



Comunicação/Communication

Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: genótipos no Estado do Amazonas, Brasil

Characterization of hepatitis C virus in chronic hepatitis patients: genotypes in the State of Amazonas, Brazil

Ana Ruth Araújo^{1,2}, Carlos Maurício de Almeida¹, Liziara Fraporti^{2,3}, Nadja Garcia^{2,3}, Tatiane Amábili de Lima^{1,3}, Laura Patrícia Viana Maia^{2,3}, Kátia Luz Torres³, Andréa Monteiro Tarragô³, Flamir Victória¹, Marilu Victória¹, Adriana Tateno⁴, José Eduardo Levi⁴, Sinésio Talhari¹ e Adriana Malheiro^{1,2}

RESUMO

Introdução: No Estado do Amazonas, os dados sobre a prevalência dos genótipos do vírus da hepatite C ainda são escassos. **Métodos:** Os genótipos do VHC foram determinados em 69 pacientes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT-AM. O RNA do VHC foi detectado pela técnica de RT-PCR, utilizando-se iniciadores HC11/HC18 para a região 5' não traduzida. **Resultados:** Dos 69 pacientes, 65,2% era do sexo masculino e 34,8% do feminino. O genótipo 1 foi o mais prevalente, seguidos dos 3 e 2. **Conclusões:** Estes dados sugerem que Manaus é uma porta de entrada do vírus VHC no Estado do Amazonas.

Palavras-chaves: Vírus da hepatite C. Genotipagem. Hepatites.

ABSTRACT

Introduction: In the State of Amazonas, data regarding the prevalence of different genotypes of hepatitis C virus remains scarce. **Methods:** The genotype of 69 HCV positive patients was determined. An in-house standardized nested-PCR was used to detect HCV RNA. Genotype assignment was based on type-specific motifs on the sequenced amplicons delimited by primers HC11/HC18 from the 5' untranslated region. **Results:** Of the 69 patients studied, 65.2% were male and 34.8% were female. Genotype 1 showed the greatest prevalence, followed by 3 and 2. **Conclusions:** These data suggesting that Manaus is the point of arrival of HCV in the State of Amazonas.

Keywords: Hepatitis C virus. Genotyping. Hepatitis.

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) está estimada em mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo a mais de 3% de toda a população mundial¹. O VHC é o único representante do gênero *Hepacivirus* incluído na família *Flaviviridae*. É um pequeno vírus com cerca de 30 a 60nm de diâmetro e apresenta um genoma de RNA linear com hélice única e positiva, cuja organização assemelha-se a outros flavivírus, como o vírus do dengue².

Seu genoma contém 9.400 nucleotídeos, possuindo uma única fase de leitura aberta (*open reading frame*), que codifica uma poliproteína de pouco mais de 3.000 aminoácidos, contendo uma região estrutural e uma não-estrutural³. Estas regiões são clivadas por proteases, liberando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. A região estrutural localiza-se na porção aminoterminal, codificando a proteína *core* do nucleocapsídeo viral (proteína C, com cerca de 19kD) e as glicoproteínas E1 (gp33) e E2 (gp72), constituintes do envelope viral². Esta região do genoma representa a sequência mais altamente conservada, sugerindo um papel regulador durante a replicação viral². As proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NSB, NSSA e NSSB representam a extremidade carboxiterminal do genoma viral⁴.

Os genótipos do VHC são determinados pelo sequenciamento de nucleotídeos do genoma inteiro seguido por uma composição da árvore filogenética. Este é, atualmente, o padrão-ouro para a detecção e identificação dos diferentes genótipos do VHC. Outros métodos de genotipagem são baseados em técnicas sorológicas e moleculares. A reação em cadeia da polimerase (PCR) com métodos de genotipagem incluem o uso de *primers* para amplificação, análise de hibridização reversa, usando sondas específicas para uma região do VHC e por análises da técnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP)⁵.

Até o momento, foram identificados seis genótipos do VHC, distintos mas relacionados, além de múltiplos subtipos, por meio de correlações moleculares³: 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6. A determinação do genótipo relacionado a cada indivíduo é importante por apresentar valor preditivo em termos de resposta à terapia antiviral, com melhor resposta associada aos genótipos 2 e 3 do que ao genótipo 1³.

Basicamente, o tratamento da hepatite C visa deter a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral⁶. O protocolo terapêutico preconizado atualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil⁷ inclui a administração de interferon alfa em associação com o antiviral *ribavirina*, que potencializa o efeito do primeiro.

O impacto do VHC na saúde pública abrange desde a alta prevalência na população em geral, cujos dados ainda são pontuais e escassos, até o alto custo do tratamento das comorbidades observadas no decorrer do curso clínico. Observa-se, ainda, alta mortalidade na fase terminal da doença, com frequentes hospitalizações e intercorrências de difícil manejo, especialmente em locais de poucos recursos para assistência à saúde. Sobre esta infecção, ainda vários

1. Gerência de Virologia, Ambulatório de Virologia, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, AM. 2. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM. 3. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Laboratório de Imunologia, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM. 4. Gerência de Virologia, Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Dra. Adriana Malheiro. HEMOAM. Av. Constantino Nery 4397, 69050-002 Manaus, AM.

Tel: 55 92 3655-0113

e-mail: malheiroadriana@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 12/08/2010

Aceito em 16/11/2010

aspectos não são conhecidos, especialmente na região amazônica, onde faltam estudos epidemiológicos e moleculares na área. Este trabalho visou caracterizar os genótipos do vírus da hepatite C, em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Foram incluídos no estudo 69 pacientes, moradores da Cidade de Manaus, portadores de hepatite C crônica, cadastrados no Ambulatório da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, hospital de referência em doenças tropicais na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. As técnicas de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) sob responsabilidade do Dr. José Eduardo Levi. A extração do RNA das amostras foi realizada a partir de 140µL de soro utilizando-se o Kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen, Uniscience do Brasil-SP), de acordo com as especificações do fabricante. Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se a enzima transcriptase reversa *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) (Invitrogen Brasil) que utiliza moléculas de RNA fita simples, na presença de *Random Hexamers N6* (*Random primers*) para sintetizar fitas de DNA e a reação foi submetida às condições de termociclagem. Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen™ TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os *primers* foram desenhados a partir da região conservada 5'NCR do genoma do VHC. O produto amplificado foi identificado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose Ultrapure™ -Invitrogen Life Technologies). As amostras dos pacientes que continham RNA do VHC no plasma foram submetidas à nova PCR que gerou um produto amplificado de 308pb ideal para análise dos genótipos do VHC. Os genótipos foram determinados utilizando-se iniciadores genótipos específicos nas sequências delimitadas pelos iniciadores HC11/HC18 para a região 5' não traduzida. O sequenciamento do VHC foi realizado no sequenciador ABI PRISM™ 377 (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, California, EUA). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando-se o software ABI 377-96 collection v. 2.6. A genotipagem foi feita através da edição e alinhamento das sequências das regiões 5'NCR, utilizando o programa *Sequence Navigator* v.3.4 (Applied Biosystems), em conjunto com as sequências padrão obtidas do GenBank, (acesso *on-line*) no banco de dados do Los Alamos *National Laboratory*, nos Estados Unidos.

As análises estatísticas foram feitas no programa *GraphPad Prism* versão 4.0. Foram incluídos no estudo 69 pacientes, sendo a maior prevalência do sexo masculino (65,2%) em comparação ao feminino (34,8%), sendo que a média de idade para o sexo feminino foi de 45±15,31 e para o masculino de 46±11,92, não apresentando diferença estatística significativa entre ambos os sexos. Não foram observadas alterações significativas em relação à aspartato amino-transferase, (48,54±36,98) e (54,64±33,86), para o sexo feminino e masculino, respectivamente. No entanto, foram observadas alterações nas concentrações de alanina amino-transferase, entre ambos os sexos, quando comparado aos valores de referência.

Todos os pacientes foram reativos no teste sorológico anti-VHC e as amostras foram submetidas à técnica de PCR para confirmação do diagnóstico e posteriormente a determinação do genótipo viral como preconizado pelo Ministério da Saúde. Como mostra a **Tabela 1**, foram detectados os genótipos 1 (54,2%), 2 (20,8%) e 3 (25%)

TABELA 1 - Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite C crônica.

Sexo	Média de idade	Genótipo		AST UI/mL	ALT UI/mL
		n ^o	%		
Feminino	45±15,31 34,8% (n ^o =24)	1	54,2	48,54±36,98	74,13±66,23
		2	20,8		
		3	25,0		
Masculino	46±11,92 65,2% (n ^o =45)	1	76,1	54,64±33,86	100,3±100,1
		2	4,3		
		3	19,6		

AST: aspartato amino-transferase, ALT: alanina amino-transferase.

das mulheres. Para o sexo masculino, observamos, assim, como para o feminino, a maior prevalência do genótipo 1 (76,1%) e 3 (19,6%). No entanto, o genótipo 2 (4,3%) apresentou-se menos prevalente nesta população, quando comparado com a do sexo feminino (**Tabela 1**).

A detecção do VHC é de crucial importância para o controle da doença a nível global, sendo que mesmo em países desenvolvidos o número de mortes deve continuar aumentando devido à inadequada detecção, o que posterga o tratamento⁸. Esta detecção é baseada em 2 tipos de testes: os ensaios sorológicos para detecção de anticorpos específicos (cuja sensibilidade tem aumentado progressivamente) e os testes moleculares para detecção de partículas virais³. Especialmente, em relação aos testes moleculares, a determinação da carga viral permite avaliar a evolução da resposta terapêutica, enquanto a genotipagem prediz a resposta e influencia no regime de tratamento escolhido³.

O vírus da hepatite C é notadamente bem sucedido, produzindo uma infecção persistente que continuará por toda a vida do indivíduo, com vastas oportunidades de transmissão dentro da população humana, a menos que interrompida por uma terapia baseada no uso do interferon (IFN)⁹. Neste estudo, amostras de 69 pacientes com diagnóstico de hepatite C foram analisadas. Nesta população de estudo, a maioria dos indivíduos infectados era do sexo masculino, e encontrava-se na faixa etária acima dos 40 anos. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Torres cols¹⁰ em doadores de sangue. Naquele estudo, os autores relataram uma relação estatística entre a viremia do VHC e a faixa de 45-55 anos. Estes dados sugerem que estes indivíduos foram infectados pelo VHC, antes da inclusão de exames sorológicos obrigatórios no Brasil e, por se tratar de uma infecção latente e muitas vezes silenciosa, passaram a apresentar alterações do quadro clínico mais tardiamente.

O protocolo terapêutico preconizado atualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil⁷, inclui a administração de interferon alfa em associação com o antiviral *ribavirina*, de acordo com o genótipo viral. Desta forma, é obrigatório a genotipagem de amostras de pacientes soropositivos antes do início do tratamento. Apesar desta obrigatoriedade, dados relacionados à prevalência do HCV no Estado do Amazonas, ainda são escassos. Em 2005, Campiotto cols¹¹, em um estudo multicêntrico, descreveram que o genótipo 1 era o mais prevalente no Estado do Amazonas. No entanto, poucos indivíduos foram analisados naquela época.

No presente estudo, foi observado uma maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3 e 2. O Genótipo 1 é predominante em todo o mundo e é composto de dois subtipos principais, 1a e 1b. Além disso, tem sido demonstrado que as taxas de crescimento destes subtipos são maiores do que os genótipos 4 e 6. Na população de Alagoas, a

prevalência do subtipo 1b (65,2%) foi maior do que a observada em Salvador, Bahia, onde este subtipo só ocorreu em 38,6% das amostras positivas para o anti-VHC. No entanto, foi muito semelhante aos resultados obtidos a partir de amostras de VHC positivas de outros Estados brasileiros, como Acre, Amazonas e Pará (região norte), bem como Pernambuco, com frequências de 60% e 71% para cada região, respectivamente¹².

Ainda, Campiotto cols¹¹ demonstraram que a frequência do genótipo 3 variou entre as diferentes regiões brasileiras, com maior prevalência em Santa Catarina (50%) e Paraná (41,7%), região sul, bem como Goiás, região centro-oeste (37,1%), e Pernambuco (36,9%).

Dados semelhantes foram publicados por Torres cols, em 2009. Estes autores demonstraram a maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3, na população de doadores de sangue do Estado do Amazonas¹⁰. Estes dados corroboram aos encontrados para a população de pacientes da Fundação de Medicina Tropical, onde observamos maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3. No entanto, naquele estudo os autores não detectaram o genótipo 2 na população de doadores de sangue. Segundo estes autores, a distribuição geográfica demonstra genótipos os 1 e 3 em Manaus, e somente o 1, em amostras obtidas em doadores de sangue do interior. Esta distribuição dos genótipos é semelhante à que é encontrada por muitas cidades brasileiras e países do Oriente e pode refletir na via de introdução do VHC na Amazônia. O vírus foi, provavelmente, introduzido na região amazônica por imigrantes Europeus e medicamentos importados derivados do sangue para o Brasil. Esta hipótese é corroborada pela identificação do genótipo 3, exclusivamente, em Manaus, sugerindo que esta cidade é o ponto de chegada do VHC e que novas cepas foram disseminadas a partir de Manaus para o interior¹¹, revisto por Torres cols¹⁰. Em nosso estudo, foi também detectado o genótipo 2 do VHC em pacientes moradores de Manaus, reforçando a hipótese de que esta cidade é a porta de entrada de diferentes genótipos do VHC e distribuição do mesmo para outras localidades, como descrito anteriormente.

Considerações éticas

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao serviço de atendimento aos pacientes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Nós também agradecemos ao Edson da Fonseca Lira pela análise estatística e aos pacientes pelo consentimento em participar do estudo.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUPORTE FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Pavio N, Lai MMC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 2003; 28:287-304.
2. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14:381-388.
3. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345:41-52.
4. Sáez-Alquezar A, Bassit L, Sabino EC. Hepatites virais. In: FerreiraWA, ÁvilaSLM, editors. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001; p.37-49
5. Bezzerá CS, Lima CMJ, Vilar JL, Moreira JLB, Frota CC. Viral hepatitis C in a leading Brazilian Hospital: epidemiological factors and genotyping. *Braz J Microb* 2007; 38:656-661.
6. Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 24:69-82.
7. Ministério da Saúde [Internet]. Programa Nacional de Hepatites Virais; 2006. [Acesso 15 fev 2010]. Disponível em: www.saude.gov.br/porta/saude/.
8. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003; 362: 2095-2100.
9. Gale Jr M, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436:939-945.
10. Torres KL, Malheiro A, Tateno A, Lima TA, Mia LPV, Pimentel JPD, et al. Hepatitis C virus in blood donors, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:676-678.
11. Campiotto S, Pilho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al. Geografic distribution of Hepatitis C virus genotypes im Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:41-49.
12. Gonzaga RM, Rodart IF, Reis MG, Ramalho Neto CE, Silva DW. Distribution of Hepatitis C virus (HCV) genotypes in seropositive patients in the State of Alagoas, Brazil. *Braz J Microbiol* 2008; 39:644-647.