores sorológicos no diagnóstico hepatite C	38
Figura 1.19	Cálculo do APRI	44
Figura 1.20	Cálculo do FIB	45
Figura 1.21	Cálculo do índice de Forns	45

Figura 1.22	Células infectadas por HCMV com inclusões intranucleares com halo	46
Figura 1.23	Esquema estrutural do Citomegalovírus	47
Figura 1.24	Distribuição global da frequência de anticorpos IgG anti-HCMV	49
Figura 1.25	Soroprevalência do HCMV nos estados brasileiros	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Divisão dos Herpesvírus em subfamílias e gêneros com seus respectivos vírus representativos	47
Tabela 5.1	Análise descritiva dos indivíduos portadores de hepatite C	61
Tabela 5.2	Fatores associados à coinfeção hepatite e citomegalovírus	64
Tabela 5.3	“Covariate balance summary”	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1	Proporção entre os sexos de todos os pacientes portadores de hepatite C	61
Gráfico 5.2	Proporção entre os graus de fibrose nos pacientes portadores de hepatite C	61
Gráfico 5.3	Proporção entre os pacientes portadores de hepatite C com dosagem de vitamina D abaixo e acima de 30 ng / mL	63
Gráfico 5.4	Proporção entre monoinfecção e coinfeção nos pacientes portadores de hepatite C	65
Gráfico 5.5	Proporção entre os sexos feminino e masculino nos grupos de coinfeção positiva e negativa HCV-HCMV	65
Gráfico 5.6	Proporção entre os pacientes com dosagem de vitamina D acima de 30ng/ml nos grupos de coinfeção positiva e negativa HCV-HCMV.	66

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% Porcentagem

°C – Graus Celsius

AHV – Ambulatório de Hepatites Virais

AKT – Proteína quinase B, do inglês Protein Kinase B

ALT – Alanina Aminotransferase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato Aminotransferase

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CD, do inglês – “*Cluster of Differentiation*”- Grupamento de diferenciação

CDC, do inglês - “*Center for Disease Control and Prevention*”- Centro de controle e prevenção de doenças.

CHC- Carcinoma Hepatocelular

HCMV – Cytomegalovirus

CRIE – Centro de Referência de Imunobiológicos Especiais

DAA – Antivirais de ação direta

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

EIA , do inglês- “*Enzyme Immunoassay*” -Imunoensaio enzimático

EIE – Ensaio imunoenzimáticos

ELISA , do inglês-“ *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”- – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

HAV – Hepatitis A Virus

HAVCR – Hepatitis A Virus Cellular Receptor

HBsAg – Hepatitis B Virus surface Antigen

HBV – Hepatitis B Virus

HCV – Hepatitis C Virus

HCMV – Human Cytomegalovirus

HIV – Human Immunodeficiency Virus

IC – Intervalo de Confiança

IgG – Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M
IL – Interleucina
INF – Interferon
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
Kb – Kilobase
L – Litro
LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro Noel Nutels
LAHEP – Laboratório de Hepatites Virais
LBA- Lavado Broncoalveolar
LCR- Líquido Cefalorraquidiano
mg – miligrama
ml – mililitro
MS – Ministério da Saúde
NC – Não Codificante
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR , do inglês- "*Polymerase Chain Reaction*"- Reação em cadeia da polimerase
RIBA –Immunoblot recombinante
RJ – Rio de Janeiro
RNA , do inglês – "*Ribonucleic Acid*" - Ácido ribonucleico
S/CO – Relação entre Sinal e Valor de Corte
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS – Sistema Único de Saúde
TAP – Tempo e Atividade da Protrombina
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tregs – Linfócitos T regulatórios
U – Unidade
URL – Unidade Relativa da Luz
VAg , do inglês- "*Viral Protein Genome Linked*"- Proteína viral ligada ao genoma
 μ l – Microlitro
 χ^2 – Teste Qui-quadrado

1. INTRODUÇÃO

São amplamente discutidas na literatura as ações do vírus da hepatite C no organismo humano, em especial, sua atividade no tecido hepático, que gera um processo de agressão, destruição celular e cicatrização a longo prazo culminando com extensas áreas de fibrose hepática, podendo contribuir para o surgimento de carcinoma hepatocelular. A maioria dos vírus da hepatite [vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite D (HDV)] e vírus da imunodeficiência humana (HIV), estabelecem infecções crônicas em que ocorre replicação constante. Isso leva à inflamação crônica, muitas vezes resultando em grave dano tecidual do órgão infectado(1).

Infecções virais persistentes podem ser latentes ou crônicas. A infecção latente é caracterizada por longos períodos de inatividade viral, sem replicação ou produção de novos virions, embora os estímulos de estresse possam desencadear episódios de reativações. Exemplos de vírus que estabelecem infecção latente são os vírus herpes [citomegalovírus (HCMV), vírus herpes simplex (HSV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus varicela-zoster (VZV)]. A infecção pelo HCMV é bastante prevalente na população geral, mas em pacientes hígidos não costuma cursar com significativa morbimortalidade, porém, tem sido bastante estudada a atividade de doença hepática pelo HCMV em pacientes transplantados hepáticos, mostrando reativação de doença latente e hepatite no enxerto por tal vírus (2-4).

Em estudos preliminares, pacientes com doença por HCMV tiveram um estágio mais alto de fibrose e tendência a um maior índice de atividade de hepatite e carga de HCV após o transplante de fígado. Desta forma, há evidências de que a patogênese do HCV é influenciada por sua interação com o HCMV (5).

1.1 Histórico da hepatite C

Na década de 70, dois tipos virais causadores de hepatites haviam sido identificados: o HBV, membro protótipo de uma nova família de vírus de DNA, *Hepadnaviridae*; seguido do HAV, um picornavírus designado para um novo gênero: Hepatovirus. Com o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico sorológico observou-se que diversos casos de infecções pós transfusionais não eram causados

por HBV ou HAV, surgindo, então, o termo hepatites não-A não-B (NANB) para classificar esse novo agente (6). A partir de 1980, foi possível a detecção e identificação de diversos patógenos infecciosos através das técnicas de biologia molecular, tal como a identificação e caracterização viral em clones de DNA complementar (cDNA). Em 1989, um clone de cDNA, 5-1-1 proveniente de amostras de plasma e fígado derivados de chimpanzés infectados, foi isolado por Choo e colaboradores (7) através do uso do método de triagem imunológica randômica, e através de comparação em biblioteca de cDNA, onde os anticorpos provenientes de pacientes com diagnóstico de hepatite NANB foram usados. Foi possível identificar um clone de cDNA codificando um epítipo imunodominante dentro da proteína não-estrutural 4 do vírus. Após seis meses de análises extensas o clone 5-1-1 foi identificado e recebeu o nome de vírus da hepatite C (7) (6)

1.2 Vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) pertence ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*. É um vírus envelopado, seu nucleocapsídeo contém uma única fita de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 9,6 kb. A partícula viral tem formato esférico e mede aproximadamente 50 nm de diâmetro (8). O nucleocapsídeo é icosaédrico e tem diâmetro de aproximadamente 30 nm (Figura 1.1).

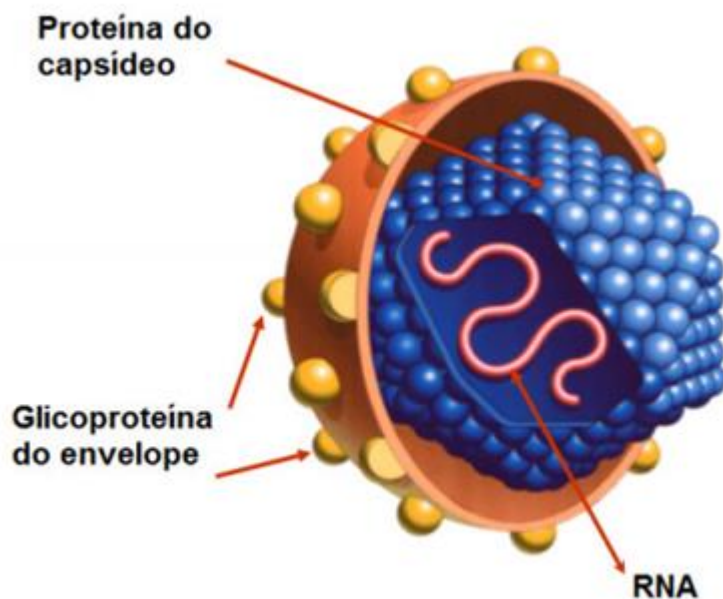


Figura 1.1: Modelo da estrutura da partícula do HCV (fonte: Ministério da Saúde, 2020)

O HCV-RNA é flanqueado por duas regiões não traduzidas altamente conservadas que apresentam importante função na regulação da ativação e replicação viral denominadas 5'UTR e 3'UTR. Apresenta apenas uma fase de leitura aberta capaz de codificar para uma poliproteína precursora com cerca de 3.000 aminoácidos (7, 9). Sob ação conjunta de proteinases do hospedeiro e codificadas pelo próprio vírus, a poliproteína é clivada em, pelo menos, 10 proteínas virais maduras, as quais estão arrumadas como segue (da terminação amino para carboxi): NH₂-C-E1-P7-E2-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH(9) (Figura 1.2). Essas proteínas apresentam funções distintas: estruturais (C, E1 e E2) e não-estruturais (p7, NS2 a NS5) (10).

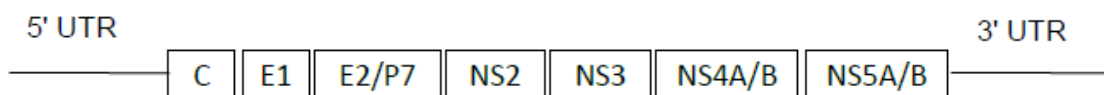


Figura 1.2 Esquema da organização genômica do HCV. Fonte: Adaptado (CLARKE, 1997).

A proteína C corresponde a proteína do core, enquanto as proteínas E1 e E2 constituem as glicoproteínas do envelope viral. As proteínas não-estruturais NS3, NS5A e NS5B, por exemplo, têm função enzimática, protease viral e RNA polimerase, respectivamente (11). Alguns dos genes do HCV foram associados à sua natureza quasispécie e escape do sistema imunológico do hospedeiro, cronificação da doença e resposta terapêutica (12).

1.2.1 Diversidade genômica

Ao longo da história da investigação e estudo do vírus da hepatite C, recorreu-se amplamente ao estudo das variações genômicas do mesmo. Através da análise filogenética das sequências dos diversos espécimes isolados em todo mundo, foi estabelecido um sistema de classificação dos genótipos (1 a 7) e subtipos (a, b, c...) (13). A genotipagem do HCV tornou-se imprescindível para a definição do esquema terapêutico, já que há evidências que os genótipos do HCV estão relacionados com maior ou menor sensibilidade aos diferentes tratamentos medicamentosos, tendo em vista que cada subtipo apresenta singularidades que possibilitam o surgimento de mutações primárias de resistência aos mesmos. Além disso, a definição dos genótipos

é válida para o estudo da epidemiologia da doença, pois a distribuição dos genótipos varia de região para região (figura 1.3) (14-18). De acordo com um artigo de revisão de 2019 (19), globalmente, as infecções mais comuns são com os genótipos do HCV 1 (44% dos casos), 3 (25% dos casos) e 4 (15% dos casos) (18, 19).

No Brasil, são encontrados, principalmente, os genótipos 1, 2 e 3, com predominância do genótipo 1 sobre os genótipos 2 e 3, com distribuição de 60% para o primeiro e taxas aproximadas de 40% entre os dois outros genótipos comumente encontrados (figura 1.3)(20, 21).

O HCV como outros vírus de genoma RNA é caracterizado por um alto grau de heterogeneidade genética. Isto é decorrente de erros provocados pela RNA polimerase durante a replicação viral (10). Além disso, muitos vírus RNA possuem a capacidade de tolerar a substituição de mais de 50% dos seus nucleotídeos sem perda de viabilidade. Estas características determinam a existência no sangue do hospedeiro de grupos heterogêneos proximamente relacionados denominados quasiespécies (22). A natureza quasiespécie do HCV confere uma vantagem para o estabelecimento do vírus, uma vez que a presença simultânea de múltiplas variantes genômicas e a alta taxa de replicação permitem rápida seleção dos mutantes melhor adaptados às novas condições no hospedeiro (12, 22, 23).

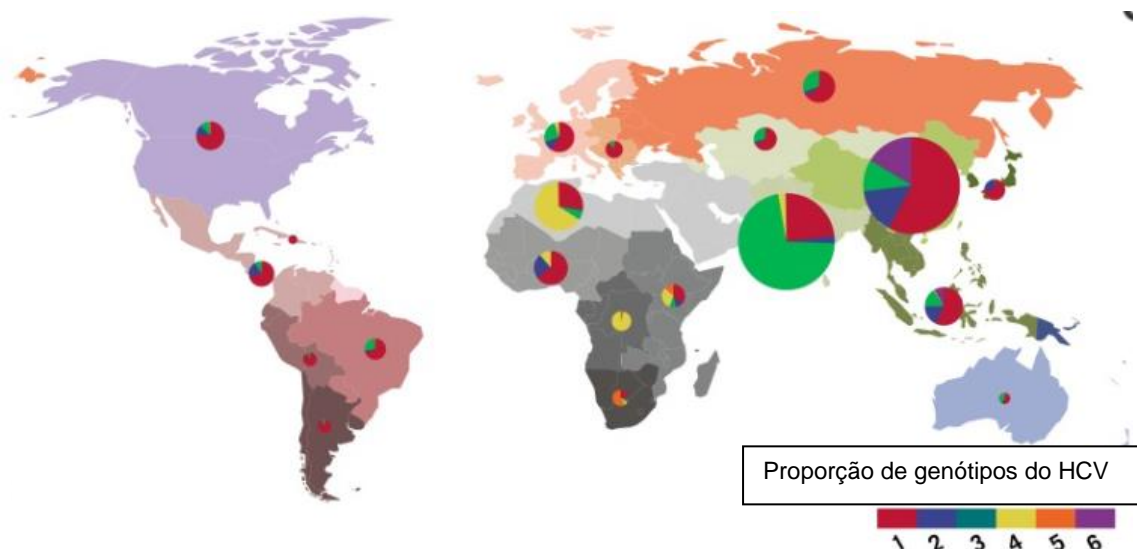


Figura 1.3 : Distribuição global dos genótipos do vírus hepatite C (adaptado de Messina J.P, 2015)

1.2.2 Patogênese viral

O ciclo replicativo do HCV está relacionado com o metabolismo lipídico da célula do hospedeiro: sua entrada na célula está associada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumentando sua expressão e inibindo sua degradação, levando a um aumento da concentração intracelular de lipídios necessária à formação da partícula viral (com grande quantidade de conteúdo lipoproteico) (24). A replicação do RNA viral ocorre na face citosólica da membrana do retículo endoplasmático e, após a maturação, as partículas virais são liberadas no lúmen do retículo, onde são associadas a lipídios, formando as partículas lipovirais e então exportadas do hepatócito. Menos de 25% dos infectados experimenta um quadro agudo que pode cursar com icterícia, elevação de transaminases, mal estar, náusea e dor no quadrante superior direito do abdome, o que pode persistir por até 12 semanas. Há normalização das transaminases em aproximadamente 40% dos casos e 75-100% permanece com o vírus C podendo evoluir para hepatite C crônica (25). Fatores relacionados ao vírus e ao hospedeiro podem influenciar na progressão da doença. Com relação ao vírus, podem ser citados carga viral e genótipo. Há divergência nas publicações quanto à relação da carga viral plasmática do vírus C e o grau de lesão hepática, já que isso pode não refletir a proporção de hepatócitos infectados e, ainda, pelo dano citopático ser determinado principalmente pela resposta imune do hospedeiro (19). Já referente ao genótipo viral, é sabido que portadores de infecção pelo genótipo 3 podem apresentar progressão mais rápida para cirrose, e aqueles já cirróticos infectados pelos genótipos 1b ou 3 são mais propensos a desenvolver carcinoma hepatocelular (CHC) (26). A cronificação da infecção pelo HCV (persistência de replicação viral por mais de seis meses a partir de sua identificação) está principalmente relacionada à imunidade celular, visto que pode haver eliminação espontânea do vírus em 15% a 35% dos casos (19). A exemplo de fatores associados ao hospedeiro e relacionados à progressão da doença hepática pelo vírus C podemos citar: sexo (progride mais rapidamente em homens), idade (crianças e indivíduos infectados com menos de 40 anos tem melhor prognóstico) e etnia (caucasianos apresentam melhor evolução) e coinfeção com outros vírus como HIV e vírus da hepatite B. Indivíduos com doença gordurosa do fígado (esteatose) não alcoólica, obesidade, resistência insulínica, transplantados de órgãos, bem como aqueles com estágio de fibrose mais avançado e os que mantêm consumo de álcool (não há doses seguras para consumo de álcool

nessa população) experimentam maior probabilidade de evoluir para cirrose hepática(27, 28).

1.3 Epidemiologia hepatite C

1.3.1 Aspectos epidemiológicos no mundo

De acordo com o Relatório sobre as hepatites virais da Organização Mundial de Saúde (OMS) publicado em 2018, as hepatites virais causaram 1,34 milhão de mortes em 2015, número comparável às mortes causadas por tuberculose e HIV. Entretanto, ao mesmo tempo em que a mortalidade por tuberculose e HIV tem diminuído, as mortes por hepatites estão aumentando. Aproximadamente 1,75 milhão de pessoas foram infectadas com o HCV em 2015, elevando o número total de pessoas vivendo com hepatite C no mundo para 71 milhões. O relatório observa que apenas 20% de todas as infecções pelo HCV foram diagnosticadas em 2015. Uma fração ainda menor – 7% dos diagnosticados com infecção pelo vírus da hepatite C (1,1 milhão de pessoas) haviam iniciado tratamento durante esse ano(29).

A prevalência da hepatite C nas regiões da OMS é de 2,3% da população (15 milhões) na região do Mediterrâneo Oriental, 1,5% da população (14 milhões) na região Europeia, 1% da população (11 milhões) na região Africana, 1% da população (7 milhões) na região das Américas, 1% da população (14 milhões) na região do Pacífico Ocidental, e de 0,5% da população (10 milhões), na região do Sudeste Asiático(29).(figura 1.4)

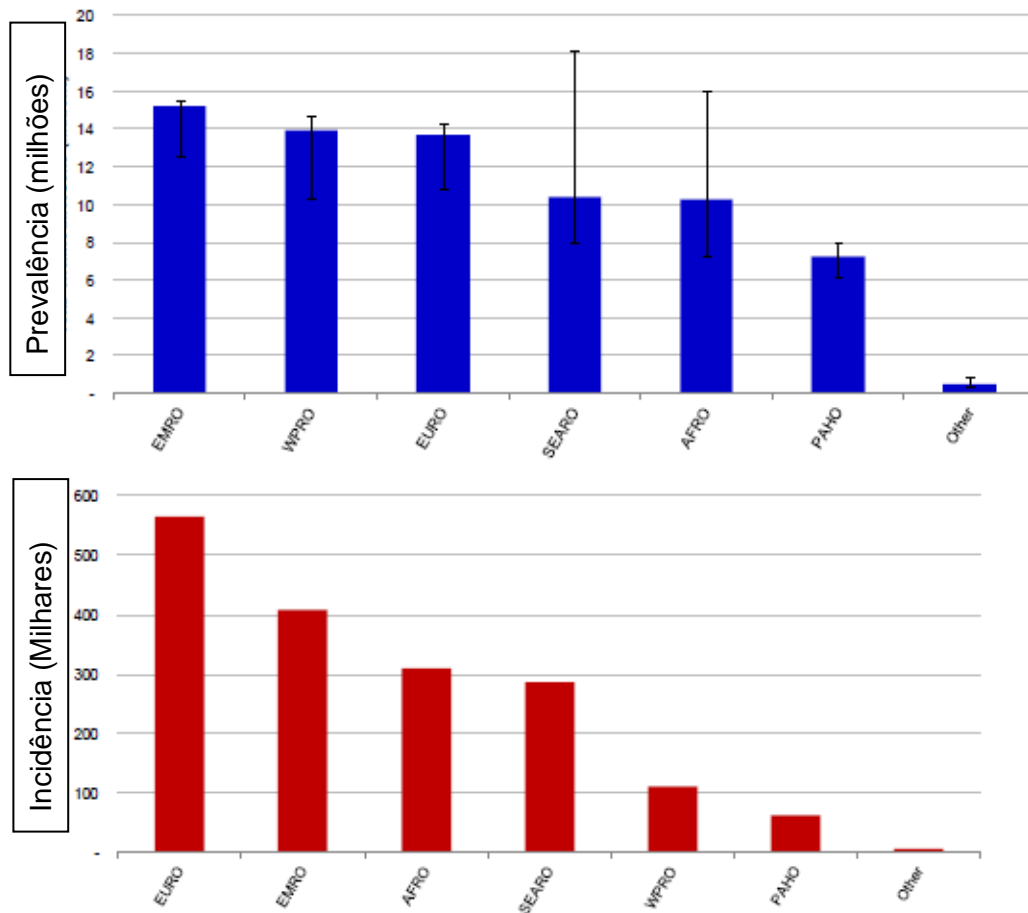


Figura 1.4: Distribuição de infecções por HCV prevalentes e incidentes, por região da OMS, 2015, (adaptado OMS 2018).

De acordo com o relatório do CDC sobre a prevalência das hepatites virais, publicado em julho de 2020(30) no ano de 2018, nos Estados Unidos foram notificados 3.621 casos de hepatite C aguda ao CDC, resultando em 50.300 infecções estimadas. A contagem de casos de hepatite C aguda relatada em 2018, corresponde a uma taxa de 1,2 casos por 100.000 habitantes, representando um aumento de mais de 71% da taxa de incidência relatada de 0,7 casos por 100.000 habitantes em 2014(figura 1.5). Mais de 65% dos casos de hepatite C aguda relatados ao CDC em 2018 estavam entre pessoas de 20 a 39 anos. A taxa de mortalidade ajustada por idade para hepatite C em 2018 foi 3,72 mortes por 100.000 habitantes, representando uma redução de quase 26% da taxa de mortalidade em 2014 (5,01 mortes por 100.000 habitantes). Apesar dessa melhora, as taxas de mortalidade associadas à hepatite C aumentaram em 15 jurisdições de 2017 a 2018. A classificação dos grupos afetados pela hepatite C em 2018 por idade foi: De 20 a 29 anos: 3,1 casos por 100.000 pessoas, de 30 a 39 anos: 2,6 casos por

100.000 pessoas, de 40 a 49 anos: 1,3 casos por 100.000 pessoas(figuras 1.6 e 1.8).Quando analisada a distribuição por sexo, a maioria acometeu homens: 1,3 casos por 100.000 pessoas. Os homens em geral apresentaram taxas mais altas de hepatite C do que as mulheres. Homens e mulheres mostraram um padrão bifásico de novas infecções, com infecções aumentando no final da adolescência e início dos 20 anos, diminuindo até os 20 e 30 anos, aumentando novamente no final dos 40 anos até o início dos 60 anos e diminuindo nos anos restantes(30) (figuras 1,7 e 1,8). Houve 214 casos de hepatite C perinatal notificados ao CDC em 2018, que foi o primeiro ano em que a vigilância padronizada para hepatite C perinatal foi conduzida pelos estados americanos e as notificações de casos foram enviadas ao CDC.

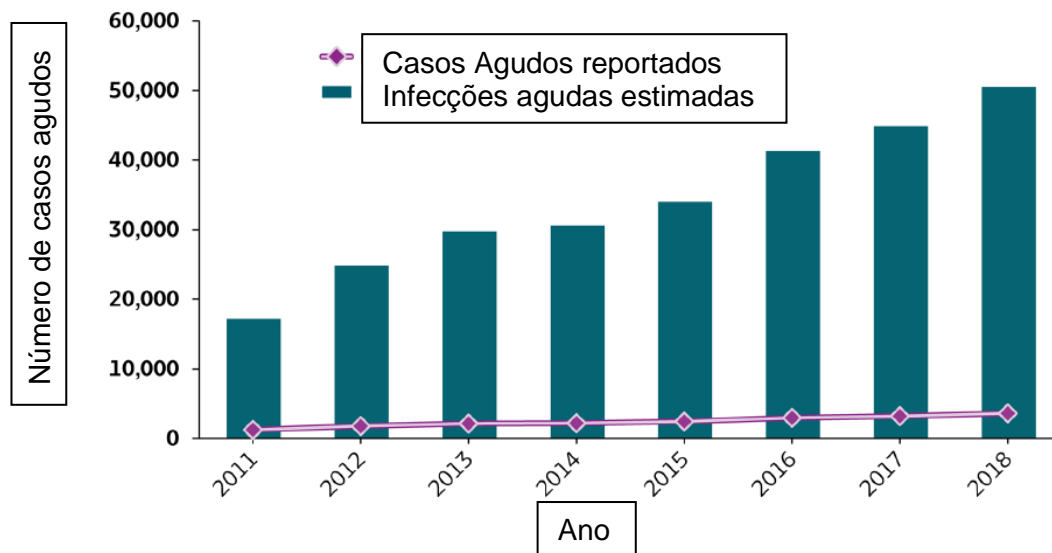


Figura 1.5 : Número de casos de hepatite C aguda relatados e infecções estimadas Estados nos Unidos, 2011–2018 (adaptado de CDC 2018)

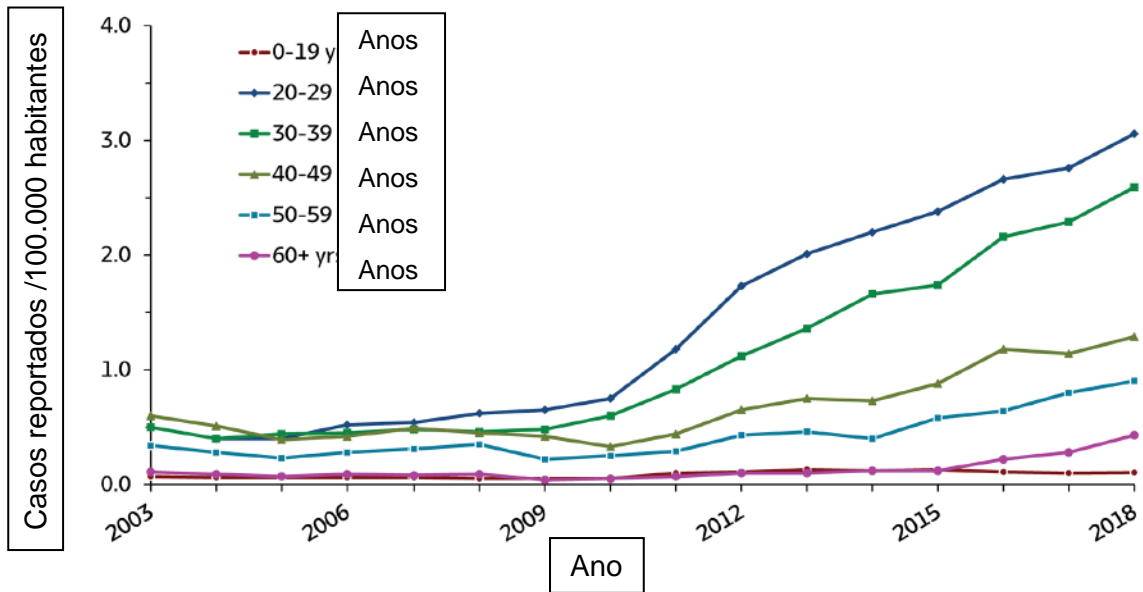


Figura 1.6 Taxas de hepatite C aguda relacionadas, por faixa etária - Estados Unidos , 2003–2018 (adaptado CDC 2018)

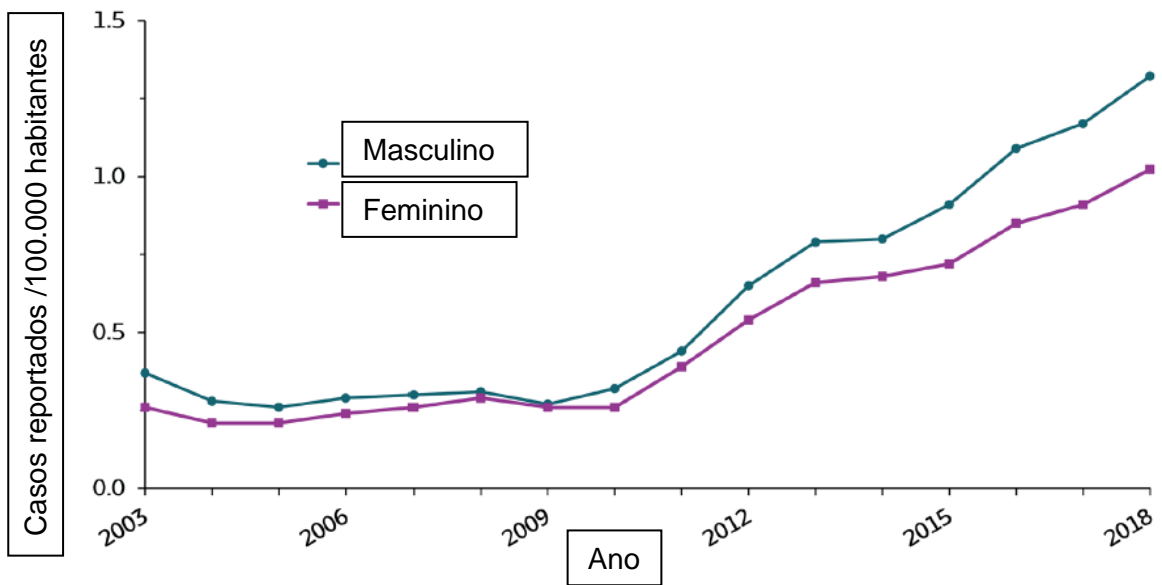


Figura 1.7 Taxas de hepatite C aguda relatada, por sexo - Estados Unidos, 2003-2018(adaptado CDC 2018).

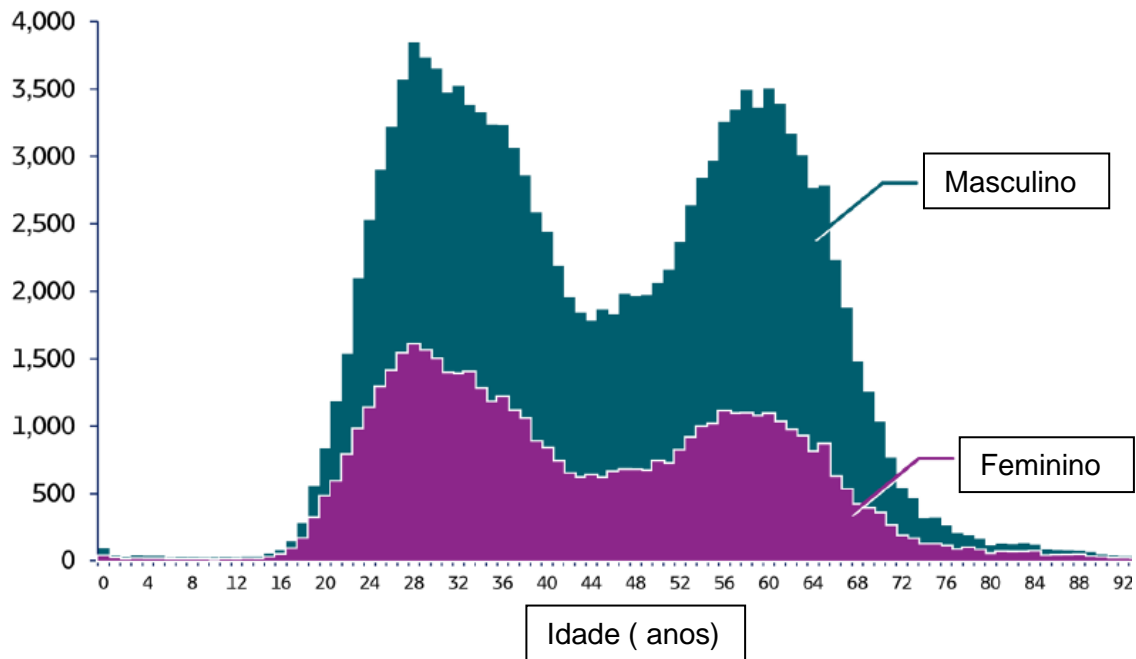


Figura 1.8 Número de casos de hepatite C crônica recém-notificados por sexo e idade - Estados Unidos, 2018 (N = 137.713) (adaptado de CDC 2018)

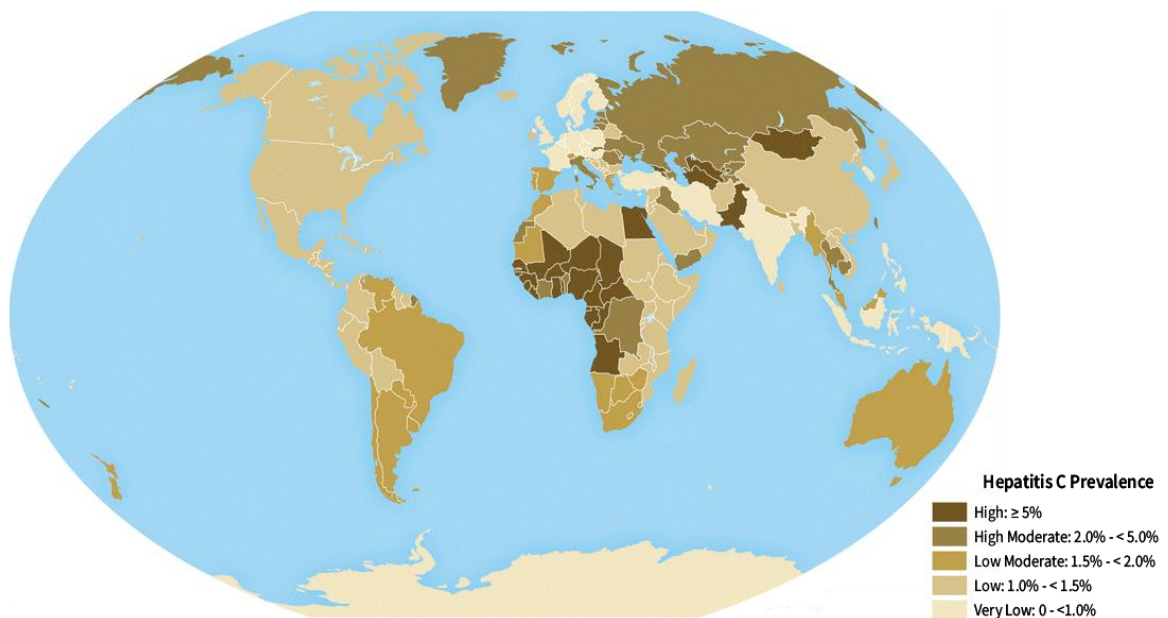
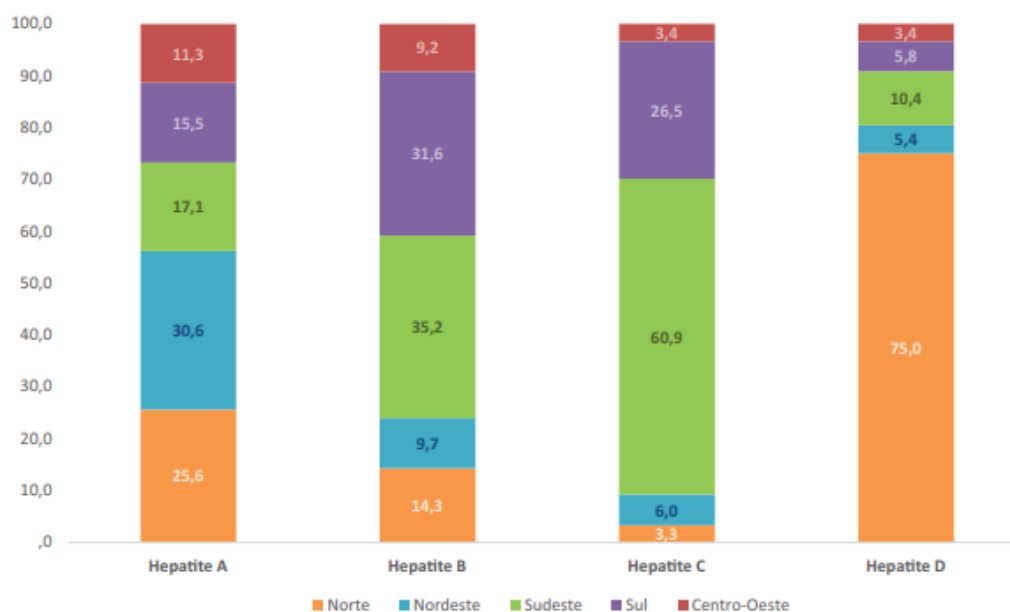


Figura 1.9: Prevalência global da Hepatite C. (adaptado CDC,2020)

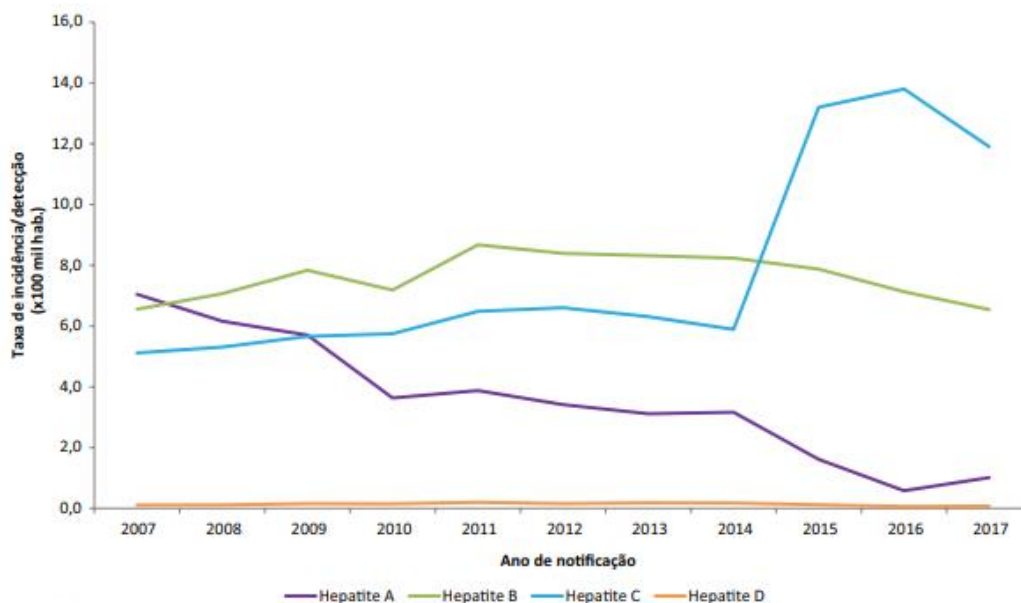
1.3.2 Aspectos epidemiológicos no Brasil

Segundo o Boletim epidemiológico de 2018 das hepatites virais, da secretaria de vigilância em saúde, do Ministério da saúde, no período de 1999 a 2017, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 587.821 casos confirmados de hepatites virais no Brasil. Destes, 200.839 (34,2%) de hepatite C (Tabela 1). A distribuição proporcional dos casos varia entre as cinco regiões brasileiras. Na região Sudeste verificam-se as maiores proporções do vírus C 60,9% (figura 1.10). As taxas da hepatite C mostraram tendência de aumento, em especial a partir de 2015, quando da mudança de definição dos casos para fins de vigilância epidemiológica. Em 2017, as taxas foram de 11,9 casos por 100.000 habitantes para o agravo (31). (figura 1.11)



Fonte: Sinan/SVS/MS.

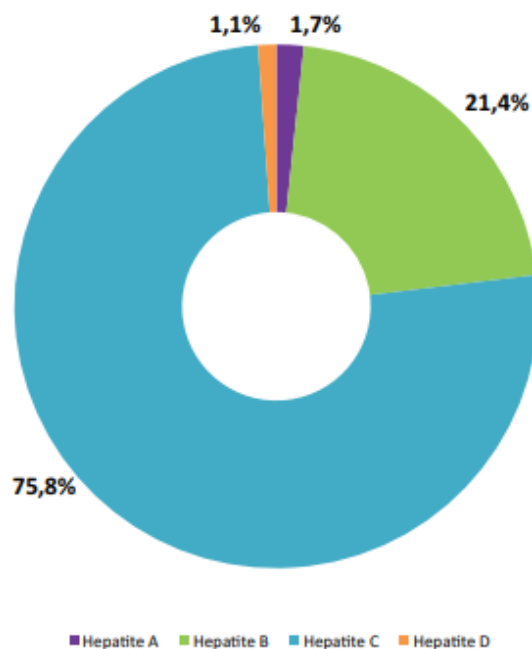
Figura 1.10. Proporção de casos de hepatites virais notificados segundo as regiões. Brasil, 1999 a 2017. Ministério da saúde, 2019.



Fonte: Sinan/SVS/MS.

Figura 1.11. Taxa de incidência/deteccção de hepatites virais segundo agente etiológico e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017. Ministério da saúde, 2019.

De 2000 a 2016, foram identificados, no Brasil, pelo Sistema de Informação de Mortalidade (SIM), 66.196 óbitos por causas básicas e associadas às hepatites virais dos tipos A, B, C e D. Desses, 75,8% à hepatite C(31). (Figura 1.12)



Fonte: SIM/SVS/MS.

Figura 1.12. Distribuição dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo agente etiológico. Brasil, 2000 a 2016. Ministério da saúde, 2019

De 1999 a 2017, foram notificados no Brasil 331.855 casos de hepatite C com um dos marcadores – antiHCV ou HCV-RNA – reagente, ou detectável, respectivamente. Considerando-se os casos que possuíam ambos os marcadores antiHCV reagente e HCV-RNA detectável, foram notificados 160.105 casos. Esses dois critérios devem ser considerados devido à mudança da regra de notificação de casos de hepatite C ocorrida em 2015: os casos, que previamente eram notificados com dois marcadores reagentes, passaram, então, a ser notificados com apenas um deles. Dito isso, observam-se 200.839 casos notificados de hepatite C – até 2014 segundo o critério antigo (ambos os marcadores) e a partir de 2015 mediante o novo critério (qualquer um dos marcadores). Assim, pode-se observar uma tendência de elevação na taxa de detecção em todas regiões a partir de 2015, quando a definição de caso se tornou mais sensível. Na análise da distribuição dos casos com antiHCV reagente e HCV-RNA detectável (160.105) por regiões, 63,2% destes ocorreram no Sudeste, 25,2% no Sul, 5,9% no Nordeste, 3,2% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte. Em 2017, a taxa de detecção da região Sul foi a maior, com 24,3 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelo Sudeste (15,6), Norte (6,3), Centro-Oeste (5,9) e Nordeste (3,2). A tendência da taxa de detecção por hepatite C por região e ano de notificação, segundo os respectivos critérios de notificação (31). (figura 1.13)

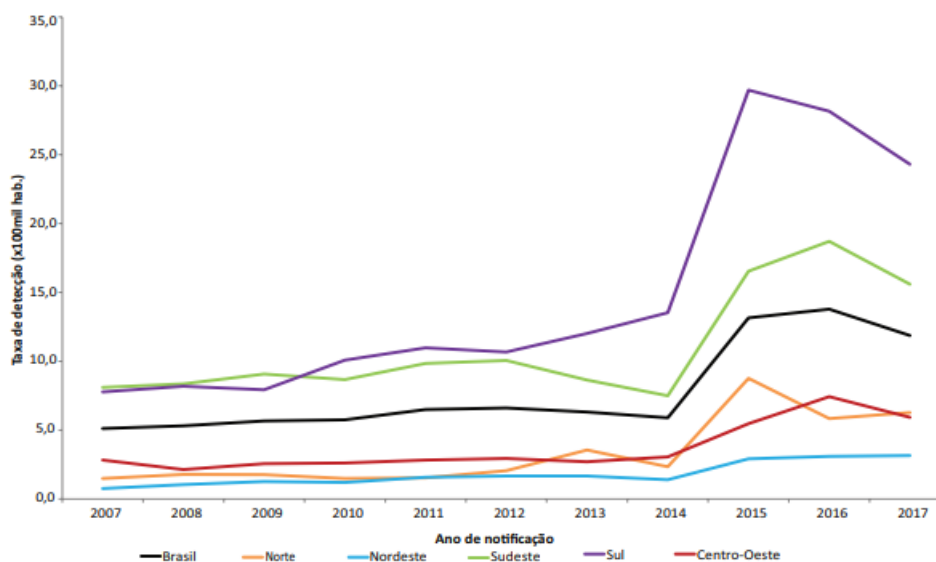
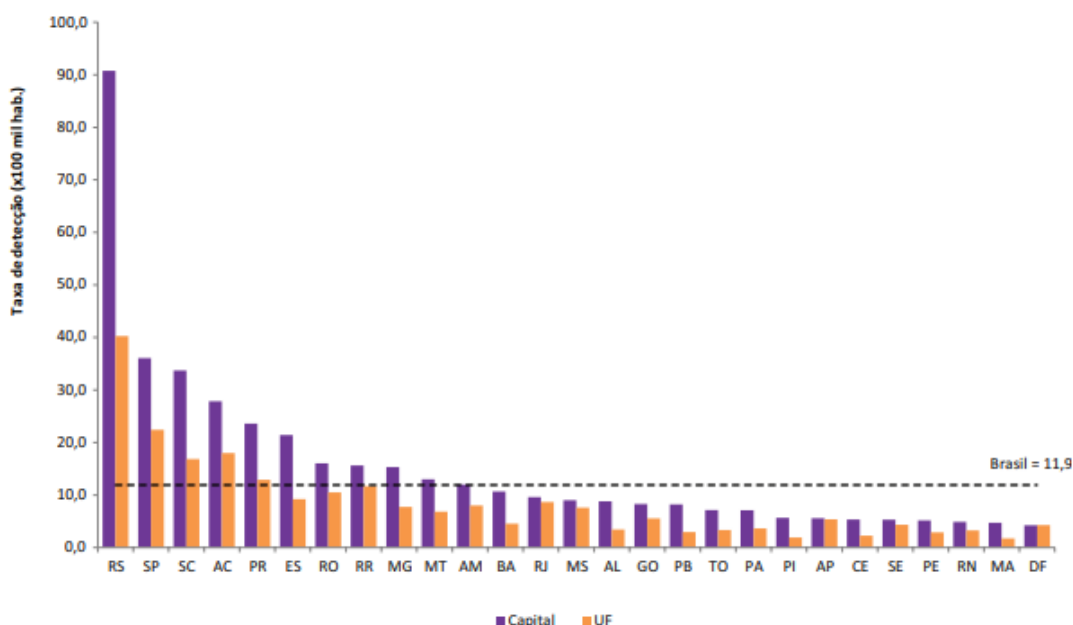


Figura 1.13. Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo região de residência e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017. Ministério da saúde, 2019.

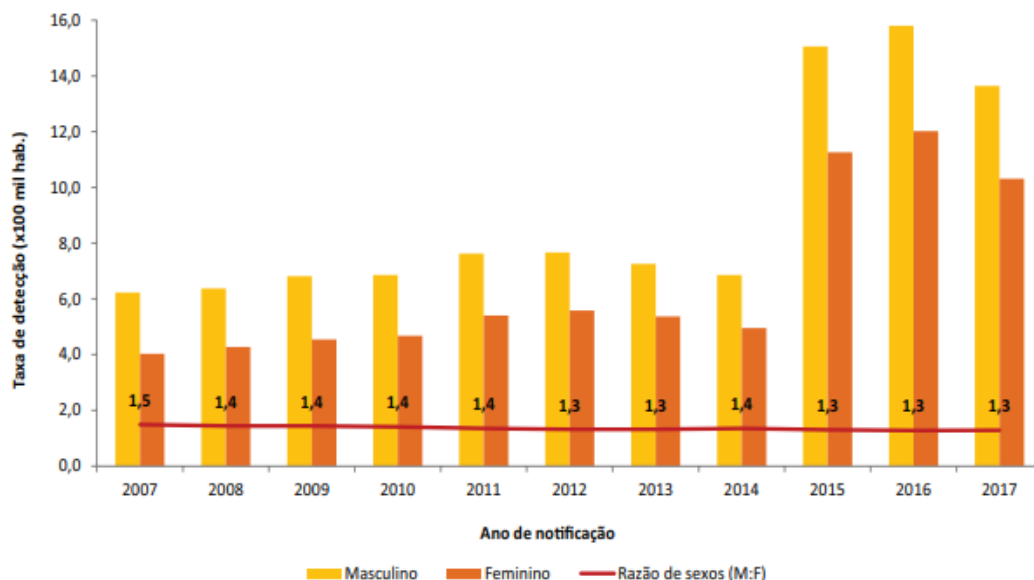
Em 2017, o ranking das capitais com as maiores taxas de detecção de hepatite C apresentou 11 capitais com taxas superiores à nacional (11,9 casos por 100 mil habitantes). Destaca-se Porto Alegre-RS (90,7 casos por 100 mil habitantes) com a maior taxa entre as capitais, seguida de São Paulo-SP (36,1), Florianópolis-SC (33,7), Rio Branco-AC (27,8), Curitiba-PR (23,6), Vitória-ES (21,4), Porto Velho-RO (16,0), Boa Vista-RR (15,6), Belo Horizonte-MG (15,3), Cuiabá-MT (13,0) e Manaus-AM (12,0). A menor taxa entre as capitais foi observada em Brasília-DF, com 4,2 casos para cada 100 mil habitantes (31). (figura 1.14)



Fonte: Sinan/SVS/MS.

Figura 1.14. Taxa de incidência de casos de hepatite C segundo UF e capital de residência. Brasil, 2017. Ministério da saúde, 2019.

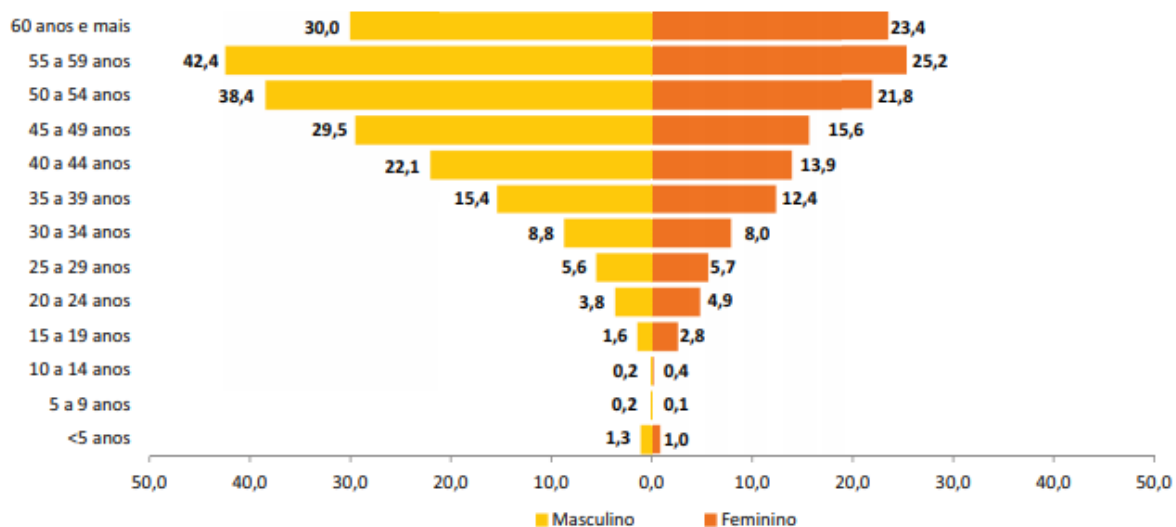
Desde 1999, entre os 200.839 casos confirmados de hepatite C, 116.512 (58,0%) ocorreram em indivíduos do sexo masculino e 84.245 (42,0%) em indivíduos do sexo feminino. Apesar de o número de casos entre homens ser superior, observou-se ligeira diminuição da razão de sexos ao longo dos anos analisados – em 2007, a razão de sexos foi de 1,5, passando para 1,3 no ano de 2017(31). (Figura 1.15)



Fonte: Sinan/SVS/MS.

Figura 1.15. Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo sexo, razão de sexos e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017. Ministério da saúde, 2019.

Em todo o período, observa-se que os casos notificados de hepatite C ocorreram, em sua maioria, na faixa etária acima de 60 anos (20%); quando da análise estratificada por sexo, essa tendência também é observada em ambos os sexos. Em 2017, as maiores taxas de detecção foram observadas, em ambos os sexos, na faixa etária de 55 a 59 anos, chegando a uma taxa de detecção de 42,4 casos por 100 mil habitantes entre homens e 25,2 entre mulheres. Em relação às pessoas mais jovens (até 34 anos de idade), as taxas de detecção observadas foram similares entre os sexos(31).(Figura 1.16).



Fonte: Sinan/SVS/MS.

Figura 1.16. Taxa de detecção de casos de hepatite C segundo faixa etária e sexo. Brasil, 2017. Ministério da saúde, 2019.

1.4 Transmissão do HCV

A hepatite C é transmitida pelo sangue (via parenteral, percutânea e vertical), esperma e secreção vaginal (via sexual). A transmissão pode ocorrer pelo compartilhamento de objetos contaminados, como lâminas de barbear e de depilar, escovas de dente, alicates e acessórios de manicure e pedicure, materiais para colocação de piercing e para confecção de tatuagens, materiais para escarificação da pele para rituais, instrumentos para uso de substâncias injetáveis, inaláveis (cocaína) e pipadas (crack). Pode ocorrer a transmissão também em acidentes com exposição a material biológico, procedimentos cirúrgicos, odontológicos, hemodiálise, transfusão, endoscopia, entre outros, quando as normas de biossegurança não são aplicadas. A transmissão vertical pode ocorrer no momento do parto, porém para hepatite C, a transmissão vertical é menos frequente(31).

De acordo com o Boletim epidemiológico de 2019, do Ministério da Saúde, informações quanto à provável fonte ou mecanismo de infecção, ressalta-se que ocorreu a falta de informação em 53,7% dos casos notificados, tornando difícil a caracterização das prováveis fontes de infecção. Verificou-se que o maior percentual de provável fonte de infecção foi referente ao uso de drogas (13,2%), seguido de transfusão sanguínea (11,4%) e de relação sexual desprotegida (8,9%). Em 2017, a

proporção de infecções por via sexual (9,2%) foi superior ao percentual de infecções relacionadas ao uso de drogas (8,1%), e a proporção de infecções por via transfusional foi de 6,8% (31). (figura 1.17).

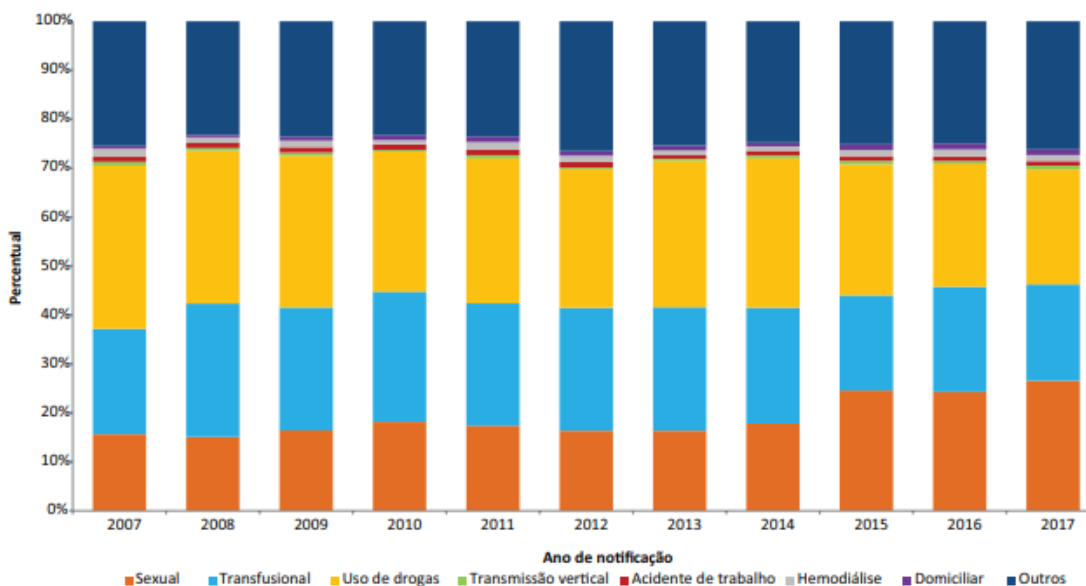


Figura 1.17. Proporção de casos de hepatite C segundo provável fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação. Brasil, 2007 a 2017. Ministério da saúde, 2019

1.5 Manifestações clínicas hepatite C

Após entrar em contato com o vírus, o indivíduo pode desenvolver hepatite aguda oligo/assintomática ou sintomática. Esse quadro agudo pode ocorrer na infecção por qualquer um dos HCV e possui seus aspectos clínicos e virológicos limitados aos primeiros 6 meses.

1.5.1. Hepatite aguda

A hepatite C aguda pode ser classificada em duas fases: (a) Período prodrômico ou pré-ictérico: ocorre após o período de incubação do agente etiológico e anteriormente ao aparecimento da icterícia. Os sintomas são inespecíficos: anorexia, náuseas, vômitos, diarreia ou, raramente, constipação, febre baixa, cefaleia, mal-estar, astenia e fadiga, aversão ao paladar e/ou olfato, mialgia, fotofobia, desconforto no hipocôndrio direito, urticária, artralgia ou artrite e exantema papular ou

maculopapular; (b) Fase ictérica: com o aparecimento da icterícia, em geral, há diminuição dos sintomas prodrômicos. Observa-se hepatomegalia dolorosa, com ocasional esplenomegalia; A fase de convalescença segue-se ao desaparecimento da icterícia. A recuperação completa ocorre após algumas semanas, mas a fraqueza e o cansaço podem persistir por vários meses(32).

1.5.2.Hepatite crônica

A cronicidade da hepatite C é caracterizada pela detecção de material genético ou de antígenos virais por um período de 6 meses ou mais, após o diagnóstico inicial. A infecção crônica pode cursar de forma oligo/assintomática ou sintomática, normalmente com agravamento da doença hepática a longo prazo. Nesses casos, os indivíduos apresentam sinais histológicos de lesão hepática (inflamação, com ou sem fibrose) e marcadores sorológicos ou virológicos de replicação viral(32).

1.5.3.Hepatite fulminante

Termo utilizado para designar a insuficiência hepática aguda, caracterizada pelo surgimento de icterícia, coagulopatia e encefalopatia hepática em um intervalo de até 8 semanas. Trata-se de uma condição rara e potencialmente fatal, cuja letalidade é elevada (40 a 80% dos casos). A fisiopatologia está relacionada à degeneração e necrose maciça dos hepatócitos. O quadro neurológico progride para o coma ao longo de poucos dias após a apresentação inicial(20).

1.6 Diagnóstico laboratorial da hepatite C

De acordo com as diretrizes da OMS, publicadas em 2017, para o diagnóstico da hepatite C, recomenda-se o uso de um único teste sorológico de qualidade, ou seja, um imunoenensaio baseado em laboratório (enzima imunoenensaio ou imunoenensaio de quimiluminiscência) ou teste de diagnóstico rápido (RDT) para detectar o anticorpo do HCV. RDTs usados devem atender ao mínimo padrões de desempenho, e ser entregues no ponto de atendimento para melhorar o acesso aos cuidados médicos e tratamento. Para a confirmação da infecção virêmica e monitoramento da resposta ao tratamento após um resultado de teste sorológico de anticorpo reativo para HCV, um quantitativo ou O RNA NAT qualitativo é recomendado como a estratégia de teste para diagnosticar infecção virêmica. Detecção do antígeno do core do HCV, onde o ensaio tem sensibilidade clínica comparável às tecnologias NAT, pode ser considerado como

uma alternativa (33, 34).

1.6.1 Diagnóstico laboratorial inespecífico

Exames inespecíficos • Aminotransferases (transaminases) – a aspartato aminotransferase (AST/TGO) e a alanino aminotransferase (ALT/TGP) são marcadores de agressão hepatocelular. Nas formas agudas, chegam a atingir, habitualmente, valores até 25 a 100 vezes acima do normal, embora alguns pacientes apresentem níveis mais baixos, principalmente na hepatite C. Em geral, essas enzimas começam a elevar-se uma semana antes do início da icterícia e se normalizam em cerca de 3 a 6 semanas de curso clínico da doença. Nas formas crônicas, na maioria das vezes, elas não ultrapassam 15 vezes o valor normal e, por vezes, em indivíduos assintomáticos, é o único exame laboratorial sugestivo de doença hepática. • Bilirrubinas – elevam-se após o aumento das aminotransferases e, nas formas agudas, podem alcançar valores 20 a 25 vezes acima do normal. Apesar de haver aumento tanto da fração não conjugada (indireta), quanto da conjugada (direta), essa última apresenta-se predominante. Na urina, pode ser detectada precocemente, antes mesmo do surgimento da icterícia (20).(figura 1.18)

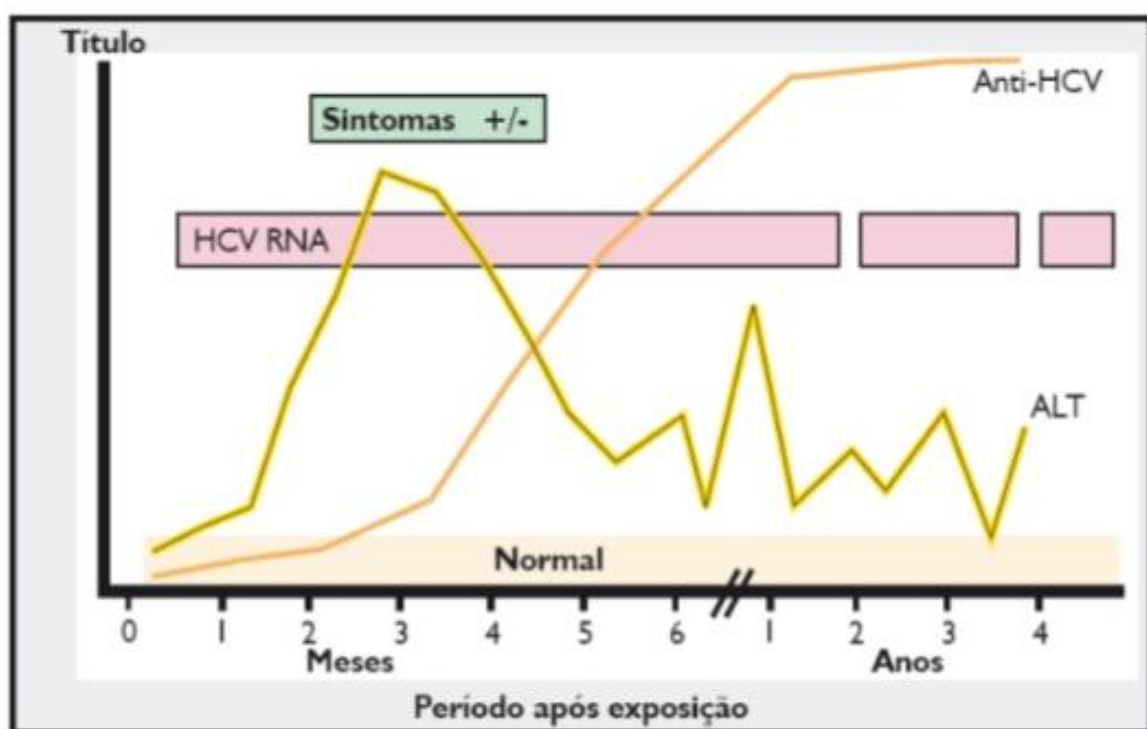


Figura 1.18 Evolução dos marcadores sorológicos no diagnóstico da hepatite C (adaptado MS)

1.6.2 Métodos sorológicos

Os dois principais testes sorológicos são os ensaios imunoenzimáticos (EIE) e os testes rápidos, que se baseiam na detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos virais, estruturais e não-estruturais, no soro ou plasma, ou fluidos orais de indivíduos infectados. Por meio de diversos métodos, dentre eles o EIE, os anticorpos anti-HCV são revelados. Os anticorpos anti-HCV são detectáveis de 4 a 10 semanas após o contato com o vírus, persistindo uma vez que a infecção tende a seguir para um curso crônico. A janela imunológica foi reduzida significativamente com a introdução dos EIE de quarta geração. A quarta geração de testes pode detectar anticorpos a partir 14 a 20 dias de infecção, comparados com 28 a 70 dias da terceira, 82 dias da segunda e 150 dias da primeira geração. Os testes que detectam antígeno e anticorpo apresentam sensibilidade de 100% e especificidade igual ou maior que 99,5%(35).

Nos testes de diagnóstico rápido (RDTs) do HCV Ab, a sensibilidade e especificidade combinadas dos testes foram de 98% (95% CI 98-100%) e 100% (95% CI 100-100%) em comparação com um padrão de referência de ensaio imunoenzimático (EIA). Alta sensibilidade e especificidade de RDTs de Ab HCV foram observados nas populações de triagem (população em geral, populações de alto risco e pacientes hospitalares) usando padrões de referência diferentes (EIA, teste de ácido nucleico, imunoblot) (36, 37).

Recentemente foram desenvolvidos, ainda, testes rápidos de anticorpos em fluido oral, os mesmos demonstraram sensibilidade e especificidade comparáveis aos testes rápidos de soro, com a vantagem de serem relativamente não invasivos, econômicos, e mais convenientes do que aqueles que requerem coleta sanguínea, sendo muito bem indicados para triagem e rastreamento de infecção por HCV, em especial em populações com baixo acesso ao sistema de saúde (38).

1.6.3 Técnicas moleculares de amplificação de ácidos nucleicos

A detecção do RNA viral é baseada na amplificação de regiões específicas do genoma do vírus, podendo ser qualitativa ou quantitativa. As técnicas mais empregadas para esta finalidade são baseadas em reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction ou PCR), PCR em tempo real, DNA ramificado (bDNA) e

amplificação mediada por transcrição (TMA) (39). O HCV é um vírus de RNA. Portanto, uma transcrição reversa é sempre um pré-requisito à amplificação por PCR, que requer um modelo de DNA (16).

1.6.3.1 Métodos de amplificação não isotérmica

1.6.3.1.1 RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) converte moléculas de RNA em suas sequências de DNA complementar (cDNA) com o auxílio da transcriptase reversa, seguido de amplificação do cDNA recém-sintetizado em um PCR padrão, o RT-PCR é usado em biologia molecular para detectar expressão de RNA e clonagem de genes expressos (16, 40). Warkad et al demonstraram o limite de detecção (LOD) de 38,99 IU / mL com especificidade e sensibilidade significativas (16, 41).

1.6.3.1.2 PCR em tempo real

Após sua invenção em 1984 por Kary Mullis, o PCR encontrou muitas aplicações na área qualitativa e análise quantitativa de materiais genômicos. A reação em cadeia da polimerase quantitativa (Q-PCR) é vital para a determinação da carga viral em amostras clínicas. O RT-PCR automatizado é uma técnica difundida para a análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucleicos virais. RT-PCR é amplamente usado como um método padrão para comparação com os novos ensaios e para monitoramento da terapia (16, 42)

A PCR em tempo real é um método que apresenta alta sensibilidade e precisão, sendo aplicada no diagnóstico de grandes demandas. Nessa metodologia, a fluorescência emitida pela clivagem da sonda específica é detectada por um sensor anexado ao termociclador. A quantidade de fluorescência é proporcional do DNA (ou c-DNA) presente na amostra inicial. A sensibilidade desse teste é relatada como sendo de cerca de 10 UI/mL. Por ser um método quantitativo, tem importância para definir tipo e tempo de tratamento a ser iniciado e para avaliar a resposta terapêutica ao mesmo (43).

1.6.3.2 Métodos de amplificação isotérmica (IMA)

As aplicações dos métodos de amplificação isotérmica têm crescido

significativamente nos últimos anos, pois são simples e altamente aplicáveis para diagnósticos moleculares rápidos (16).

1.6.3.2.1 Amplificação baseada em sequência de ácido nucleico (NASBA)

Após ser descrita por Compton J., a amplificação baseada na sequência de ácido nucleico (NASBA) tornou-se popular no campo do diagnóstico molecular para alvos de RNA. É uma tecnologia dependente de primer usada para a amplificação contínua de ácidos nucleicos em um único tempo, a uma temperatura, sendo um método sensível, isotérmico, de amplificação baseada na transcrição que superou as desvantagens do RT-PCR já que utiliza um processo de amplificação específico de RNA isotérmico de etapa única, sendo um método rápido, simples e de detecção direta do RNA viral, porém, possui a desvantagem, em relação ao RT-PCR de não fazer a genotipagem viral, que é essencial, na prática clínica do manejo da hepatite C, portanto, esse método acaba não sendo utilizado na prática (16, 44).

1.6.3.2.2 Transcrição mediada por amplificação

A transcrição mediada por amplificação (TMA) é um método isotérmico que se baseia em um ciclo contínuo de síntese de DNA a partir de RNA e da transcrição desse DNA para RNA. Ao final da reação, múltiplas cópias de RNA são produzidas. Trata-se de um método molecular que apresenta elevada sensibilidade (limite inferior de detecção de cerca de 5 a 10 UI/mL), desta forma, pode detectar os níveis de viremia abaixo dos níveis detectados por métodos de PCR (16, 45).

1.6.3.2.3 Amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP)

LAMP amplifica DNA com alta especificidade, eficiência e rapidez sob condições isotérmicas. LAMP, quando combinado com a etapa de transcrição reversa, permite a detecção de RNA e o método é chamado de amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP). O LAMP tem uma ampla gama de aplicações, incluindo testes de ponto de atendimento, testes genéticos e teste rápido de alimentos e amostras ambientais. Kargar et al. desenvolveu um ensaio baseado em LAMP para a detecção de RNA de HCV e comparou-o com o convencional nested-PCR (16, 46). Eles relataram que a sensibilidade do ensaio baseado em LAMP, foi comparável ao ensaio de nested-PCR e ambos os ensaios mostraram um LoD de 10 cópias / mL. O

ensaio LAMP foi considerado superior para amplificação rápida, operação simples e fácil detecção (16).

1.6.3.2.4 Método de Rolling Circle Amplification (RCA)

RCA é um método de amplificação enzimática isotérmica em que um curto primer de DNA ou RNA é amplificado para formar um DNA ou RNA de fita única longa usando um DNA circular molde e polimerases de DNA ou RNA particulares. RCA foi usado para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico altamente sensíveis para vários alvos incluindo DNA, RNA, pequenas moléculas, proteínas e células, possui elevada sensibilidade, maior do que a do RT-PCR, e elevada especificidade. Além dessas aplicações, RCA tem atraído atenção substancial em nanotecnologia e nanobiotecnologia (16, 47).

1.6.4 Tecnologias de transdutor

1.6.4.1 Ensaio de reconhecimento bioelétrico (BERA)

O ensaio de reconhecimento bioelétrico (BERA) usa um sistema de biossensor que detecta a mudança no sinais elétricos de células cultivadas em matriz de reação, para vários ligantes que podem se ligar à célula. O BERA tem sido usado para a detecção de vírus por medição da mudança do sistema elétrico potencial. Os ensaios BERA mostraram alta correlação com RT-PCR e ELISA, porém, devido ao uso de células vivas, esse método não é utilizado de rotina (16, 48).

1.6.5 Nanotecnologia

Branched-DNA

No teste de amplificação de sinal (branched-DNA), ao contrário da PCR, não há reação enzimática para amplificação da molécula a ser detectada. O método utiliza sucessivos ciclos de hibridizações por sondas, sendo que o limite mínimo de detecção do HCV-RNA encontra-se na faixa de 615 UI/mL (16, 49).

1.6.6 Genotipagem

O teste de genotipagem viral caracteriza parte do material genético do vírus através de técnicas moleculares de amplificação do RNA viral. Esses testes têm sido empregados para determinação dos genótipos e identificação de mutações relacionadas a resistência a drogas. Consiste em um método de alta complexidade, o

que restringe seu emprego aos centros diagnósticos de referência. Dentre os diferentes métodos de genotipagem, o de referência para a identificação e classificação de isolados do HCV é o sequenciamento nucleotídico direto do genoma viral, seguido de sua análise filogenética (50).

O sequenciamento em tempo real molecular único, também chamado de sequenciamento de terceira geração, é uma nova técnica de sequenciamento capaz de gerar leituras de sequências contíguas extremamente longas. Embora o sequenciamento de leitura curta convencional não possa avaliar a ligação de substituições de nucleotídeos distantes umas das outras, o sequenciamento de SMRT pode demonstrar diretamente a ligação de alterações de nucleotídeos em um intervalo de mais de 20 kbp e, portanto, pode ser aplicado para examinar diretamente os haplótipos de vírus ou bactérias cujas estruturas do genoma estão mudando em tempo real. As vantagens do sequenciamento de leitura longa permitem a determinação precisa dos haplótipos de clones virais individuais. Tal sequenciamento tem sido aplicado em vários estudos de genomas virais, incluindo a determinação da sequência completa do genoma do vírus da hepatite C, sequenciamento profundo direcionado do gene NS5A do HCV e avaliação da heterogeneidade entre as populações virais (51).

1.7 Métodos laboratoriais não invasivos para avaliação da fibrose hepática

É amplamente discutido na literatura sobre a fisiopatologia da hepatite C, e seu importante papel no desenvolvimento da fibrose hepática, através da ativação da resposta imune do hospedeiro, repetidos processos de agressão e cicatrização do tecido hepático. Desde meados da década de 1960, a biópsia hepática tem sido considerada o padrão ouro para o estadiamento da fibrose hepática. O exame histopatológico do tecido hepático fornece visualização direta das alterações arquitetônicas do parênquima hepático com informações diagnósticas sobre a fibrose e outras características histológicas, incluindo necroinflamação, esteatose e depósitos hepáticos de ferro ou cobre. Porém, a biópsia hepática é acompanhada de várias desvantagens cruciais, incluindo acessibilidade variável, alto custo, possibilidade de erros de amostragem e imprecisão devido à variabilidade inter e intra-observador de interpretações patológicas (52). Posteriormente, o exame de

elastografia hepática surge para se equiparar e até substituir a maioria das indicações de biópsia hepática, devido a sua alta acurácia na avaliação e acompanhamento de fibrose hepática, sendo um método não invasivo.

Nos últimas décadas, houve grande interesse em identificar e descrever a fibrose hepática usando marcadores substitutos não invasivos. Os marcadores séricos de fibrose hepática oferecem uma alternativa atraente e econômica à biópsia hepática, e à elastografia hepática, na indisponibilidade desta. Além de serem menos invasivos, eles praticamente não apresentam complicações, poucos ou nenhum erro de amostragem e pequena variabilidade relacionada ao observador (53).

1.7.1 APRI, FIB-4, índice de Forns

Métodos laboratoriais para o estadiamento da fibrose hepática tem sido cada vez mais estudados e validados, uma vez que não envolvem os riscos inerentes à biópsia e tem maior disponibilidade e menor custo em comparação com a elastografia transitória hepática. Os índices APRI, FIB-4, por exemplo, envolvem exames simples e de baixo custo como a medida das aminotransferases (aspartato, AST e alanina, ALT) e contagem de plaquetas (54-56) (figura 1.19).

$$APRI = \frac{\frac{AST}{AST(\text{Limite superior de normalidade})}}{\text{Contagem de Plaquetas } (10^3/\text{mm}^3)} \times 100$$

Figura 1.19 Cálculo do APRI, Adaptado de: www.hepatitisc.uw.edu

O escore FIB4 é um teste não invasivo que combina valores bioquímicos padrão (plaquetas (PLT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) com a idade. Foi originalmente desenvolvido para uso na coinfeção HCV / vírus da imunodeficiência humana (HIV) (57). É um método prático, de fácil aplicabilidade e de baixo custo, apresentando sensibilidade de 74% e especificidade de 80% para excluir fibrose significativa quando abaixo de 1,45. Valores acima de 3,25 tem 98% de especificidade na confirmação de fibrose avançada, porém, valores intermediários requerem um método auxiliar para determinar o grau de fibrose (54) (figura 1.20).

$$FIB - 4 = \frac{\text{Idade (anos)} \times AST (U/l)}{\text{Contagem de Plaquetas } (10^9 / l) \times \sqrt{ALT (U/l)}}$$

Figura 1.20 Cálculo do FIB 4. Adaptado de: www.hepatitisc.uw.edu

Já o Índice de Forns, calcula em função da idade, contagem de plaquetas, transaminase ALT (TGO), idade e colesterol. Foi desenvolvido pela primeira vez em uma coorte de pessoas não tratadas com doenças crônicas hepatite C (58) (figura 1.21).

$$\text{Índice de Forns} : (7.811 - 3.131 \cdot \ln(\text{contagem de PLT}) + 0.781 \cdot \ln(\text{gama glutamil - transferase (GGT)}) + 3.467 \cdot \ln(\text{idade}) - 0.014 \cdot (\text{Colesterol}))$$

Figura 1.21 Cálculo do índice de Forns

Tanto o índice FIB4 quanto o índice de Forns são marcadores séricos indiretos de fibrose. Existem ainda, outros métodos não invasivos descritos, como o FibroTest, e método de elastografia transitória (59-62), porém os mesmo tem um maior custo e menor acessibilidade do que os métodos laboratoriais descritos.

1.8 Histórico do Citomegalovírus (HCMV)

Em 1881, cientistas alemães notaram, pela primeira vez, Inclusões típicas de infecções por citomegalovírus, através da visualização de inclusões intracelulares por histopatologistas em tecidos de pacientes infectados. Essas inclusões, foram atribuídas inicialmente a um protozoário, sendo descrito pela primeira vez, por Ribbert no mesmo ano (63) (figura1.22). Posteriormente, em 1920, foi aventada a possibilidade de se tratar de uma infecção viral, já que a mesma apresentava semelhança com aspectos encontrados nas inclusões por varicela (64). Depois que

os vírus passaram a ser cultivados em culturas de células, Weller, Smith e Rowe isolaram e cultivaram independentemente o HCMV do homem e dos camundongos em 1956-1957. O vírus foi nomeado pelo seu efeito citopático, causador de citomegalia (65-67).

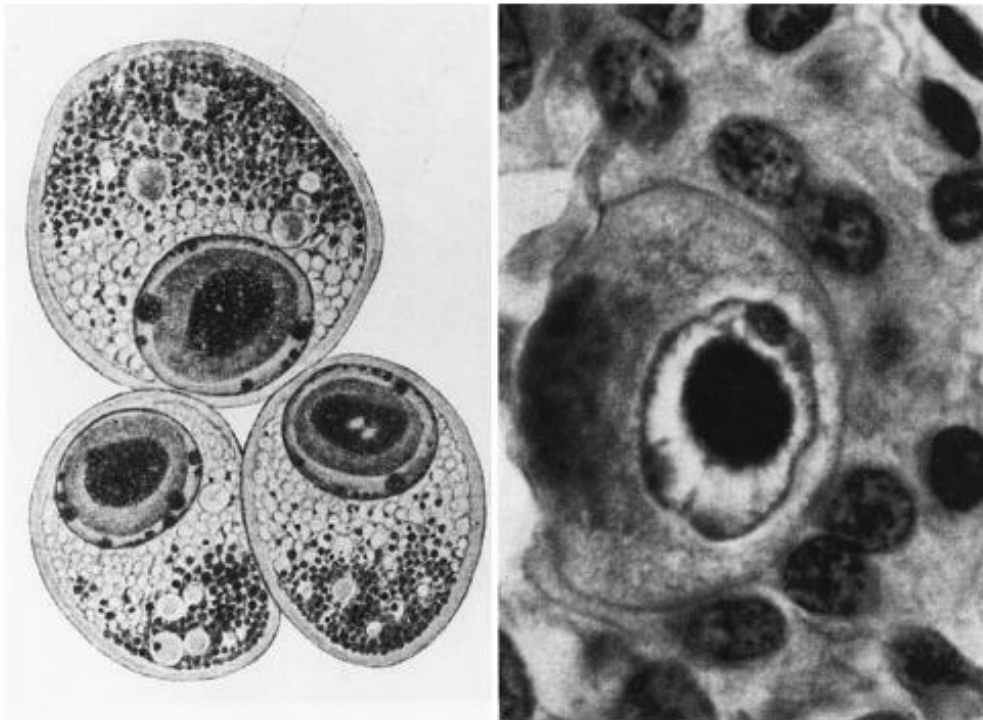


Figura 1.22- Células infectadas por HCMV com inclusões intranucleares com halo (adaptado de Med Microbiol Immunol,2008)

1.9 O Citomegalovírus

O Citomegalovírus pertence à família Herpesviridae, subfamília betaherpesvirinae e gênero *Herpesvirus*. São conhecidos oito tipos de herpes vírus humanos (HHV), que são divididos em 3 subfamílias: alfa herpesvirinae, betaherpesvirinae e gama herpesvirinae, que se diferenciam pela estrutura de seus genomas e propriedades biológicas. A subfamília alfa herpesvirinae, inclui o vírus da herpes simplex 1 e 2, e o vírus da varicella zoster; a subfamília betaherpesvirinae inclui o HCMV, HHV-6 e HHV-7, e a subfamília gama herpesvirinae, o vírus Epstein-barr e o HHV-8 (68, 69) (figura 1.23, Tabela 1.1). Os betaherpevírus são caracterizados por terem reprodução mais lenta do que outras subfamílias Herpesvírus (aproximadamente sete dias), além de causarem um efeito citopático

(CPE) de citomegalia nas células que são infectadas (6). Os vírus da subfamília betaherpesvirinae permanecem latentes em glândulas secretoras, células linfocitárias, rins e outros tecidos.

Subfamília	Gênero	Vírus
α -herpesvirinae	<i>Simplexvirus</i>	Herpes simples tipo 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2)
	<i>Varicellovirus</i>	Vírus da varicela-zoster (HHV-3)
β -herpesvirinae	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus (HHV-5)
	<i>Roseolovirus</i>	Vírus do exantema súbito HHV 6-A, 6-B e 7
γ -herpesvirinae	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus Epstein-Barr (HHV-4)
	<i>Rhadinovirus</i>	Vírus do sarcoma de Kaposi (HHV-8)

Tabela 1.1 - Divisão dos Herpesvirus em subfamílias e gêneros com seus respectivos vírus representativos (Modificado de BRENNAN, 2001).

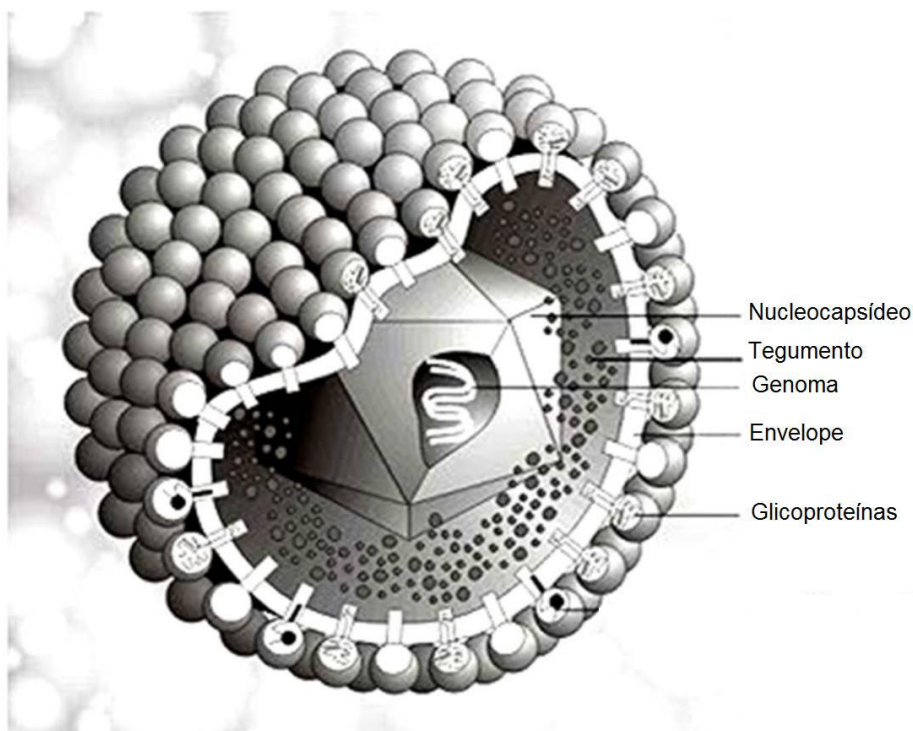


Figura 1.23 Esquema estrutural do Citomegalovírus (Adaptado de TOMTISHEN, 2012).

1.10 Epidemiologia do HCMV

1.10.1 Aspectos epidemiológicos do HCMV no mundo

Os dados soropidemiológicos de diferentes regiões do mundo demonstram que a infecção pelo HCMV é frequente em comunidades de baixo nível socioeconômico. As maiores taxas de soroprevalência para o HCMV ocorrem em populações procedentes de países em desenvolvimento, cujos índices variam entre 80-100%, e em populações de países desenvolvidos entre 40-60%. A elevada frequência de anticorpos na população economicamente menos favorecida está relacionada aos maus hábitos de higiene, falta de saneamento básico, e educação de tais populações. O conjunto desses fatores, associados à biologia viral e à deficiência imunológica, contribuem para a manutenção do perfil epidemiológico do vírus na população (70, 71) (figura 1.24). A infecção é universalmente endêmica e sua prevalência aumenta com a idade. As taxas de incidência, baseadas em estudos sorológicos, mostram duas faixas de maior transmissão da infecção: no primeiro ano de vida (36-56%) e na fase sexualmente ativa. Estudos mostram que a prevalência de anticorpos IgG anti-HCMV em países desenvolvidos aumenta em 1% ao ano desde a puberdade até a meia-idade (64). A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados desenvolve um curso assintomático de doença (64).

A infecção apresenta elevada morbidade em indivíduos imunossuprimidos, e gestantes, devido à infecção congênita, que é causa importante de malformações fetais. O HCMV é a causa mais comum de infecção congênita mundial, uma revisão epidemiológica sistemática de dados obtidos de vários estudos realizados, entre o período de 1978 a 2011, demonstrou que as taxas de infecção congênita por HCMV em populações de países em desenvolvimento variam entre 0,6% e 6,1% (72). Estudos têm documentado que até 90% das crianças infectadas no período intraútero são assintomáticas, desenvolvendo os sintomas dentro de alguns meses ou mesmo anos.



Figura 1.24 Distribuição global da frequência de anticorpos IgG anti-HCMV (adaptado de Pannuti C, 2009)

Devido a correlação direta encontrada entre a taxa de infecção congênita por HCMV e a taxa de soropositividade de HCMV, estimou-se que dos cerca de 30.000 casos de HCMV que ocorrem anualmente nos EUA, três quartos são devido a infecções maternas não primárias (73, 74) enquanto a proporção de infecções por HCMV devido a infecções não primárias em países em desenvolvimento pode ser ainda maior (74, 75).

1.10.2 Aspectos epidemiológicos do HCMV no Brasil

Em 2009, Serra et al compilaram dados de soroprevalência de anticorpos IgG e IgM anti-HCMV de 4.620 amostras de gestantes e puérperas de todos os estados brasileiros, Os índices de soroprevalência variaram entre 50% e 100% nos diferentes estados (figura 1.25) (70, 76). Tais números são compatíveis com os dados da literatura mundial, sobre a soroprevalência em países em desenvolvimento.

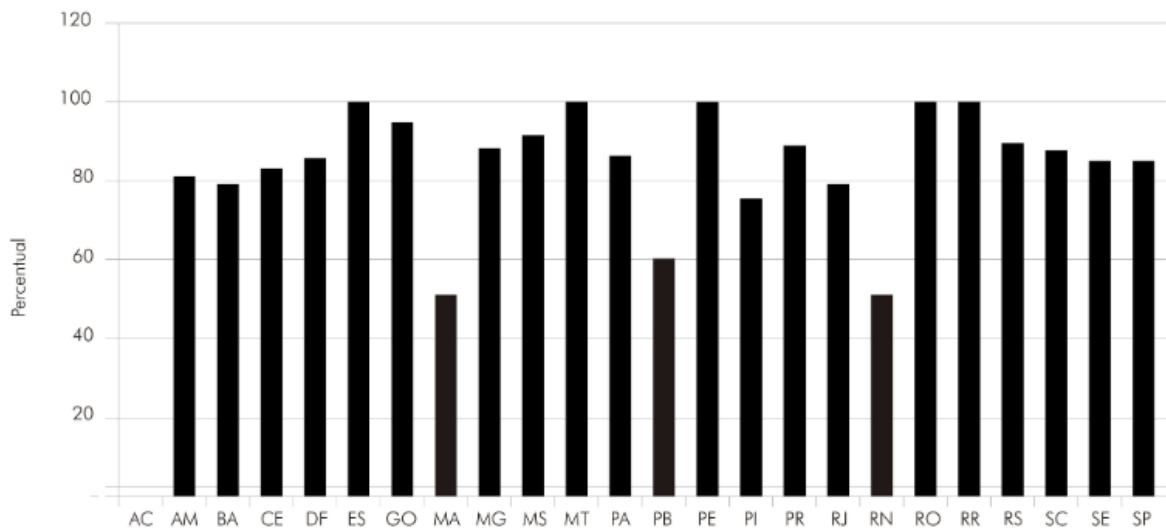


Figura 1.25 Soroprevalência do HCMV nos estados brasileiros (adaptado de Serra et al, 2009).

Estudos recentes que determinem a prevalência global de infecção por HCMV são escassos. Porém, diversos estudos analisam a soroprevalência em mulheres gestantes (77), devido ao impacto na saúde fetal da transmissão vertical do HCMV, e entre pacientes transplantados renais (78), o que pode trazer uma correlação para a prevalência na população como um todo. Os mesmos estudos demonstram elevada prevalência, em especial, nos países em desenvolvimento, como o Brasil (77).

1.11 Transmissão do HCMV

A transmissão do vírus ocorre por diversas vias, dentre elas: saliva, urina, contato sexual, via transplacentária, amamentação, via sanguínea, e por transplantes de órgãos e de células hematopoiéticas (79). Os períodos de maior predisposição ao contágio com o vírus são o período da infância quando a transmissão ocorre basicamente por contato de urina e saliva de outras crianças ou na idade adulta, onde a transmissão pode acontecer através do contato sexual (64).

A infecção pode ser classificada em congênita, perinatal, infecção adquirida e a de transmissão iatrogênica, que seria através, principalmente, de transfusão sanguínea e transplante de órgãos. Dentre todas as vias de infecção, uma das mais temidas, a transmissão congênita, que ocorre em até 1% das gestações globais, via placentária, podendo ocorrer em todo o período gestacional. Entretanto, o maior risco

de transmissão ocorre até a 20ª semana de gestação (80). A maioria dos recém nascidos infectados é assintomática. Porém, com o passar do tempo podem surgir alterações, como perda auditiva, déficits cognitivos e outras sequelas neurológicas graves, sendo o HCMV a principal causa infecciosa de alterações do sistema nervoso central em recém nascidos.

Além da infecção congênita, a transmissão do HCMV por transplante de órgãos tem grande importância. Já foi descrita em diversos tipos de enxertos, como fígado, coração, pulmão, rim e células hematopoiéticas. Constitui importante causa de morbidade, no período pós transplante. Sua prevalência varia de acordo com o tipo de transplante realizado, sendo em torno de 50-75% em transplantes de coração-pulmão, 22-29% em transplantes de fígado, 30% de células hematopoiéticas e 8-32% em transplantes de rim. No período anterior à implementação da rotina profilática, a maioria das infecções causadas pelo HCMV tinham início até os 3 primeiros meses após o transplante. Entretanto, atualmente uma das maiores preocupações é reativação tardia, que pode ocorrer após o término da profilaxia, em pacientes submetidos a transplante de órgão de doador soropositivo, onde o receptor é negativo (D+/R-) (81-83).

1.12 Patogenia e reativação da infecção pelo HCMV

A infecção primária por HCMV em indivíduos imunocompetentes geralmente é assintomática. Porém, em alguns casos evolui para um quadro semelhante à mononucleose infecciosa, com sintomas como febre, dor, linfadenopatia e hepatomegalia (84).

Após a infecção primária, o HCMV permanece de forma latente no organismo, ou como uma infecção crônica de baixo grau, sem causar sintomas, na maioria das vezes. Foram descritos achados de material genético de HCMV em monócitos e macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais. A infecção pode ser reativada em casos de imunodepressão, levando à disseminação do vírus e ao desenvolvimento da doença (85). A infecção pelo HCMV pode resultar tanto em efeitos diretos como o desenvolvimento da doença, quanto indiretos devido à resposta imune estimulatória e ao estímulo antigênico desencadeado pelo vírus, gerando um aumento no risco de

rejeição e disfunção do órgão transplantado (86). Aliado a isso, o tratamento imunossupressor diminui a capacidade do sistema imune em controlar a replicação viral. A imunidade específica ao HCMV tem um papel importante no desenvolvimento e na severidade da infecção, sendo o controle da replicação viral mediado por respostas CD4+ e CD8+, pelas células *natural killer* e anticorpos que reconhecem as glicoproteínas do envelope viral. Dessa forma, sabe-se que indivíduos que possuem resposta imune de células T comprometida, apresentam maior risco de desenvolver doença grave pelo HCMV (63, 85).

1.13 Hepatite por HCMV

Entre os vírus classicamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites com via de transmissão entérica como o vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) que podem estar associados com casos de hepatite fulminante com falência hepática (87). Contudo, formas agudas e fulminantes de hepatite também podem estar associadas aos vírus da família *Herpesviridae* (88). Os vírus da família *Herpesviridae* que estão relacionados a casos de hepatites são o Citomegalovírus Humano (HCMV) ou Herpesvírus Humano 5; Vírus do Epstein-Barr (EBV) ou Herpesvírus Humano 4; Herpes vírus simples (HSV) ou Herpesvírus Humano 1 e 2; vírus varicela-zoster (VZV) ou Herpesvírus Humano 3 e Herpesvírus Humano 6 (HHV-6). Todos são vírus de DNA que induzem doença por destruição direta dos tecidos, causando uma resposta imunológica e patológica, e/ou facilitando a transformação neoplásica (89). A hepatite é causada principalmente pelo efeito citopático direto do Herpesvírus. Os Herpesvírus têm tropismo celular específico. Os hepatócitos não são células-alvos, a hepatite não é, por conseguinte, uma manifestação característica de infecção por essa família. Todos os Herpesvírus, após a infecção primária, geram no hospedeiro uma infecção latente por toda vida. Por se manter no organismo do hospedeiro, os Herpesvírus podem desencadear doenças, incluindo hepatite. O tipo de infecção e o estado imunológico do paciente determinam a incidência e gravidade das manifestações clínicas da doença. A morbimortalidade da hepatite é mais elevada na infecção primária e em pacientes imunodeprimidos (89).

A hepatite causada por HCMV é uma manifestação comum de mononucleose, a causa mais comum da infecção por HCMV primária na população imunocompetente. Essa infecção autolimitante que afeta adultos jovens (faixa de 18-66), se manifesta por

febre prolongada e hepatite leve. A Hepatite por HCMV também afeta crianças com um curso autolimitado (90). Em pacientes imunocomprometidos a infecção por HCMV causa aumento da morbidade, especialmente em receptores de transplantes de órgãos. Nestes pacientes, a hepatite por HCMV ocorre de três formas principais: hepatite leve, aguda e hepatite em transplante hepático (89).

1.14 Diagnóstico HCMV

1.14.1. Sorologia

Os testes sorológicos são úteis para determinar se um paciente teve a infecção por HCMV, no passado, determinada pela presença ou ausência de IgG anti-HCMV. Muitos ensaios diferentes foram descritos e avaliados para a detecção de anticorpos IgG. Entre estes estão o de fixação do complemento, ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência, anticomplemento, radioimunoensaio, e hemaglutinação indireta (91). A detecção de anticorpos IgM tem sido utilizado como um indicador de infecção aguda ou recente. Os ensaios de captura de IgM são largamente utilizados e baseiam-se na ligação seletiva de anticorpos IgM para a fase sólida. Os ensaios de IgM anti-HCMV utilizando proteínas e peptídeos recombinantes têm sido desenvolvidos na tentativa de padronizar testes sorológicos (92). Os ensaios para o anticorpo IgM carecem de especificidade para a infecção primária por causa de resultados falsos positivos, uma vez que o IgM pode persistir por meses após a infecção primária, e porque pode ser positivo em infecções por HCMV reativadas (92).

1.14.2 Cultura celular

O método tradicional para a detecção de HCMV é por meio de cultura celular convencional. Esta abordagem utiliza amostras clínicas que são inoculados em células de fibroblastos humanos incubados e observados por um período de tempo variando de 2 a 21 dias. No ensaio de cultura celular, o HCMV exibe um CPE, caracterizado por focos de células planas, inchadas onde o CPE está diretamente relacionado com titulação do vírus. No entanto, este método é lento e requer 2-3 semanas até que um resultado pode ser classificado como negativo (93)

1.14.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método rápido e sensível amplamente disponível de detecção para HCMV baseada na amplificação de ácidos nucleicos. As técnicas geralmente têm como alvo principal suas regiões bem conservadas. O DNA pode ser extraído a partir de sangue total, leucócitos, no plasma, ou qualquer outro tecido (amostras de biópsia de tecido) ou líquido (urina, líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar) (94). A PCR para detecção do HCMV-DNA pode ser qualitativa ou quantitativa, quando a quantidade de vírus DNA na respectiva amostra é medida. A PCR quantitativa (PCR em tempo real ou qPCR) permite o monitoramento contínuo de indivíduos imunocomprometidos para identificar pacientes de risco para a terapia preventiva e para determinar a resposta ao tratamento. Este método, em comparação com o ensaio de antigenemia, é mais rápido, pois pode ser automatizado e é o mais utilizado atualmente. Os resultados são geralmente relatados como número de cópias/mL (93).

1.15. Vitamina D

A vitamina D é um importante hormônio secosteróide com efeitos pleiotrópicos e é conhecido para desempenhar um papel fundamental na homeostase óssea e do cálcio. A maioria da vitamina D é convertida de 7-desidrocolesterol na pele através da luz solar e, em seguida, metabolizado no fígado a 25-hidroxivitamina D, que é mediada por enzimas 25-hidroxilases. Finalmente, o agonista biologicamente ativo para o receptor de vitamina D, 1,25-dihidroxivitamina D₃ ou calcitriol, é produzido a partir de circulação renal ou extra-renal 25 (OH) D por 1 α -hidroxilase. O calcitriol também é altamente ligado à proteína de ligação à vitamina . Recentemente, surgiram evidências de que a vitamina D teria propriedades antifibróticas, antiinflamatórias e imunomoduladoras (95,96). Esses efeitos extraesqueléticos são relevantes na patogênese e tratamento de doenças hepáticas. Estudos recentes descobriram que a deficiência de vitamina D também está relacionado à progressão da doença hepática pelo HCV (95,96) e à resposta à terapia medicamentosa, desempenhando um papel como um preditor da resposta virológica sustentada ao tratamento (95,97). No entanto, a compreensão dos mecanismos patogênicos subjacentes à alta prevalência de deficiência de vitamina D nos pacientes com hepatite C, e a explicação de seus efeitos na hepatite C crônica ainda são inconclusivos.

2. JUSTIFICATIVA

A hepatite C apresenta grande impacto na saúde pública, devido a sua elevada taxa de morbimortalidade e elevados custos ao sistema de saúde. Diversos estudos descrevem a infecção isolada pelo HCV, e analisam suas consequências imediatas e a longo prazo para o tecido hepático. Dados da literatura comparam as diversas terapias medicamentosas e seus resultados na carga viral e supressão da atividade de doença hepática. A infecção pelo HCMV é bastante prevalente na população em geral, mas em pacientes hígidos não costuma cursar com significativa morbimortalidade, porém, tem sido bastante estudada a atividade de doença hepática pelo HCMV em pacientes transplantados hepáticos, mostrando reativação do vírus que estava latente.

Dados sobre a presença dos citomegalovírus em pacientes com hepatite C são escassos, contudo estudos comprovam o acometimento hepático em pacientes transplantados previamente infectados pelo citomegalovírus. É importante também avaliar os pacientes não transplantados, portadores de hepatite c, comparando-os com os portadores de coinfeção, fazendo um paralelo com o comportamento da coinfeção nos indivíduos pós transplante, verificando se a coinfeção tem a mesma importância nesse grupo de indivíduos.

Diante deste contexto, o estudo da coinfeção entre o vírus da hepatite C e citomegalovírus é importante para avaliar o grau de acometimento hepático, fibrose hepática e elevação de enzimas hepáticas. Além disso, é importante avaliar outros fatores que poderiam ter influência neste cenário, como a dosagem de vitamina D sérica, já que estudos investigam sua influência na relação com a imunidade, com a resposta ao tratamento para a hepatite c e evolução para fibrose hepática.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença do citomegalovírus em pacientes com hepatite C crônica.

3.2 Objetivos Específicos

- i. Detectar a infecção por citomegalovírus em pacientes portadores do vírus da hepatite C (HCV);
- ii. Comparar os dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes co-infectados HCV/HCMV com pacientes monoinfectados pelo HCV;
- iii. Comparar os níveis de enzimas hepáticas entre os pacientes co-infectados HCV/HCMV e os pacientes monoinfectados pelo HCV;
- iv. Comparar os índices de fibrose hepática entre os pacientes co-infectados HCV/HCMV e os pacientes monoinfectados pelo HCV;
- v. Comparar a carga viral para o HCV nos pacientes co-infectados HCV/HCMV com pacientes monoinfectados pelo HCV;
- vi. Avaliar a influência da vitamina D na presença da coinfeção HCV/HCMV e na fibrose hepática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo:

Trata-se de um estudo observacional que incluiu 113 pacientes com HCV e residentes no Rio de Janeiro recrutados no Ambulatório de Hepatites Virais (Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ), Unidade de Hepatologia (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ), Departamento de Medicina Geral (Gaffrée Guinle). Hospital Universitário, UNIRIO), e Unidade de Hepatologia (Hospital Universitário Antonio Pedro, UFF). O recrutamento foi não probabilístico e realizado de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

Critérios de inclusão:

Os pacientes incluídos neste estudo tinham a hepatite C confirmada através do diagnóstico sorológico e molecular (resultados reagentes para anti-HCV e HCV-RNA). Tinham resultados de genotipagem do HCV conhecidos e dosagem de vitamina D. Além de, alanina aminotransferase (ALT) persistentemente anormal por pelo menos menos 6 meses e idade superior a 18 anos.

Critérios de exclusão:

No estudo foram excluídos os pacientes positivos para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) ou anticorpo anti-vírus da imunodeficiência (anti-HIV) ou que apresentassem outras causas de lesão hepatocelular não viral (histórico de alcoolismo, hepatite auto-imune, cirrose avançada ou tratamento com medicamentos hepatotóxicos) e uso concomitante de drogas que afetam a concentração sérica de vitamina D e o uso de drogas intravenosas. Esses fatores foram excluídos devido à potencial fonte de viés.

4.2 Exames laboratoriais:

Detecção anti-HCV:

Todas as amostras de soro foram testadas para o anti-HCV usando kit comercial EIA HCV Ab (Radim, Pomezia, Itália), onde todas as amostras reativas ao anti-HCV foram retestadas em duplicata.

Detecção do HCV RNA

A carga viral de HCV-RNA foi determinada utilizando o Teste de HCV CobasTaqMan (Roche Molecular Systems, Inc, Basileia, Suíça) ou o Abbott Real Time HCV m2000sp (Abbott Laboratories, IL) e expressos como IU /mL. Genotipagem do HCV foi realizada utilizando INNO-LIPA kit HCV II (Innogenetics, Zwijnaarden, Bélgica) ou Abbott real Time m2000sp HCV (Abbott Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante.

Detecção HCMV

Para a detecção dos Citomegalovirus foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Foram utilizadas sondas (CCGTATTGGTGCGCGATCTGTTCAA- NFQ-MGB) e oligonucleotídeos sense 5'GGCCGTTACTGTCTGCAGGA 3' e anti-sense 5'GGCCTGGTAGTGAAAATTAATGGT 3' para região conservada UL54 de acordo com o protocolo de Raposo (98).

Dosagem AST e ALT

Uma amostra de sangue em jejum de 12 horas foi colhida para determinar os níveis séricos de ALT, AST. Foram usados o equipamento LABMAX PLENO, e os reagentes AST/GOT Liquiform Labtest e ALT/GPT Liquiform Labtest.

Avaliação da fibrose hepática

A fibrose hepática foi avaliada por métodos não invasivos, utilizando o cálculo do Fib-4 e o índice de Forns, conforme método descrito por Melo-Vilar, em 2013, de modo que quando o Fib-4 foi menor que 1,45, o indivíduo foi considerado como fibrose mínima, e se o Fib-4 foi $\geq 1,45$, o índice de Forns foi utilizado. O índice de Forns abaixo de 4,2 foi considerado como fibrose mínima, e índice acima ou igual a 4,2 foi considerado fibrose avançada (99).

Dosagem vitamina D

O nível sérico basal de vitamina D foi avaliado medindo os níveis séricos de 25 (OH) D usando ensaio imunoquimioluminométrico automatizado (ICMA) (Liason 25 (OH) Vitamina D, Diasorina, Varceli, Itália) sendo 30 ng / mL considerado o valor limiar.

Coleta de dados clínicos e sociodemográficos

Além dos exames laboratoriais, dados clínicos e sociodemográficos foram coletados simultaneamente de todos os pacientes.

4.3 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ (CAAE 41269015.3.0000.5248) número de aprovação 41269015.3.0000.5248. Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo do estudo foi realizado de acordo com as diretrizes éticas da portaria 466/12.

4.4 Análise estatística

A estatística descritiva das variáveis qualitativas foi determinada pela distribuição de frequências e variáveis quantitativas por medianas e intervalos interquartis (IQR). Posteriormente, o teste do qui-quadrado foi utilizado para variáveis categóricas e o teste U de Mann-Whitney (mediana) para variáveis contínuas, ambos com intervalo de confiança de 95% (ICs) e valor de $p \leq 0,05$.

Devido ao tamanho reduzido da amostra, não foi possível realizar a regressão logística múltipla para identificar se nível de vitamina D influenciava na coinfeção controlando por outros fatores. Então optou-se por realizar o método de pareamento, baseado nos escores de propensão, que emerge como uma opção para lidar com diferenças entre os grupos em razão de um desenho não experimental. Como não é possível medir o efeito da vitamina D para o mesmo paciente e comparar situações em que ela possui ou não um dado desfecho, propõe-se uma comparação entre pacientes similares para várias características que podem influenciar no desfecho (AUSTIN, 2011), exceto para o nível de vitamina D, buscando-se a associação entre nível de vitamina D e coinfeção. Assim, o escore de propensão pelo método da ponderação, mostrará a probabilidade predita de um caso receber um determinado tratamento vs. um controle, condicionada às covariáveis observadas: idade, tratamento, ALT e AST.

Primeiro calculou-se o peso que cada tratado e cada controle passou a ter na amostra após o pareamento por ponderação, em seguida calculou-se as diferenças padronizadas absolutas nas médias das variáveis preditoras do tratamento, entre os grupos tratado e controle, e das razões de variância. Diferença padronizada absoluta nas médias (standardized differences weighted) $< 0,10$ desvio padrão e razão de variâncias (variance ratio weighted entre 0,80 e 1,20 indicam balanceamento.

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas e epidemiológicas da população do estudo

A tabela 5.1 mostra as características da população estudada e os dados clínicos e laboratoriais em relação a infecção pelo vírus da hepatite C. Entre os pacientes analisados, a maioria era do sexo feminino (59,3%), 52,8% não eram tratados para HCV, e 38,9% dos pacientes apresentavam grau de fibrose alto (> F3), e 45,1 % apresentavam níveis de vitamina D inferiores a 20. A mediana das idades foi 57 anos. Em relação à dosagem de vitamina D, esta foi 22,50, enquanto que as dosagens de enzimas hepáticas foi AST 75, ALT 39.

Tabela 5.1 Análise descritiva dos indivíduos portadores de hepatite C

Variáveis categóricas	N=113	%
Sexo		
Feminino	67	59,3
Masculino	46	40,7
Coleta		
Jejum	74	65,5
Sem jejum	39	34,5
Tratamento*		
Sem tratamento	57	52,8
Tratado	51	47,2
Índice de fibrose*		
Mínima	28	24,8
Avançada	44	38,9
Missing	41	36,3
Vitamina D		
< 30	90	79,6
≥ 30	23	20,4
Variáveis contínuas	mediana	P25-P75
Idade	57,00	50,00-63,00
Vitamina D pré-Liason	22,50	14,65-28,60
HCV RNA UI/ml log	5,68	4,54-6,30
Genótipo HCV codificado	1,00	1,00-1,00
AST (U/L)	75,00	58,00-95,00
ALT (U/L)	39,00	27,00-63,00



Gráfico 5.1 Proporção entre os sexos de todos os pacientes portadores de hepatite C.

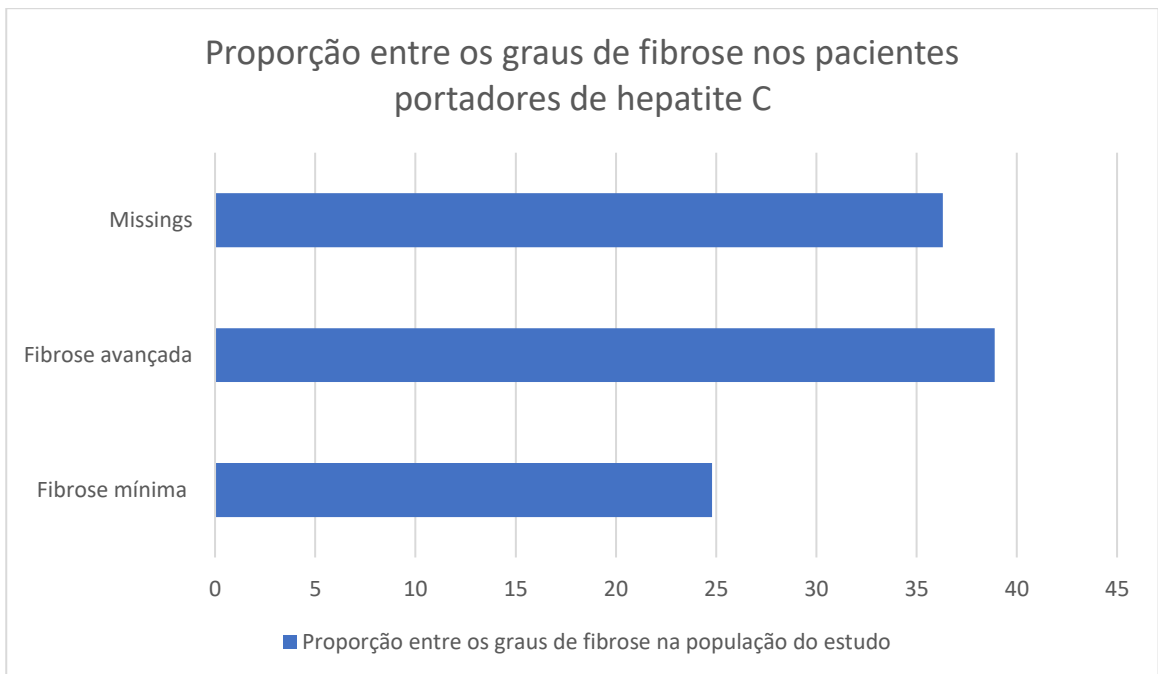


Gráfico 5.2 Proporção entre os graus de fibrose nos pacientes portadores de hepatite C.

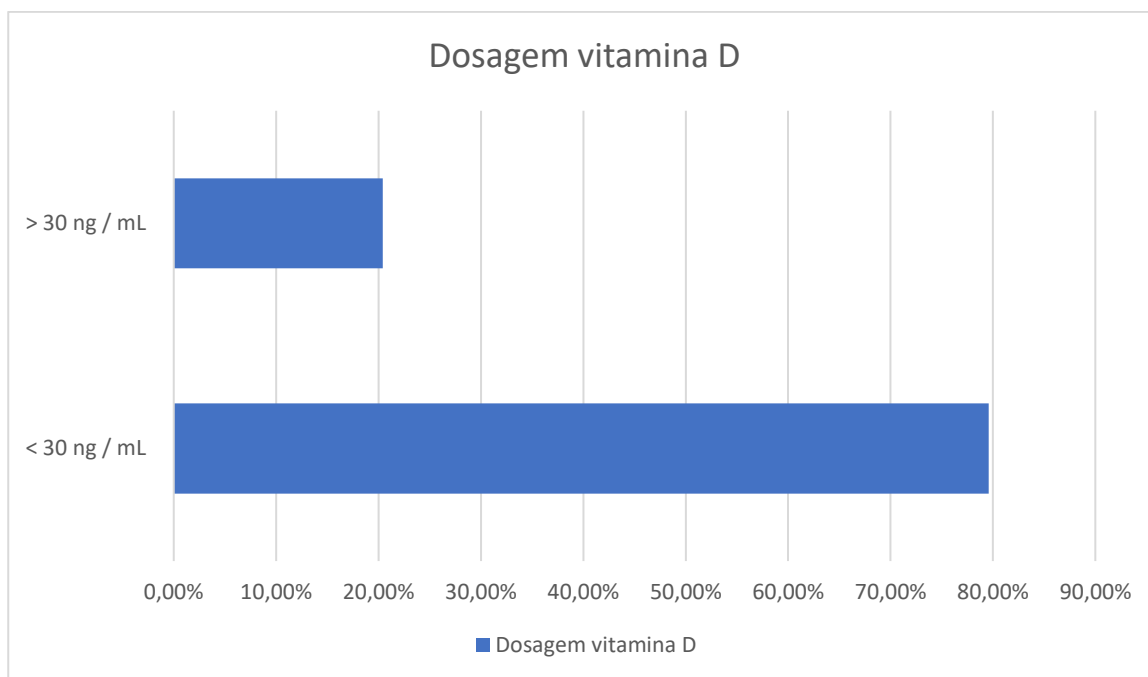


Gráfico 5.3 Proporção entre os pacientes portadores de hepatite C com dosagem de vitamina D abaixo e acima de 30 ng / mL.

5.2 Análise dos fatores associados à coinfeção hepatite C e citomegalovírus

A tabela 5.2 mostra os fatores associados a coinfeção HCV e HCMV. Entre os pacientes analisados 18,58 % estavam coinfectados com HCV e HCMV (gráfico 5.4). A maioria dos pacientes coinfectados (52,4%) era do sexo feminino (gráfico 5.5).

Entre as variáveis categóricas analisadas nenhuma foi estatisticamente significativa. Na análise das variáveis contínuas observou-se que a mediana dos valores de vitamina D e carga viral do HCV foram maiores nos pacientes coinfectados.

Tabela 5.2. Fatores associados à coinfeção hepatite C e citomegalovírus

Variáveis	Coinfeção negativa (N=92)		Coinfeção positiva (N=21)		Qui- quadrado
	n	%	n	%	p-valor χ^2
Variáveis categóricas					
Sexo					0,475
Feminino	56	60,9	11	52,4	
Masculino	36	39,1	10	47,6	
Tratamento*					0,205
Sem tratamento	49	55,7	08	40,0	
Tratado	39	44,3	12	60,0	
Índice de fibrose*					0,151
Mínima	26	28,3	02	9,5	
Elevada	34	37,0	10	47,6	
Missing	32	34,8	09	42,9	
Vitamina D					0,036
< 30	77	83,7	13	61,9	
≥ 30	15	16,3	08	38,1	
	Coinfeção	Negativa	Coinfeção	Positiva	
Variáveis contínuas	mediana	P25-P75	mediana	P25-P75	p-valor Mann whitney
Idade	57,00	50,00- 63,00	54,00	50,25-62,75	0,730
Vitamina D pré-Liason	21,15	14,02-26,57	28,60	16,85-37,70	0,030
HCV RNA (UI/mL log)	5,62	4,28-6,19	6,51	5,55-6,75	0,019
Genótipo HCV codificado	1,00	1,00-1,00	1,00	1,00-1,00	0,536
AST (U/L)	69,50	58,00- 90,00	84,00	60,00- 108,50	0,134
ALT (U/L)	39,00	25,00- 63,00	37,00	32,50-72,50	0,554

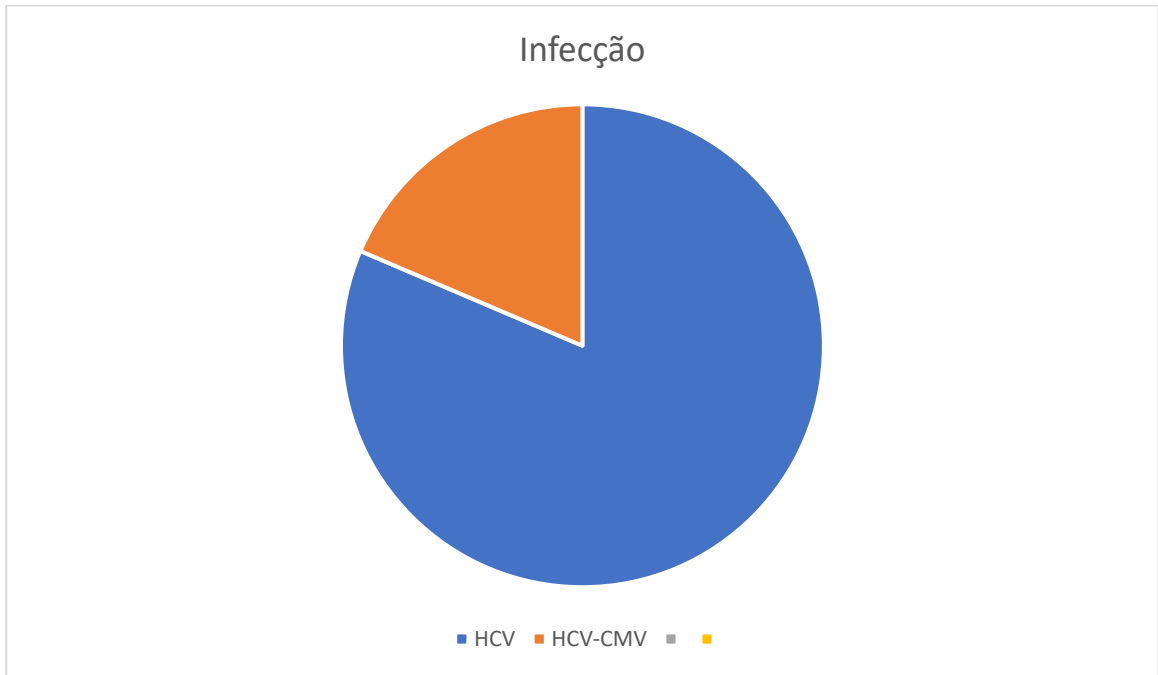


GRÁFICO 5.4- Proporção entre monoinfecção e coinfeção nos pacientes portadores de hepatite C.

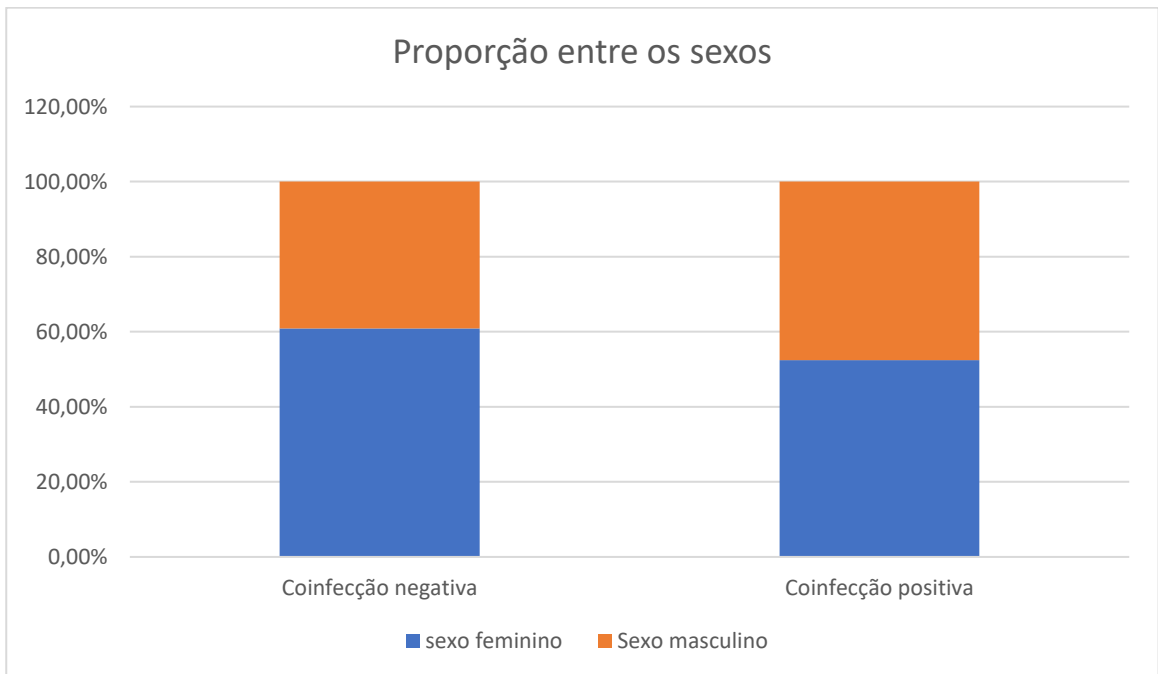


Gráfico 5.5- Proporção entre os sexos feminino e masculino nos grupos de coinfeção positiva e negativa HCV-HCMV.

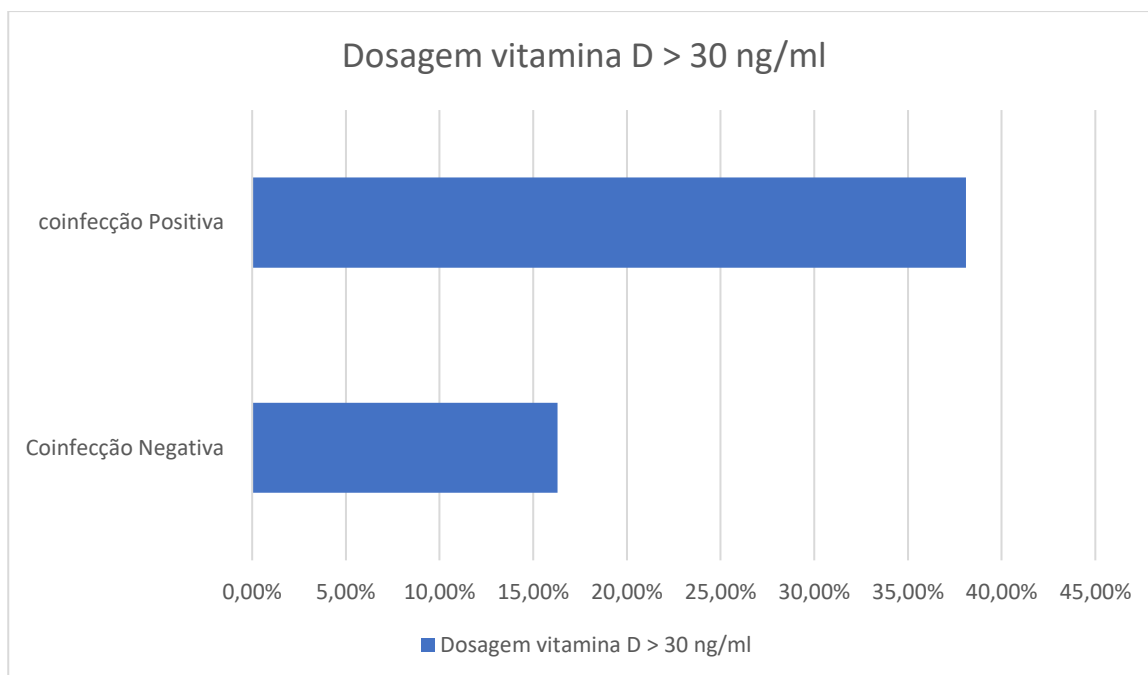


Gráfico 5.6- Proporção entre os pacientes com dosagem de vitamina D acima de 30ng/ml nos grupos de coinfeção positiva e negativa HCV-HCMV.

As estimativas das diferenças padronizadas absolutas entre as médias dos grupos tratamento e controle, após o balanceamento, para a todas as variáveis atingiram a meta de <0,10 desvio padrão, entretanto a razão de variância só foi satisfeita pela variável tratamento. Portanto, como não foi possível balancear os grupos para as covariáveis que podem influenciar no desfecho (idade, tratamento, ALT e AST), não foi possível compará-los e ver se a vitamina D interfere na coinfeção (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Covariate balance summary

	Standardized differences		Variance ratio	
	Raw	Weighted	Raw	Weighted
Idade	.327678	.0710474	.3482486	.7636412
Tratamento	.391764	.0042124	1.013232	1.000825
AST	.1099295	.0139261	2.873903	2.668058
ALT	.1324795	.0664167	1.256984	1.271886

6.DISSCUSSÃO

A hepatite crônica pelo HCV é uma doença de caráter silencioso, que se caracteriza por um processo inflamatório persistente no fígado. Aproximadamente 60% a 85% dos casos se tornam crônicos e, em média, 20% evoluem para cirrose ao longo do tempo. Uma vez estabelecido o diagnóstico de cirrose hepática, o risco anual para o surgimento de carcinoma hepatocelular (CHC) é de 1% a 5% (100). O risco anual de descompensação hepática é de 3% a 6%. Após um primeiro episódio de descompensação hepática, o risco de óbito, nos 12 meses seguintes, é de 15% a 20% (100). A forma crônica da doença é marcada pela evolução silenciosa, com sinais e sintomas comuns as demais doenças crônicas hepáticas, que se manifestam em fases avançadas, sendo, em sua maioria, diagnosticada décadas após a infecção (19). As altas porcentagens de cronicidade da doença, seu potencial evolutivo para cirrose e hepatocarcinoma, assim como o fato de ser a mais frequente etiologia diagnosticada em casos de transplante hepático, fazem com que a doença constitua grave problema de saúde pública mundial. Em virtude de sua importância, a OMS desenvolveu uma estratégia global de hepatite que visa reduzir as novas infecções por hepatite em 90% e as mortes em 65% até o ano de 2030 (29).

Além dos vírus das hepatites A, B, C, D e E, outros vírus foram descritos como causadores de hepatites. Algumas formas agudas e fulminantes de hepatite foram associadas aos vírus da família *Herpesviridae* (88). Os vírus da família *Herpesviridae* que estão relacionados a casos de hepatites são o Citomegalovírus Humano (HCMV) ou Herpesvírus Humano 5; Vírus do Epstein-Barr (EBV) ou Herpesvírus Humano 4; Herpes vírus simples (HSV) ou Herpesvírus Humano 1 e 2; vírus varicela-zoster (VZV) ou Herpesvírus Humano 3 e Herpesvírus Humano 6 (HHV-6). Os mesmos são vírus de DNA que induzem doença por destruição direta dos tecidos, causando uma resposta imunológica e patológica, ou mesmo facilitando a transformação neoplásica destes tecidos (89). A hepatite é causada principalmente pelo efeito citopático direto do Herpesvírus. Os Herpevírus têm tropismo celular específico, os hepatócitos não são células-alvos, a hepatite não é, portanto, uma manifestação característica de infecção por essa família. Todos os Herpesvírus induzem no hospedeiro, após a infecção primária, uma infecção latente por toda vida, podendo a infecção sofrer reativação ao longo da vida (78). Como se perpetuam no organismo do hospedeiro,

os Herpesvírus podem desencadear doenças, incluindo hepatite. O tipo de infecção e o estado imunológico do paciente são determinantes para a incidência e gravidade das manifestações clínicas da doença. A morbimortalidade da hepatite por Herpesvírus é mais elevada na infecção primária e em pacientes imunodeprimidos (89).

Analisando-se especificamente o Citomegalovírus, a manifestação clínica mais comum da infecção por HCMV primária na população imunocompetente é a mononucleose, que tem a hepatite como uma manifestação comum desta síndrome. Tal infecção tem caráter autolimitado e afeta em sua maioria adultos jovens, se manifesta por febre prolongada, linfonodomegalia e hepatite leve (101). A Hepatite por HCMV também pode ocorrer em crianças com um curso autolimitado, nos indivíduos imunocompetentes (90).

Já em pacientes imunocomprometidos a infecção por HCMV revela maior morbidade, especialmente em receptores de transplantes de órgãos. Nestes pacientes, a hepatite por HCMV pode ocorrer de três formas principais: hepatite leve, aguda e hepatite pós transplante hepático (89).

Sabe-se que, por exemplo, a coinfeção entre o HCV e o HIV, pode levar a uma aceleração da progressão da doença hepática, e aumento da mortalidade, sendo descrito que após 10 a 15 anos de infecção pelo HCV, nos coinfectados pelo HIV, a evolução para cirrose pode ocorrer em 15-25% dos indivíduos, enquanto que nos monoinfectados isso ocorre em apenas 2-6% dos casos. Observa-se ainda que a mortalidade devido à doença hepática avançada tende a ocorrer 10 anos mais cedo em coinfectados (102). Isso corrobora para a hipótese de que a coinfeção entre hepatite C e outros vírus que possam cursar com hepatite isoladamente, como é o caso dos Herpesvírus, em especial o HCMV, possa também colaborar para um agravamento da doença hepática.

Foram encontrados na literatura poucos estudos acerca dos efeitos hepáticos na coinfeção HCV-HCMV, porém, há evidências de que existe interação entre a infecção por HCV e HCMV (5). Como a hepatite C é a mais importante causa de hepatite crônica, cirrose, insuficiência hepática, e são descritos na literatura casos de hepatite por citomegalovírus (3), tornou-se uma questão importante analisar os dados clínicos e sociodemográficos dos pacientes co-infectados HCV/HCMV com pacientes monoinfectados pelo HCV.

O presente estudo analisou dados e amostras sanguíneas de pacientes com

diagnóstico confirmado de hepatite C, aferindo a carga viral, testando as mesmas para HCMV, realização das dosagens de AST, ALT, Vitamina D e do cálculo da fibrose hepática pelos índices de FIB 4 e Forns, relacionando com análises de dados sociodemográficos dos pacientes. Os pacientes foram divididos em dois grupos e comparados, entre coinfeção HCV-HCMV positiva e negativa.

No presente estudo, a mediana das idades encontradas foi de 57 anos, a maioria dos pacientes era do sexo feminino. De acordo com dados do ministério da saúde, OMS, CDC e artigos de revisão atuais sobre dados de prevalência de hepatite C, a maioria dos casos de hepatite C notificados foram na faixa etária entre 55 e 59 anos, o que foi condizente com a mediana de idade da nossa amostra, porém, a maioria dos casos ocorre no sexo masculino, o que foi contrário ao encontrado neste estudo (19, 29-32).

Para os resultados das análises de dosagens de enzimas hepáticas e cálculo dos índices de fibrose hepática, nosso estudo não obteve resultados com significância estatística. De acordo com a literatura, vários estudos apresentaram a coinfeção como um fator importante no contexto do estudo das causas da progressão do dano hepático e consequente fibrose hepática em pacientes portadores de hepatite C (103, 104). Estudos evidenciaram o aumento da ocorrência de coinfeção por HCMV em pacientes com HCV que respondem mal à terapêutica baseada em IFN21 e em pacientes virgens de tratamento com CHC (105). Outra evidência demonstra que a coinfeção por HCMV impacta profundamente a gravidade das doenças hepáticas iniciadas pelo HCV (inflamação do fígado, esteatose e fibrose). Além de comprovar um aumento notável da incidência de coinfeção por HCMV em pacientes com estágio avançado de fibrose estando esse fato associado à desregulação da via do IFN α / β (via JAK-STAT) em seus PBMCs, tal estudo mostra uma relação íntima entre a infecção por HCMV e a progressão das lesões hepáticas (inflamação, esteatose e fibrose) de graus precoces a avançados em pacientes infectados com o genótipo 4 do HCV. Esses dados sugerem um novo determinante para fibrose hepática acelerada no cenário de infecção por HCV (105). A progressão das lesões hepáticas associadas à cronicidade do HCV é um processo multifatorial. Nesse sentido, a coinfeção do HCV com outros vírus é considerada um dos fatores de monitoramento mais importantes. Estudos recentes relataram que pacientes com HCV coinfectados com HBV ou HIV têm doenças hepáticas altamente progressivas e atingem mais rapidamente cirrose e CHC do que pacientes monoinfectados com HCV (103, 104,

106). No entanto, os relatos na literatura sobre a coinfeção HCV- HCMV são escassos e principalmente voltados ao estudo do papel da infecção por HCMV após o transplante de fígado ou rim. Várias publicações demonstraram gravidade aumentada do índice de atividade da hepatite e do estado de fibrose em pacientes coinfectados por HCV / HCMV submetidos a transplante de fígado (5, 107, 108). Os pacientes com HBV e HCV co-infectados com HCMV sofrem de necroinflamação grave e fibrose hepática mais intensamente do que os pacientes mono-infectados com HCMV(109). Foi descrita, ainda, uma relação direta entre a coinfeção por HCMV e a resposta fraca à terapia com IFN21, bem como aumento do risco de desenvolvimento de CHC (110). O HCMV estabelece uma latência vitalícia em indivíduos saudáveis; no entanto, após a imunossupressão, ocorre reativação devido ao reinício do programa de replicação lítica viral (111). A infecção crônica pelo HCV, portanto, representa um exemplo ideal para o meio de imunossupressão. As células T regulatórias exibem números aumentados e atividade supressora aprimorada em pacientes infectados cronicamente pelo HCV em comparação com a depuração espontânea (112, 113), o que corrobora para as evidências de aumento da incidência de reativação de HCMV em pacientes infectados pelo HCV, quando comparados a indivíduos saudáveis.

No nosso estudo, encontramos níveis de vitamina D mais elevados no grupo dos pacientes coinfectados (28,6 ng / mL), e a mediana dos níveis de vitamina D nos pacientes portadores de hepatite C foi de valores acima do valor de corte (20 ng / mL), mostrando suficiência na dosagem sérica da vitamina em todos os pacientes analisados. Tal fato foi contrário aos relatos descritos na literatura de que a deficiência de vitamina D é comum entre pacientes com doenças hepáticas. Se o status de vitamina D pode realmente afetar a função hepática é ainda mal compreendido. Estudo prévio constatou que a baixa concentração de 25 (OH) D foi associado a valores elevados de AST e colesterol total. Como a avaliação da fibrose hepática em nosso estudo não foi significativa, não foi possível se estabelecer uma correlação entre os níveis séricos de vitamina D e os índices de fibrose hepática nos pacientes coinfectados e mono infectados. Sobre esse assunto, existe evidência na literatura de que fibrose grave foi encontrada em pacientes com menor concentração de vitamina D (114). Outro trabalho corrobora para a mesma associação entre vitamina D e fibrose hepática. Nele, a prevalência de deficiência de vitamina D foi maior em pacientes com HCV com fibrose mais avançada(115). Posteriormente, outro autor analisou a

associação entre a dosagem de vitamina D, enzimas hepáticas e doença hepática em 2.649 indivíduos e constatou que o risco de ter elevados níveis de ALT, AST ou GGT foi mais alto para níveis mais baixos de vitamina D(116).

Dentre os resultados obtidos, nosso estudo encontrou níveis mais elevados de carga viral RNA HCV no grupo de pacientes coinfetados, o que poderia significar uma maior dificuldade da resposta imunológica do hospedeiro a um organismo que tenta debelar simultaneamente as duas infecções virais. Uma série de estudos tentaram examinar a relação da concentração sérica de RNA do HCV com gravidade da doença hepática, através da observação de anormalidade histopatológica (26, 117-121). Alguns estudos identificaram que a carga de RNA do HCV está correlacionada com inflamação hepática (26, 119-121), no entanto, outros indicaram que os níveis séricos de RNA do HCV não foram associados com inflamação hepática (117), nem fibrose(26, 118, 121, 122). Estes estudos foram conduzidos para elucidar a influência do RNA sérico do HCV na predição da gravidade das doenças hepáticas usando desenho transversal, resultando nas limitações de causalidade temporalidade. Um projeto de coorte acompanhou 6.570 usuários de drogas por cerca de oito anos e mostrou que o nível de RNA do HCV foi um preditor de morte por doença hepática, com razão de risco ajustada e IC de 95% 2,3 (1,5-5,9) - vezes maior por aumento de log₁₀ IU / mL em carga de HCV (120). No entanto, alguns dos usuários de drogas foram co-infetados com HIV, assim, a generalização para a população na comunidade foi limitada (26).

Limitações do estudo

Sabe-se que consumo abusivo de álcool é um fator determinante no desenvolvimento e progressão da fibrose hepática (124). Desta forma, o mesmo deveria ter sido avaliado por escores ou escalas validadas como AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*) (125). Porém, trata-se de um estudo retrospectivo onde a quantificação do consumo alcóolico não foi realizada de forma sistemática nas consultas médicas dos pacientes incluídos, impossibilitando a avaliação do impacto desta variável na presença de fibrose.

Outra limitação foi a ausência do estadiamento da fibrose por biópsia hepática ou fibroscan por indisponibilidade ou dificuldade de realização dos mesmos nos pacientes do presente estudo, além disso, houve um elevado número de “missings”

nas informações sobre a fibrose hepática, o que prejudicou a análise desta variável. Devido ao n pequeno da amostra, não foi possível chegar a nenhum resultado significativamente estatístico nas análises das variáveis em questão.

Por ser um estudo realizado a partir de dados e banco de amostras sanguíneas de pacientes atendidos no ano de 2012, os tratamentos para hepatite C preconizados e instituídos a estes pacientes, se tornaram obsoletos, após o surgimento dos antivirais de ação direta, que revolucionaram a história da doença, e seu curso clínico, tornando pouco relevante a análise das variáveis relacionadas ao tratamento dos pacientes em questão para o contexto atual do tratamento da hepatite C (126-128).

7. CONCLUSÕES

1. Entre os pacientes com hepatite C analisados, em 18,58 % apresentaram também o HCMV DNA, indicando uma alta prevalência da coinfeção HCV/HCMV.
2. Não houve diferença estatística entre os dados sociodemográficos dos pacientes co-infectados HCV/HCMV com pacientes monoinfectados pelo HCV, pelo fato dos pacientes pertencerem a faixas etárias semelhantes e serem acompanhados no mesmo ambulatório;
3. Neste estudo, os níveis de AST, ALT não foram maiores nos pacientes coinfectados, ao contrário do que é descrito na literatura.
4. A coinfeção HCV/HCMV não interferiu no grau de fibrose hepática.
5. Nos pacientes coinfectados, a carga viral do HCV foi maior, o que demonstra a importância de monitoramento das coinfeções.
6. A concentração de vitamina D, não interferiu na coinfeção. Os valores de vitamina D foram maiores no grupo de pacientes coinfectados, mostrando que sua deficiência não foi mais frequente nos pacientes coinfectados, além disso, não foi possível analisar se a deficiência de vitamina D teria relação com o índice de fibrose, pois não foram encontrados resultados com significância estatística.
7. É importante investigar a coinfeção HCV/HCMV, pois a reativação dos HCMV pode ocorrer em pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Georgel P, Schuster C, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, et al. Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol Med*. 2010;16(6):277-86.
2. Herman D, Han H. Cytomegalovirus in liver transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22(4):345-50.
3. Yu YD, Park GC, Park PJ, Choi YI, Hwang S, Song GW, et al. Cytomegalovirus infection-associated fulminant hepatitis in an immunocompetent adult requiring emergency living-donor liver transplantation: report of a case. *Surg Today*. 2013;43(4):424-8.
4. Mutimer DJ, Shaw J, O'Donnell K, Elias E. Enhanced (cytomegalovirus) viral replication after transplantation for fulminant hepatic failure. *Liver Transpl Surg*. 1997;3(5):506-12.
5. Razonable RR, Burak KW, van Crujisen H, Brown RA, Charlton MR, Smith TF, et al. The pathogenesis of hepatitis C virus is influenced by cytomegalovirus. *Clin Infect Dis*. 2002;35(8):974-81.
6. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
7. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62.
8. Hepacivirus [Internet]. 2006. Available from: <http://www.ictvdb.org/Ictv/index.htm>
9. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(6):2451-5.
10. Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 1997;78 (Pt 10):2397-410.
11. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics*. 2000;5(3):129-51.
12. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, et al. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science*. 2000;288(5464):339-44.
13. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-73.

14. Robertson B, Myers G, Howard C, Brettin T, Bukh J, Gaschen B, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol.* 1998;143(12):2493-503.
15. Peres-da-Silva A, de Almeida AJ, Lampe E. Mutations in hepatitis C virus NS3 protease domain associated with resistance to specific protease inhibitors in antiviral therapy naive patients. *Arch Virol.* 2010;155(5):807-11.
16. Warkad SD, Nimse SB, Song KS, Kim T. HCV Detection, Discrimination, and Genotyping Technologies. *Sensors (Basel).* 2018;18(10).
17. PetruzzIELlo A, Loquercio G, Sabatino R, Balaban DV, Ullah Khan N, Piccirillo M, et al. Prevalence of Hepatitis C virus genotypes in nine selected European countries: A systematic review. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(5):e22876.
18. PetruzzIELlo A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016;22(34):7824-40.
19. Spearman CW, Dusheiko GM, Hellard M, Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet.* 2019;394(10207):1451-66.
20. (BR)" MdS. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (PCDT). . Secretaria de vigilância em saúde. Brasília (DF)2019.
21. Silva CMD, Peder LD, Thomazella MV, Teixeira JJV, Bertolini DA. Profile of Hcv Genotypes and Hiv-Subtypes among Hiv-Coinfected Patients in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2019;56(4):344-50.
22. Martell M, Esteban JI, Quer J, Genesca J, Weiner A, Esteban R, et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol.* 1992;66(5):3225-9.
23. Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1).
24. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S3-S13.
25. Stahmeyer JT, Rossol S, Bert F, Boker KH, Bruch HR, Eisenbach C, et al. Outcomes and Costs of Treating Hepatitis C Patients in the Era of First Generation Protease Inhibitors - Results from the PAN Study. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159976.
26. Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9270-80.
27. Wang LS, D'Souza LS, Jacobson IM. Hepatitis C-A clinical review. *J Med Virol.* 2016;88(11):1844-55.
28. Focaccia. Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas. 3a ed ed. São Paulo2013.

29. Organization. WH. WHO estimates of the prevalence and incidence of hepatitis C virus infection by World Health Organization region, 2015. In: Analysis CfD, editor. (WHO/CDS/HIV/18.46) ed. Geneva: World Health Organization2018.
30. Prevention CfDCa. Viral Hepatitis Surveillance — United States, 2018
2020.
31. (BR) MdS. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2019. In: Saúde SdVe, editor. 50 ed. Brasília (DF)2019.
32. (BR) MdS. Guia de vigilância em saúde. In: Saúde SdVe, editor. 3 edicao ed. Brasília (DF)2019.
33. Organization. WH. WHO guidelines on hepatitis B and C testing. Geneva: World Health Organization2017.
34. Freiman JM, Tran TM, Schumacher SG, White LF, Ongarello S, Cohn J, et al. Hepatitis C Core Antigen Testing for Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2016;165(5):345-55.
35. Lambert N. Value of HCV antigen-antibody combined HCV assay in hepatitis C diagnosis. *Dev Biol (Basel).* 2007;127:113-21.
36. Mane A, Sacks J, Sharma S, Singh H, Tejada-Strop A, Kamili S, et al. Evaluation of five rapid diagnostic tests for detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV): A step towards scale-up of HCV screening efforts in India. *PLoS One.* 2019;14(1):e0210556.
37. Tang W, Chen W, Amini A, Boeras D, Falconer J, Kelly H, et al. Diagnostic accuracy of tests to detect Hepatitis C antibody: a meta-analysis and review of the literature. *BMC Infect Dis.* 2017;17(Suppl 1):695.
38. Liu L, Zhang M, Hang L, Kong F, Yan H, Zhang Y, et al. Evaluation of a new point-of-care oral anti-HCV test for screening of hepatitis C virus infection. *Viol J.* 2020;17(1):14.
39. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. *Int J Med Sci.* 2006;3(2):35-40.
40. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 2000;285(2):194-204.
41. Meng S, Li J. A novel duplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of hepatitis C viral RNA with armored RNA as internal control. *Viol J.* 2010;7:117.
42. Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics.* 2007;8(4):234-51.
43. Gelderblom HC, Menting S, Beld MG. Clinical performance of the new rRoche COBAS TaqMan HCV Test and High Pure System for extraction, detection and

quantitation of HCV RNA in plasma and serum. *Antivir Ther.* 2006;11(1):95-103.

44. Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol Biotechnol.* 2002;20(2):163-79.

45. Sarrazin C. Highly sensitive hepatitis C virus RNA detection methods: molecular backgrounds and clinical significance. *J Clin Virol.* 2002;25 Suppl 3:S23-9.

46. Kargar M, Askari A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Hepatitis C virus. *Indian J Virol.* 2012;23(1):18-23.

47. Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang DK, Ankrum JA, et al. Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem Soc Rev.* 2014;43(10):3324-41.

48. Kintzios S, Pistola E, Panagiotopoulos P, Bomsel M, Alexandropoulos N, Bem F, et al. Bioelectric recognition assay (BERA). *Biosens Bioelectron.* 2001;16(4-5):325-36.

49. Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis.* 2003;7(1):127-37.

50. Levada PM, Moraes CF, Corvino SM, Grotto RM, Silva GF, Pardini MI. [Reverse hybridization and sequencing for genotyping the hepatitis C virus]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):135-8.

51. Takeda H, Yamashita T, Ueda Y, Sekine A. Exploring the hepatitis C virus genome using single molecule real-time sequencing. *World J Gastroenterol.* 2019;25(32):4661-72.

52. Sebastiani G, Alberti A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol.* 2006;12(23):3682-94.

53. Grigorescu M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *J Gastrointest Liver Dis.* 2006;15(2):149-59.

54. Holmberg SD, Lu M, Rupp LB, Lamerato LE, Moorman AC, Vijayadeva V, et al. Noninvasive serum fibrosis markers for screening and staging chronic hepatitis C virus patients in a large US cohort. *Clin Infect Dis.* 2013;57(2):240-6.

55. Jayaswal ANA, Levick C, Selvaraj EA, Dennis A, Booth JC, Collier J, et al. Prognostic value of multiparametric magnetic resonance imaging, transient elastography and blood-based fibrosis markers in patients with chronic liver disease. *Liver Int.* 2020.

56. Merli M, Galli L, Castagna A, Salpietro S, Gianotti N, Messina E, et al. Diagnostic accuracy of APRI, FIB-4 and Forns for the detection of liver cirrhosis in HIV/HCV-coinfected patients. *New Microbiol.* 2016;39(2):110-3.

57. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 2006;43(6):1317-25.

58. Forns X, Ampurdanes S, Llovet JM, Aponte J, Quinto L, Martinez-Bauer E, et al.

Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):986-92.

59. Castera L, Winnock M, Pambrun E, Paradis V, Perez P, Loko MA, et al. Comparison of transient elastography (FibroScan), FibroTest, APRI and two algorithms combining these non-invasive tests for liver fibrosis staging in HIV/HCV coinfecting patients: ANRS CO13 HEPAVIH and FIBROSTIC collaboration. *HIV Med*. 2014;15(1):30-9.

60. Gines P, Graupera I, Lammert F, Angeli P, Caballeria L, Krag A, et al. Screening studies of transient elastography and FibroTest in the general population - Authors' reply. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(4):246-7.

61. Pavlov CS, Casazza G, Nikolova D, Tsochatzis E, Burroughs AK, Ivashkin VT, et al. Transient elastography for diagnosis of stages of hepatic fibrosis and cirrhosis in people with alcoholic liver disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;1:CD010542.

62. Thiele M, Madsen BS, Hansen JF, Detlefsen S, Antonsen S, Krag A. Accuracy of the Enhanced Liver Fibrosis Test vs FibroTest, Elastography, and Indirect Markers in Detection of Advanced Fibrosis in Patients With Alcoholic Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018;154(5):1369-79.

63. Manandhar T, Hò GT, Pump WC, Blasczyk R, Bade-Doeding C. Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).

64. Griffiths P. Principles and Practice of Clinical Virology, Sixth Edition. 2009. p. 161-97.

65. Craig JM, Macauley JC, Weller TH, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957;94(1):4-12.

66. Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92(2):418-24.

67. Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92(2):424-30.

68. Tomtishen JP, 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Viol J*. 2012;9:22.

69. Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(4):848-55.

70. Lobato-Silva DdF. Citomegalovirus: epidemiologia baseada em dados de soroprevalência. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2016;7:213-9.

71. C.Pannuti. Citomegalovirose. In: R.Focaccia RV, editor. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 2009.

72. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth

prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int J Infect Dis.* 2014;22:44-8.

73. Wang C, Zhang X, Bialek S, Cannon MJ. Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52(2):e11-3.

74. Gerna G, Lilleri D. Human cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: development of a protective HCMV vaccine. *New Microbiol.* 2019;42(1):1-20.

75. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Boppana SB, Novak Z, Wagatsuma VM, Oliveira Pde F, et al. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(3):297 e1-8.

76. Serra FC, Machado J, Nicola MH, Jorge MCAS, Cruz LEd, Giordano MV, et al. Soroprevalência de citomegalovírus em gestantes brasileiras de classe socioeconômica favorecida. *DST j bras doenças sex transm.* 2009;21(1).

77. Barbosa NG, Yamamoto AY, Duarte G, Aragon DC, Fowler KB, Boppana S, et al. Cytomegalovirus Shedding in Seropositive Pregnant Women From a High-Seroprevalence Population: The Brazilian Cytomegalovirus Hearing and Maternal Secondary Infection Study. *Clin Infect Dis.* 2018;67(5):743-50.

78. Bischof N, Wehmeier C, Dickenmann M, Hirt-Minkowski P, Amico P, Steiger J, et al. Revisiting cytomegalovirus serostatus and replication as risk factors for inferior long-term outcomes in the current era of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2020;35(2):346-56.

79. Stowell JD, Forlin-Passoni D, Din E, Radford K, Brown D, White A, et al. Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *J Infect Dis.* 2012;205(2):211-4.

80. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr.* 1999;135(1):60-4.

81. Azevedo LS, Pierrotti LC, Abdala E, Costa SF, Strabelli TM, Campos SV, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo).* 2015;70(7):515-23.

82. Razonable RR, Rivero A, Rodriguez A, Wilson J, Daniels J, Jenkins G, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis.* 2001;184(11):1461-4.

83. Khan SF, Yong MK, Slavin MA, Hughes P, Sasadeusz J. Very late onset Cytomegalovirus disease with ganciclovir resistance >15 years following renal transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2020:e13441.

84. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):76-98, Table of Contents.

85. Emery V, Zuckerman M, Jackson G, Aitken C, Osman H, Pagliuca A, et al. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2013;162(1):25-39.
86. Requião-Moura LR, deMatos AC, Pacheco-Silva A. Cytomegalovirus infection in renal transplantation: clinical aspects, management and the perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):142-8.
87. Al Midani A, Pinney J, Field N, Atkinson C, Haque T, Harber M. Fulminant hepatitis following primary herpes simplex virus infection. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011;22(1):107-11.
88. Abbo L, Alcaide ML, Pano JR, Robinson PG, Campo RE. Fulminant hepatitis from herpes simplex virus type 2 in an immunocompetent adult. *Transpl Infect Dis*. 2007;9(4):323-6.
89. Cisneros-Herreros JM, Herrero-Romero M. [Hepatitis due to herpes group viruses]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(6):392-7; quiz 8.
90. Shibata Y, Kitajima N, Kawada J, Sugaya N, Nishikawa K, Morishima T, et al. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. *Microbiol Immunol*. 2005;49(8):771-7.
91. Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*. 1990;12 Suppl 7:S745-53.
92. Mocarski ES, Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*. 2002;10(7):332-9.
93. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11(5):466-74.
94. Carraro E, Granato CF. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *J Med Virol*. 2003;70(2):240-3.
95. Jin CN, Chen JD, Sheng JF. Vitamin D deficiency in hepatitis C virus infection: what is old? what is new? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jul;30(7):741-746.
96. Dadabhai AS, Saberi B, Lobner K, Shinohara RT, Mullin GE. Influence of vitamin D on liver fibrosis in chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis of the pooled clinical trials data. *World J Hepatol* 2017;9:278–287.
97. Abu-Mouch S, Fireman Z, Jarchovsky J, Zeina AR, Assy N. Vitamin D supplementation improves sustained virologic response in chronic hepatitis C (genotype 1)-naive patients. *World J Gastroenterol* 2011;17:5184–5190.
98. Raposo JV, Alves ADR, Dos Santos da Silva A, Dos Santos DC, Melgaco JG, Moreira OC, et al. Multiplex qPCR facilitates identification of betaherpesviruses in patients with acute liver failure of unknown etiology. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):773.

99. Melo-Villar L, Lampe E, de Almeida AJ, de PSL, Lewis-Ximenez LL, Miguel JC, et al. Hypovitaminosis D and its relation to demographic and laboratory data among hepatitis C patients. *Ann Hepatol.* 2015;14(4):457-63.
100. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S58-68.
101. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015;235(2):288-97.
102. Mauss S, Buendgens L, Christensen S, Ingiliz P, Berger F, Huppe D, et al. Risk factors for remaining liver injury in patients with virological elimination of chronic hepatitis C. *Z Gastroenterol.* 2019;57(2):139-47.
103. Huang X, Liang H, Fan X, Zhu L, Shen T. Liver Damage in Patients with HCV/HIV Coinfection Is Linked to HIV-Related Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:8142431.
104. Sarsekeyeva N, Kosherova B, Azizov I. Comparative assessment of liver fibrosis in patients with HIV/chronic hepatitis C co-infection in different ethnic groups. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(10):1099-107.
105. Ibrahim MK, Khedr A, Bader El Din NG, Khairy A, El Awady MK. Increased incidence of cytomegalovirus coinfection in HCV-infected patients with late liver fibrosis is associated with dysregulation of JAK-STAT pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1):10364.
106. Erman A, Krahn MD, Hansen T, Wong J, Bielecki JM, Feld JJ, et al. Estimation of fibrosis progression rates for chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis update. *BMJ Open.* 2019;9(11):e027491.
107. Chopra KB, Demetris AJ, Blakolmer K, Dvorchik I, Laskus T, Wang LF, et al. Progression of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 2003;76(10):1487-91.
108. Rosen HR, Chou S, Corless CL, Gretch DR, Flora KD, Boudousquie A, et al. Cytomegalovirus viremia: risk factor for allograft cirrhosis after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation.* 1997;64(5):721-6.
109. Bayram A, Ozkur A, Erkilic S. Prevalence of human cytomegalovirus co-infection in patients with chronic viral hepatitis B and C: a comparison of clinical and histological aspects. *J Clin Virol.* 2009;45(3):212-7.
110. Ibrahim MK, Salama H, Abd El Rahman M, Dawood RM, Bader El Din NG, Salem HF, et al. Three Gene Signature for Predicting the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronically Infected Hepatitis C Virus Patients. *J Interferon Cytokine Res.* 2016;36(12):698-705.
111. Polic B, Hengel H, Krmpotic A, Trgovcich J, Pavic I, Luccaronin P, et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med.* 1998;188(6):1047-54.
112. Ebinuma H, Nakamoto N, Li Y, Price DA, Gostick E, Levine BL, et al. Identification

and in vitro expansion of functional antigen-specific CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *J Virol.* 2008;82(10):5043-53.

113. Smyk-Pearson S, Golden-Mason L, Klarquist J, Burton JR, Jr., Tester IA, Wang CC, et al. Functional suppression by FoxP3⁺CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008;197(1):46-57.

114. Villar LM, Del Campo JA, Ranchal I, Lampe E, Romero-Gomez M. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(35):5917-24.

115. Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol.* 2011;54(5):887-93.

116. Skaaby T, Husemoen LL, Borglykke A, Jorgensen T, Thuesen BH, Pisinger C, et al. Vitamin D status, liver enzymes, and incident liver disease and mortality: a general population study. *Endocrine.* 2014;47(1):213-20.

117. De Moliner L, Pontisso P, De Salvo GL, Cavalletto L, Chemello L, Alberti A. Serum and liver HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and histological features. *Gut.* 1998;42(6):856-60.

118. Duvoux C, Pawlotsky JM, Bastie A, Cherqui D, Soussy CJ, Dhumeaux D. Low HCV replication levels in end-stage hepatitis C virus-related liver disease. *J Hepatol.* 1999;31(4):593-7.

119. Fanning L, Kenny E, Sheehan M, Cannon B, Whelton M, O'Connell J, et al. Viral load and clinicopathological features of chronic hepatitis C (1b) in a homogeneous patient population. *Hepatology.* 1999;29(3):904-7.

120. Lau JY, Davis GL, Kniffen J, Qian KP, Urdea MS, Chan CS, et al. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet.* 1993;341(8859):1501-4.

121. Naito M, Hayashi N, Hagiwara H, Hiramatsu N, Kasahara A, Fusamoto H, et al. Serum hepatitis C virus RNA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. *Hepatology.* 1994;19(4):871-5.

122. Lagging LM, Garcia CE, Westin J, Wejstal R, Norkrans G, Dhillon AP, et al. Comparison of serum hepatitis C virus RNA and core antigen concentrations and determination of whether levels are associated with liver histology or affected by specimen storage time. *J Clin Microbiol.* 2002;40(11):4224-9.

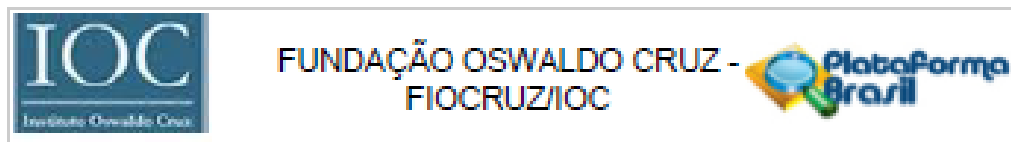
123. Hisada M, Chatterjee N, Kalaylioglu Z, Battjes RJ, Goedert JJ. Hepatitis C virus load and survival among injection drug users in the United States. *Hepatology.* 2005;42(6):1446-52.

124. Mankal PK, Abed J, Aristy JD, Munot K, Suneja U, Engelson ES, et al. Relative effects of heavy alcohol use and hepatitis C in decompensated chronic liver disease in a hospital inpatient population. *Am J Drug Alcohol Abuse.* 2015;41(2):177-82.

125. Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addiction*. 1993;88(6):791-804.
126. Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S87-99.
127. Falade-Nwulia O, Suarez-Cuervo C, Nelson DR, Fried MW, Segal JB, Sulkowski MS. Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med*. 2017;166(9):637-48.
128. Pecoraro V, Banzi R, Cariani E, Chester J, Villa E, D'Amico R, et al. New Direct-Acting Antivirals for the Treatment of Patients With Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Clin Exp Hepatol*. 2019;9(4):522-38.

9. ANEXOS

Anexo 1 : Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo sobre o papel da vitamina D em pacientes com hepatite B e C

Pesquisador: LIVIA MELO VILLAR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41269015.3.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 951.357

Data da Relatoria: 09/02/2015

Apresentação do Projeto:

Os vírus da hepatite C (HCV) e B (HBV) são os maiores causadores de infecção hepática crônica em todo mundo, com 130 a 170 milhões de indivíduos infectados pelo HCV e 350 milhões de portadores crônicos de HBV. O objetivo geral deste estudo é determinar os níveis séricos e polimorfismos genéticos associados com a vitamina D e resistência insulínica (RI) em pacientes infectados pelos vírus das hepatites B e C, a fim de fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento destas infecções. Para isto, selecionaremos dois grupos de estudo: 1) mono infectados pelo HBV (HBsAg reagente no soro) e 2) mono infectados pelo HCV (anti-HCV reagente e HCV RNA detectado no soro). Nestes 2 grupos serão coletadas 200 amostras de soro antes (basais) e após o tratamento antiviral (intervalo médio de 6 meses) para determinação dos níveis de vitamina D e quantificação dos níveis circulantes de IL-6, IL-17 e IL-23 nas amostras basais de soro. Amostras de sangue total (com anticoagulante) serão obtidas dos 2 grupos para determinação dos polimorfismos genéticos dos genes Bsm1, Taq1, Apa1, CYP2R1, GC, HMG1A1, APOC3, IRS-1, IRS-2 e PNPLA3. O grupo 2 também será estratificado de acordo com a presença ou ausência de RI, e as suas amostras basais serão utilizadas para determinar a variabilidade genética dos genes core, NS5B, NS3, E1 e E2 do HCV. Os seguintes dados serão obtidos de todos os indivíduos: comportamento de risco relacionado às duas condições

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 708 (Campus Expandido)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cep@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 861.357

patológicas, sexo, idade, peso (kg), altura (m), circunferência da cintura abdominal (cm), pressão arterial e uso de medicações concomitantes. Serão também calculados o Índice de massa corpórea (IMC) e o grau de fibrose hepática. As amostras também serão utilizadas para determinação dos níveis de ALT, AST, gama-glutamilttransferase, fosfatase alcalina, contagem de plaquetas, hormônio estimulador da tireóide, glicose, triglicerídeos, colesterol HDL, VLDL, LDL. O HCV RNA e HBV DNA serão detectados por testes comerciais (Cobas Taqman HCV e HBV, Roche Diagnostics, França) e a genotipagem do HCV e HBV será feita pela técnica de INNOLIPA (INNO-LIPA HBV Genotyping e HCV Genotype 2.0 Deerfield, EUA). A vitamina D será dosada utilizando o teste LIAISON® 25 OH Vitamin D e a RI será determinada através do cálculo do Índice HOMA. Para determinação dos polimorfismos genéticos citados e da variabilidade genética do HCV serão utilizados o PCR em tempo real e sequenciamento, respectivamente. Como perspectivas, esperamos compreender os fatores relacionados a RI e a influência da vitamina D nos pacientes com HCV e HBV o que permitirá contribuir para um melhor entendimento e identificação de novos fatores preditivos da resposta à terapia antiviral.

Metodologia Proposta:

Este estudo será composto por três grupos de indivíduos: 300 amostras de indivíduos com infecção pelo HCV (anti-HCV reagente e HCV RNA detectado por mais de seis meses) antes durante e após o tratamento; 300 amostras obtidas de pacientes com infecção pelo HBV (presença de HBsAg) e 300 amostras de indivíduos saudáveis. Após jejum de 12 horas, as amostras de sangue serão coletadas por punção venosa (8 ml) em tubo com ou sem anticoagulante. Em seguida, serão alíquotadas e armazenadas em microtubos a -70°C na soroteca do LAHEP/IOC/FIOCRUZ. Todas as amostras de soro serão avaliadas para a detecção dos marcadores de hepatite B e C: HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc IgM, anti-HBc total, anti-HBs, anti-HCV pela técnica de ELISA, utilizando-se testes comerciais (Radim, Itália). HCV RNA e HBV DNA serão detectados por testes comerciais (Cobas Taqman HCV e HBV, Roche Diagnostics, França) e genotipagem do HCV e HBV será feita por meio da técnica INNOLIPA (INNO-LIPA HBV Genotyping e HCV Genotype 2.0 Deerfield, EUA). Estas amostras também serão utilizadas para determinação dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (gama-GGT), fosfatase alcalina, hormônio estimulador da tireóide, glicose, triglicerídeos, colesterol HDL, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), 25OH vitamina D e Insulina. As amostras de sangue total também serão submetidas ao hemograma

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfio Cruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 601.357

completo e contagem de plaquetas. Os níveis de ALT e AST serão determinados pela cinética UV-IFCC com auxílio do equipamento Labmax Pienno (Labtest, MG, Brasil). A glicemia de jejum será dosada utilizando-se um sistema enzimático por fotometria ultravioleta (Labtest, MG, Brasil). Os níveis séricos de gama-GGT, colesterol, LDL, VLDL, fosfatase alcalina e triglicerídeos serão determinados por métodos colorimétricos (Labtest, MG, Brasil). A insulina sérica será determinada pelo método imunoenzimático (MEIA, Abbott, Chicago, IL, EUA). A vitamina D será dosada utilizando-se o teste LIAISON® 25 OH Vitamin D. Níveis de deficiência de vitamina D serão categorizados em deficiência (< 20 ng/ml) e ausência de deficiência (≥ 20 ng/ml). Para a quantificação das ILs serão utilizados os seguintes ensaios imunoenzimáticos: Human Interleukin-6 (hIL-6) (Biosource Europe SA, Bélgica), IL-23 Heterodimer Human Elisa kit (Invitrogen Corporation, EUA) e IL-17 ELISA (R&D Systems, EUA). A concentração de cada interleucina será estabelecida de acordo com os parâmetros descritos nos protocolos dos fabricantes. Para determinação dos polimorfismos de base única (SNPs), o DNA genômico será obtido a partir das amostras de sangue total utilizando-se o kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha). Os seguintes polimorfismos genéticos serão determinados por PCR em tempo real de acordo com protocolos previamente estabelecidos: GC (rs7041 e rs4588), CYP2R1 (rs10741657), Bsm1 (rs1544410), Apa1 (rs7975232), Taq1 (rs731236), HMG1A1 (rs146052672), FNPLA3 (rs738409), Apoc3 (rs2854116 e rs2854117), IR3-1 (rs1801278) e IR3-2 (rs1805097) (Péña-Chilet et al., 2013; Stattermayer et al., 2010; Kozlitina et al., 2010; Chieffari et al., 2013; Feng et al., 2013; Baur et al., 2012; Ramo-Lopez et al., 2007). Para determinação da variabilidade genética dos genes core, NS5B, NS3, E1 e E2 do HCV, o RNA viral será obtido a partir das amostras de soro utilizando-se o kit Qiamp Viral RNA minikit (QIAGEN, Valencia, Spain). A transcrição reversa será feita utilizando a enzima Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, EUA) com iniciadores randômicos (Martins et al., in press). O DNA complementar será empregado para detecção por PCR dos genes de interesse (Chao-Hung et al., 2012; Espírito-Santo MP et al., 2007; Peres-da-Silva A et al., 2012; Hsieh et al., 2012). Os produtos amplificados serão sequenciais após purificação e quantificação.

Critério de Inclusão:

Para a hepatite C, serão incluídos indivíduos que seguem o tratamento padrão definido pela PORTARIA No 221, DE 13 DE JULHO DE 2011 de acordo com o genótipo do vírus. Neste caso, teremos indivíduos com genótipo 1 que realizam o tratamento por até 72 semanas e indivíduos com genótipo 3 que realizam o tratamento por até 48 semanas. Para a hepatite B, serão incluídos indivíduos com HBsAg reagente não cirróticos, onde todos serão tratados com interferon. Eles

Endereço: Av. Brasil 4336, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-0011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfio cruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 801.357

devem ter idade maior que 18 anos, de qualquer sexo, raça ou etnia.

Critério de Exclusão:

(1) cirrose avançada (Child-Pugh B e C); (2) carcinoma hepatocelular; (3) câncer ou doenças intestinais crônicas; (4) infecção pelo HIV; (5) terapia com medicamentos conhecidos por afetarem o metabolismo da vitamina D, incluindo suplementos minerais e de vitamina; (6) tratamento prévio com terapia antiviral, drogas imunossupressoras ou uso regular de drogas indutoras de esteatose; (7) usuário de droga intravenosa; (8) e não concordância com os termos do consentimento livre e esclarecido.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A concentração da vitamina D e os polimorfismos de genes receptores da vitamina D estão associados a resposta ao tratamento antiviral para hepatites B e C.

Objetivo Primário:

O objetivo geral deste estudo é determinar os níveis séricos e polimorfismos genéticos associados com a vitamina D e resistência insulínica em pacientes infectados pelos vírus das hepatites B e C, a fim de fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento destas infecções onde a suplementação desta vitamina bem como o controle da resistência insulínica poderia ser útil para aumento da resposta ao tratamento antiviral.

Objetivo Secundário:

- Determinar os níveis séricos de 25 OH vitamina D em pacientes infectados pelos vírus das hepatites B ou C antes e após o tratamento antiviral, a fim de avaliar a relação entre os níveis deste parâmetro no soro e a resposta ao tratamento antiviral;
- Determinar as concentrações séricas da IL-6, IL-17, IL-23 em pacientes infectados pelo HBV e HCV e comparar estes níveis com a concentração sérica de 25 OH vitamina D, para avaliar a utilidade destes fatores como marcadores de fibrose hepática;
- Determinar os polimorfismos do gene receptor da vitamina D (VDR) Bsm1, Taq1, Apa1, CYP2R1 e GC em pacientes infectados pelo HBV e HCV, a fim de verificar se existe alguma associação entre estes polimorfismos e taxa de resposta antiviral;
- Determinar os polimorfismos dos genes HMGA1, APOC3, IRS-1, IRS-2 e FNPLA3 em relação à

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3582-9011 Fax: (21)3581-4815 E-mail: oepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 901.267

presença de resistência insulínica em pacientes infectados pelos vírus HBV e HCV e verificar se existe alguma associação entre estes polimorfismos e a taxa de resposta antiviral;

-Determinar a variabilidade genética dos genes core, E1, E2, NS3 e NS5B do HCV em pacientes com e sem RI, a fim de avaliar a influência destes genes na RI;

-Determinar a prevalência da resistência à insulina nos pacientes infectados com HBV e HCV e verificar a relação entre a resistência à insulina e o genótipo infectante e carga viral;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos são aqueles relacionados com a coleta de sangue, onde complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Os riscos da coleta serão controlados por uma coleta realizada dentro das normas de biossegurança.

Benefícios:

Os benefícios associados ao projeto seria a determinação da concentração da vitamina D e insulina sérica, assim como a determinação dos polimorfismos genéticos da vitamina D e da variabilidade genética do HCV que podem ser úteis para melhor acompanhamento do tratamento destes pacientes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos, devidamente fundamentado, e tem relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a folha de rosto, projeto de pesquisa, cronograma atualizado, orçamento da pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido e cartas de anuência das instituições.

Recomendações:

O termo de consentimento livre e esclarecido deverá ser redigido na terceira pessoa e não na primeira, ou seja, você está sendo convidado para participar deste estudo... As possibilidades de retirada da autorização e de desligamento da pesquisa deverão estar claramente mencionadas. A expressão "uma cópia deste termo" deverá ser retirada, mencionando que o termo será assinado em duas vias de igual teor e o voluntário ficará com exemplar assinado por ele e pela

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cep@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer 051.357

pesquisadora

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, em sua 201ª Reunião Ordinária, realizada em 10.02.2015, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se por aguardar o atendimento às questões acima para emissão de seu parecer.

De acordo com a Resolução CNS 466/12, as pendências devem ser respondidas exclusivamente pelo pesquisador responsável no prazo de 30 dias, a partir da data de envio do parecer pelo CEP FIOCRUZ/IOC. Após esse prazo o protocolo será arquivado. Solicita-se ainda que as respostas sejam enviadas de forma ordenada, conforme os itens das considerações deste parecer, indicando-se também a localização das possíveis alterações no protocolo, inclusive no TCLE.

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Endereço: Av. Brasil 4336, Sala 708 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.045-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefones: (21)3882-9011 Fax: (21)2581-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 051.357

RIO DE JANEIRO, 11 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br

Página 07 de 07