



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

BRUNA LORENA RODRIGUES HENDERSON

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO INSERÇÃO/DELEÇÃO DE SEIS
NUCLEOTÍDEOS NA POSIÇÃO -652 DA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE CASPASE 8 COM HEPATITE C EM BELÉM-PA

BELÉM-PA
2009

BRUNA LORENA RODRIGUES HENDERSON

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO INSERÇÃO/DELEÇÃO DE SEIS
NUCLEOTÍDEOS NA POSIÇÃO -652 DA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE CASPASE 8 COM HEPATITE C EM BELÉM-PA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
final para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^o Dr^o Eduardo José Melo dos Santos

BELÉM-PA

2009

BRUNA LORENA RODRIGUES HENDERSON

ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO INSERÇÃO/DELEÇÃO DE SEIS
NUCLEOTÍDEOS NA POSIÇÃO -652 DA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE CASPASE 8 COM HEPATITE C EM BELÉM-PA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito
final para a obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Local e data da defesa: Belém (PA), 18 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Eduardo José Melo dos Santos
ICB – UFPA
(orientador)

Prof.^a Dr^a. Samia Demachki
(ICS-UFPA)

Prof^o. Dr^o. Leonardo dos Santos Sena
(UEPA)

Prof^a Dr^a Sidney Emanuel Batista dos Santos – suplente
(ICB-UFPA)

*Sabemos que tudo contribui para
o bem daqueles que amam a Deus,
daqueles que são chamados segundo
o seu desígnio. Pois aos que ele conheceu
desde sempre, também os predestinou
a se configurarem com a imagem de seu Filho,
para que este seja o primogênito numa
multidão de irmãos. Mas, em tudo isso,
somos mais que vencedores,
graças àquele que nos amou.*

Rm 8,28-29.30

*Dedico aos meus pais, Hermes e Conceição Henderson
Pelo incansável zelo com sua pequena filha e pelo apoio
incondicional que dão em todas as minhas atividades.
Amo-vos eternamente*

Agradecimentos

“A minha alma engrandece ao Senhor e meu espírito exulta em Deus meu Salvador, porque ele olhou para a pequenez de sua serva” Lc 1, 47-48.

Agradeço a Deus que é o meu ponto de partida e de chegada, é ele quem me conduz e abençoa todas as minhas realizações. Sem ele eu nada conseguiria realizar.

É Deus que põe em meu caminho pessoas muito especiais sem as quais eu não realizaria este trabalho.

Ao meu dedicado pai científico, e nas horas vagas, orientador Prof. Dr. **Eduardo José Melo dos Santos**. Pela confiança depositada, pelos ensinamentos de bancada, e muito mais pelos ensinamentos humanos. Homem íntegro, dedicado e humilde. És na minha vida científica admirado mestre e na minha vida pessoal exemplo de humanidade que me faz crescer a cada dia com valores inestimáveis e indispensáveis para ser uma excelente cientista e Biomédica, tal como és. *Du*, Obrigada por tudo!

Agradeço as minhas *irmãs científicas*: **Layanna**, com sua admirável alegria e perseverança. **Carol**, com sua sinceridade tão marcante e seu coração fraternal. Amigas e irmãs que trilharam esse caminho junto comigo, crescendo em sabedoria e dignidade.

A **Janaina**, tão dedicada, tão responsável que só ela mesma para poder passar comigo os fins de semana no LGHM. Sua dedicação foi fundamental para realização deste trabalho, serei eternamente grata por tudo que fizeste. Contigo pude perceber melhor que “se sou fiel no pouco, Ele me confiará mais”.

A **Maria Helena**, nossa doce Maria. Obrigada pela sua confiança em cada uma de nós quando iniciamos no LGHM. Sua força de vontade, dedicação, humildade inspira a muitos jovens cientistas, e comigo não foi diferente. Obrigada MARIA!

Clayton...Claytinho, obrigada por adorar os calouros! Pois foi com esse amor que você nos apresentou coisas maravilhosas relacionadas ao nosso curso. Obrigada pelos ensinamentos de bancada e as longas conversas, acolhendo as minhas lágrimas quando o fim de semestre chegava entre outras coisinhas...Obrigada por me permitir conhecer o Clayton além da UFPA.

A **Danuta**, uma pequena GRANDE biomédica e futura médica veterinária, a **Yuka** também pequena GRANDE cientista, obrigada por ajudar sempre a tentar colocar aquelas amostras controle em ordem. ☺ A **Lary**, que nunca deixa a gente ficar triste, sempre tem maravilhosas histórias a compartilhar. **Milena e Paloma**, exemplos de esforço e perseverança. Meninas, muito obrigada!!!

Pensaram que eu ia esquecer de vocês, né! **Ana, Jean e Andreza**, obrigada pela disposição de cada um em ajudar, continuem assim, solícitos, afinal esta é uma via de mão dupla, é assim que aprendemos. Contem comigo para o que precisarem, e sucesso na caminhada e vocês.

Agradeço a **Márcia** pelo seu coração de mãe e amiga, **Clara, Fabíola e Dr.ª Fátima**.

Drº Leonardo ou como carinhosamente chamamos: Leleco, obrigada pelas suas contribuições neste trabalho e pela amizade.

As médicas que fazem parte do Grupo do fígado da Santa Casa de Misericórdia: Dr.ª **Lizomar** e Dr.ª **Ivante**, além das futuras médicas **Camila, Zilene e Adriana**. Obrigada pelo conhecimento compartilhado, continuemos o nosso caminho, apenas começamos e ainda temos muuuitos pacientes para coletar. ☺

Agradeço de modo especial a Drª Samia Demachki, a qual é tão empenhada em desenvolver nosso projeto e este é o primeiro de muitos que iremos realizar. Obrigada pela confiança.

Aos meus amigos **Jemima, Carlos Costa e Helder**. Sentirei falta dos nossos encontros via MSN para fazer nossos trabalhos, das tantas e quantas que vivemos juntos. Mas agora amigos, o nosso tempo chegou, e quem sabe agora abrimos o HCG. ☺ Obrigada pela amizade e companheirismo de vocês.

Minha família científica muito obrigada por todo o conhecimento compartilhado, sei que temos muito ainda a partilhar. Amo todos vocês!

“Percebe e entende que os melhores amigos são aqueles que estão em casa esperando por ti.”

Meu **Pai** e minha **Mãe**, muito obrigada pela dedicação e zelo de vocês para comigo, obrigada por fazerem o impossível pela minha formação, graças a vocês concluo minha graduação. Tentar descrever com palavras seria limitar a minha imensa gratidão e amor por vocês. Mas no pouco que aqui posso expressar: Muito obrigada!!

“Mãeeeeee, Paieeeee”.....Amo vocês!!!

Folhas da minha vida, como eu conseguiria ser tão feliz, tão forte se não tivesse vocês para rir e chorar comigo:

Sarah, que sempre riu comigo nos momentos mais tristes e de maior tensão, e chorou apenas para aliviar e lavar a alma. Se nós não tivéssemos a serenidade já mais conseguiríamos rir dos problemas e chorar de alegria.

Antonio Sena, o qual me fez ver que a vida é “MUUUUITO LEGAL!!” além de mostrar que a serenidade é algo que devemos exercitar todos os dias e que o bem que faço ao outro é a minha verdadeira felicidade.

Celma e Raul Matos, verdadeiros anjos que me acolheram em suas vidas como uma filha, obrigada!

Rafael Matos, ô menino chato! Obrigada pelo seu amor e carinho. Obrigada por partilhar comigo momentos que ficarão para história....momentos como esse. Obrigada!

Dr^a **Elizabeth Santana**, obrigada pelo apoio incondicional durante a minha formação. És amiga e mãe, sei que poso contar contigo sempre.

Mons. Marcelino, obrigada por me levar a Deus e me dar como irmãos St^a Teresinha e o Pe. André. Obrigada pela confiança e carinho que tens por mim. Sem o meu pai espiritual eu também nada seria. Muito obrigada!

Obrigada ao Grupo de canto o qual coordeno atualmente, pela compreensão e apoio. Agradeço a todos os grupos e pastorais que fazem parte de minha formação.

Amigos, se o seu nome não está aqui não significa que esqueci, mas se colocasse o nome de todos nos meus agradecimentos, este seria bem maior que o meu TCC. 😊

Agradeço a todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para minha formação. Com certeza são enviados de Deus na minha vida.

Obrigada!

Sumário

EPÍGRAFE	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Fígado	1
1.2. Hepatites	3
1.3. O vírus da hepatite C	4
1.4. Hepatite C	7
1.4.1. Epidemiologia	9
1.4.2. Transmissão	13
1.4.3. Diagnóstico	14
1.4.4. Tratamento	17
1.4.5. Imunologia	19
1.4.6. Patogenia	21
1.5. Predisposição Genética	23
1.5.1. O gene CASP 8	24
1.5.2. Caspases e apoptose	25
1.6. OBJETIVOS	30
1.6.1. Objetivo geral	30
1.6.2. Objetivos específicos	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. População de Estudo	31
2.2. Coleta e Processamento de Amostras	31
2.3. Genotipagem	32
2.4. Eletroforese	32
2.5. Análise Estatística	33
3. Resultados	34
4. Discussão	35
5. Conclusão	38
6. Referências	39
Anexo 1	
Anexo 2	

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1 O Fígado	1
Figura 2 Lóbulos Hepáticos	2
Figura 3 Representação esquemática da histologia hepática	2
Figura 4 Estrutura morfológica do VHC	5
Figura 5 Árvore filogenética de genótipos e subtipos do VHC	5
Figura 6 Tempo de evolução em anos, após hepatite pós-transfusional	9
Figura 7 Prevalência dos diferentes genótipos no Brasil	12
Figura 8 Respostas imunológicas natural e adquirida contra vírus	19
Figura 9 Localização do gene CASP 8	24
Figura 10 Cascata de caspase envolvida na apoptose	26
Figura 11 Indução da apoptose via extracelular	27
Figura 12 Via apoptótica	28
Figura 13 Mecanismo de Morte Celular dos Hepatócitos nas Hepatites Virais	29
Figura 14 Gel de Poliacrilamida 10%	33
Tabela 1 Padrões clínicos pós-hepatite viral.	4
Tabela 2 Principais co-fatores determinantes da gravidade da HCC	8
Tabela 3 Classificação histológica de fibrose hepática – Modelo Metavir	17
Tabela 4 Frequência alélica em pacientes e controles	34
Tabela 5 Frequência genotípica em pacientes e controles	34
Tabela 6 Frequência Observada e esperada de heterozigotos na literatura	36

Resumo

A Hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo Virus da Hepatite C, comumente assintomática, apresentando uma elevada taxa de cronicidade e pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. É considerada um dos maiores problemas de saúde pública. Hepatite crônica pode ser definida como uma doença necroinflamatória apresentando persistência do RNA-HCV e elevado índice de aminotransferases por um período superior a seis meses. A morte celular por apoptose é um evento comum nas diferentes doenças hepáticas, podendo representar papel importante em sua patogênese. Sendo assim, as caspases ocupam função de destaque na execução do programa de morte celular. Vários polimorfismos da CASP8 e CASP10 podem estar associados com um risco reduzido de câncer, além de representarem um papel importante na fibrogênese hepática, tornando importante o conhecimento da variabilidade destes genes. Neste trabalho, objetivou-se investigar a associação do polimorfismo Del 6N -652 da região promotora do gene CASP 8 com hepatite C. O Estudo realizado é do tipo caso-controle na população de Belém-Pará. A genotipagem foi feita por PCR-SSP e a eletroforese em gel e acrilamida a 10%. A análise estatística foi realizada através o programa BioEstat 5.0. A frequência do alelo CASP8* 6N ins foi de 0,55 e 0,62 em controles e pacientes, respectivamente. Não houve associação (OR=1,26; IC95% 0,89-1,78). Contudo este estudo abre novas perspectivas para estudo relacionando polimorfismos o gene CASP8 com a evolução clínica da Hepatite C associado com fibrose e CHC, visto que a revisão feita da literatura mostra que a incidência de CHC e de fibrose mais severa e cirrose se correlacionam com a frequência do alelo CASP8*6N INS.

1 INTRODUÇÃO

1.1. O FÍGADO

O fígado (Figura 1) é o maior órgão do corpo humano representando 2,5 a 4,5% da massa corporal total com um peso médio de 1500g. É um órgão muito complexo que realiza várias funções vitais essenciais à manutenção da homeostasia corporal (NUNES & Moreira, 2007).

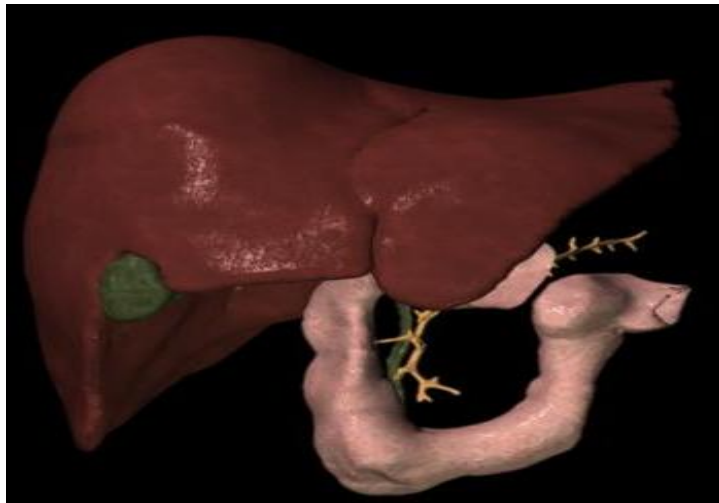


Figura 1: O Fígado. Fonte: Adaptado de Merck Sharp & Dohme – Modelo anatômico 3D, 2009

O tecido hepático é constituído por formações diminutas que recebem o nome de lobos hepáticos (Figura 2), compostos por colunas de células hepáticas ou hepatócitos. Os **hepatócitos** são as células mais importantes do fígado constituindo cerca de 2/3 da sua massa, rodeados por canais diminutos (canalículos). Estes canais se unem para formar o ducto hepático que, junto com o ducto procedente da vesícula biliar, forma o ducto comum da bile, que descarrega seu conteúdo no duodeno (NUNES & Moreira, 2007).

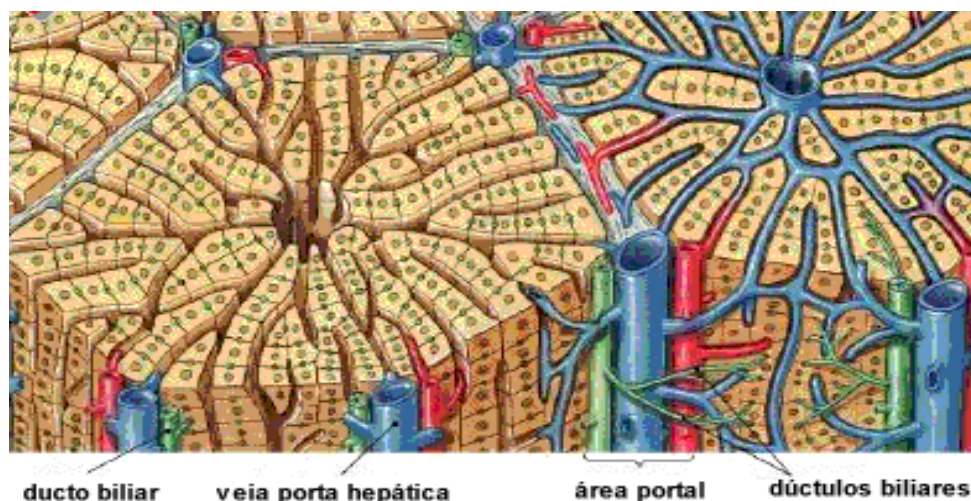


Figura 2: Lóbulos Hepáticos. Fonte: Adaptado de Hepcentro, 2004

Para além dos hepatócitos, das células endoteliais fenestradas e dos componentes biliares, existem outros tipos de células (Figura 3) no espaço de Disse: células de Kupffer (responsáveis pela fagocitose de diversas substâncias) e as células de Ito ou estreladas (papel na fibrose hepática patológica), para além de várias estruturas de suporte (NUNES & Moreira, 2007).

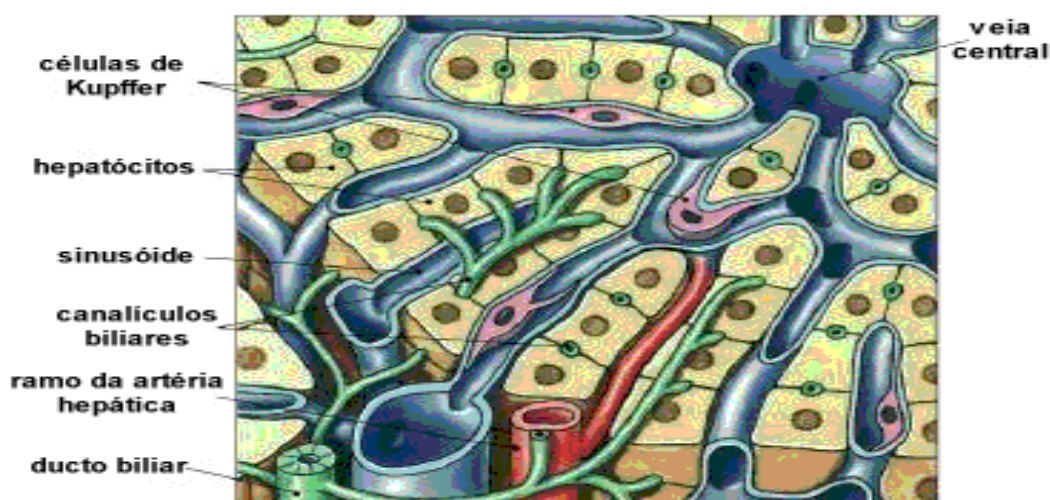


Figura 3: Representação esquemática da histologia hepática. Fonte: Adaptado de Hepcentro, 2004

O fígado está sujeito a uma grande variedade de agentes agressores, é quase inevitavelmente envolvido nas infecções transportadas pelo sangue, quer sistêmicas ou originadas dentro do abdômen. As infecções nas quais a lesão hepática é predominante incluem tuberculose miliar, malária, bacteriemia estafilocócica, salmoneloses, candidíase e amebíase. Porém, as infecções virais são de longe as mais frequentes (CRAWFORD, 2005,).

Dentre todas as doenças do fígado enfatizaremos as hepatites causadas por vírus, pois estas atingem milhões de pessoas no mundo e constituem um grave problema de saúde pública (NUNES & Moreira, 2007; WHO, 2002).

1.2. HEPATITES

Hepatite é um termo genérico que significa inflamação do fígado (WHO, 2002). As hepatites podem ser agudas ou crônicas e possuem inúmeras causas importantes, incluindo infecções virais, doenças auto-imunes, reações a drogas e álcool (STEVENS & LOWE, 2002). O termo “hepatite viral” refere-se ao dano hepático causado por um conjunto de vírus hepatotrópicos: A, B, C, D e E. Agrupados, muitas vezes, como causadores de doença única, em razão da semelhança de suas manifestações clínicas, eles compreendem entidades mórbidas distintas, quanto à etiologia, epidemiologia, evolução, prognóstico e profilaxia (COELHO et al, 2006; PASSOS, 2003).

As hepatites dominam a prática clínica da hepatologia e fazem parte da rotina da clínica médica, devido ao fato de que qualquer agressão ao fígado pode matar hepatócitos e recrutar células inflamatórias, mas também porque as doenças inflamatórias são freqüentemente condições crônicas a longo prazo que devem ser tratadas clinicamente (CRAWFORD, 2005; BLANC et al, 1996).

A infecção com um vírus de hepatite pode nem sempre ser acompanhada de doença clínica, mas há uma gama de manifestações. Após a infecção inicial, os pacientes podem ser enquadrados em um dos padrões listados na Tabela 1 (STEVENS & LOWE, 2002).

Tabela 1: Padrões clínicos pós-hepatite viral. Fonte: Adaptado de STEVENS & LOWE, 2002.

Padrão de Doença	Vírus
Assintomático (frequente em Hepatite A)	A, B, C, D e E
Hepatite aguda sem icterícia (Hepatite anictérica)	A, B, C, D e E
Hepatite aguda com icterícia (Hepatite ictérica)	A, B, C, D e E
Necrose hepática maciça com insuficiência hepática grave (rara)	A, B, C, D e E
Uma das formas de hepatite crônica	B, C e D
Portador crônico	B, C e D

No início da década de 1970, foi possível o diagnóstico das hepatites A e B, tornando-se evidente que existiam hepatites pós-transfusionais, que não podiam ser associadas a esses vírus, denominadas de hepatites NANB (não-A e não-B). Dentre eles, o Vírus da Hepatite C (VHC) foi primeiro identificado por Choo et al., 1989 (SANTOS et al, 2002) e tem se mostrado importante em saúde pública.

1.3. O VÍRUS DA HEPATITE C

O Vírus da Hepatite C (VHC) é classificado como membro da família *Flaviviridae* do gênero *Hepacavirus*. As partículas do vírus (Figura 4) têm um diâmetro de aproximadamente 50nm. Estruturalmente, apresentam moléculas de proteína C, formando o nucleocapsídeo e dois tipos de glicoproteínas denominadas E1 e E2 no envelope viral lipoglicoproteico que reveste o nucleocapsídeo. O seu genoma é constituído por uma molécula de RNA de polaridade positiva que contém aproximadamente 9500 nucleotídeos que codificam as informações para a replicação viral (SANTOS et al, 2002).

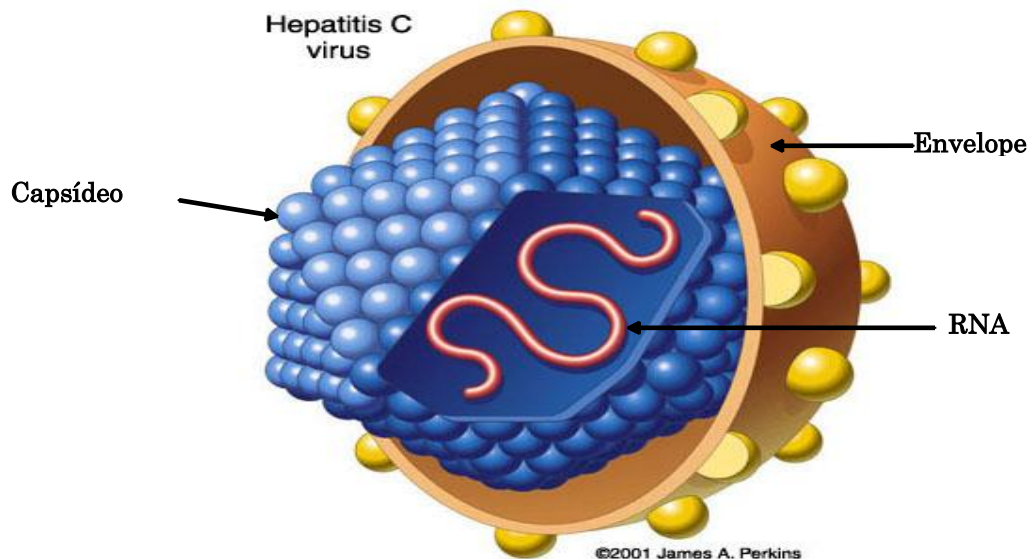


Figura 4: Estrutura morfológica do VHC. Fonte: Adaptado de PERKINS, 2009-online.

Uma das características mais importantes do VHC é a sua heterogeneidade genética (COELHO et al, 2006). A alta variabilidade é decorrente de mutações que ocorrem em seu genoma, quando a enzima RNA polimerase, durante a biosíntese viral, promove erros na etapa de replicação do vírus (AVILA & FERREIRA, 2001).

A elevada taxa de mutação do VHC ($1,44$ a $1,92 \times 10^3$ substituições de nucleotídeos/local no genoma/ano) determina a sua classificação em grupos filogenéticos (ZARIFE et al, 2006). A análise filogenética (Figura 5) das sequências genômicas permitiu a caracterização de seis genótipos numerados de 1 a 6 e pelo menos 30 subtipos, designados por letras minúsculas (RIBEIRO et al, 2007; ZEIN, 2000). Dentro de um mesmo genótipo e subtipo, ainda pode haver variações do VHC, denominadas *quasispecies* (STRAUSS, 2001).

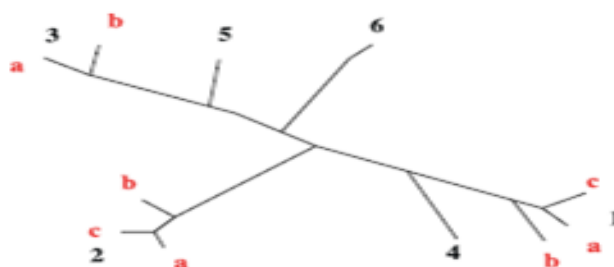


Figura 5: Árvore filogenética de genótipos e subtipos do VHC. Fonte: Adaptado de Francisus, 2006

Outra característica importante do VHC está relacionada com sua habilidade em persistir no hospedeiro. Dados recentes indicam que cerca de 10% das pessoas infectadas são curadas na fase aguda e 90% não eliminam o vírus antes de seis meses, desenvolvendo hepatite crônica com viremia persistente (DI BISCEGLIE & BACON, 1999). Esta persistência viral parece ser resultado da capacidade do VHC mutar rapidamente, dando origem a variantes relacionadas, porém imunologicamente distintas (ALTER, H., 1995).

O papel dos genótipos do VHC na progressão da doença é uma das áreas mais controversas. A identificação dos diferentes genótipos do VHC é importante para estudar a diversidade genética e epidemiológica da infecção, a evolução da doença, compreender sua estrutura genética, as implicações no diagnóstico sorológico e molecular, além de outras investigações que permitem correlacionar estes genótipos à resposta terapêutica e formas de transmissão (AVILA & FERREIRA, 2001). Pensa-se que a heterogeneidade genética do VHC possa esclarecer algumas das diferenças no resultado, na resposta da doença e no tratamento. Sabe-se que o genótipo 1 representa a classe mais agressiva do VHC, e que é menos provável a possibilidade de responder ao tratamento do que o genótipo 2 ou 3 (ZEIN, 2000).

Amoroso et al. (1998) investigaram especificamente o papel dos genótipos do VHC na persistência da infecção. A taxa de evolução à cronicidade depois da exposição aguda era 92% nos pacientes expostos à infecção pelo genótipo 1b, comparada com 33% a 50% em pacientes expostos a outros genótipos. Diversas pesquisas relacionaram o genótipo 1b com a progressão da doença, e associação a uma doença do fígado mais severa e com curso mais agressivo, sendo mais prevalente entre pacientes com cirrose e transplantados hepáticos. A habilidade de evoluir para doença crônica associada aos danos severos ao fígado é a característica mais impressionante do VHC (REZENDE ET AL., 2008).

1.4. HEPATITE C

A Hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo VHC, sendo comumente assintomática, apresentando uma elevada taxa de cronicidade e pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Assim, essa doença é considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo devido à sua alta morbidade e mortalidade (DA SILVA & ROSSETTI, 2001; PASSOS, 1999). Apontada como uma das mais importantes pandemias desse início de século 21, já é responsável pela maioria dos relatos de transplantes de fígado em inúmeros países (TEIXEIRA et al, 2006).

O vírus da hepatite C (VHC) é encontrado em todos os continentes, com distribuição universal (MELLO et al, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS, cerca de 3% da população mundial está infectada pelo VHC, sendo relevante o número de pessoas que desconhecem o fato de serem portadoras do mesmo (KEW ET AL. 2004, THOMSON & FINCH 2005).

O período de incubação é de aproximadamente dois meses, podendo ocorrer hepatite aguda com febre, mal estar, anorexia e icterícia. Muitos pacientes apresentam infecção aguda assintomática. Alguns casos apresentam recuperação após um período aproximado de dois meses; outros apresentarão ALT e AST (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, respectivamente) permanentemente alterados por um ano, desenvolvendo uma hepatite crônica com períodos de recidivas e remissões. Neste ultimo caso metade dos pacientes desenvolverá hepatite crônica ativa, e muitos poderão evoluir para cirrose, com risco de CHC (STEVENS & LOWE, 2002).

Hepatite crônica pode ser definida como uma doença necroinflamatória apresentando persistência do RNA-HCV e elevado índice de aminotransferases por um período superior a seis meses (COELHO et al, 2006; HOOFNAGLE, 1997).

A infecção crônica causa inflamação moderada crônica do fígado. Ciclos de inflamação, necrose e apoptoses levam a um quadro de fibrose hepática, e finalmente culminando com fibrose severa com regeneração nodular, ou seja, cirrose hepática. A velocidade na qual a fibrose progride para cirrose na infecção crônica do VHC é relativamente lenta quando comparada com diversas doenças hepáticas. Fatores que aumentam a velocidade de progressão incluem o sexo, sendo que homens evoluem mais rapidamente; idade ao adquirir a infecção (quanto mais velho pior); duração longa da infecção; imunossupressão; co-infecção com hepatite B, uso moderado ou pesado de álcool e obesidade (WONG & LEE, 2006).

A história natural da hepatite C crônica (HCC) pode ser influenciada por fatores virais, do hospedeiro e do ambiente. Os principais co-fatores determinantes da gravidade da doença conhecidos e estabelecidos podem ser visualizados na Tabela 2 (ALTER & SEEFF, 2000; SEEFF, 2002; ALBERTI & BENVENIGNÚ, 2003).

Tabela 2: Principais co-fatores determinantes da gravidade da HCC. Fonte: Adaptado de ALTER & SEEFF, 2000

Virais	Carga viral, genótipo, multiplicidade das <i>quasispecies</i>
Hospedeiro	Idade, duração da infecção, sexo, susceptibilidade genética, imunodeficiência, co-infecções (HIV e HBV), co-morbidades (hemocromatose, diabetes, obesidade)
Ambientais	Etilismo crônico, dieta, tabagismo, medicamentos, hepatotoxinas e contaminantes ambientais

O mais importante dos fatores do hospedeiro, entretanto, parece ser o seu estado imunológico. Assim, uma resposta imunológica vigorosa pode eliminar o VHC em 15% dos indivíduos que entram em contato com ele, enquanto em pacientes crônicos ou imunossuprimidos a doença evolui mais rapidamente para cirrose e hepatocarcinoma quando comparada aos imunocompetentes (STRAUSS, 2001).

Trabalhos retrospectivos, utilizando hepatites pós-transfusionais, estipularam que o tempo médio (Figura 6) para desenvolvimento de hepatite crônica

variou de 10 a 13 anos, de cirrose 21 anos e de carcinoma hepatocelular de 29 anos (Kiyosawa et al,1990; Tong et al., 1995).

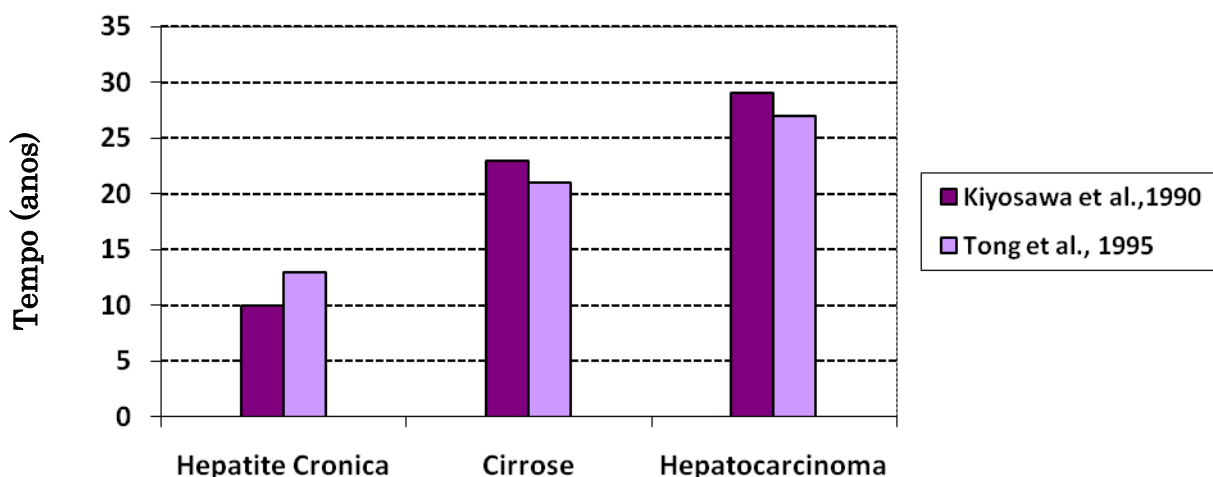


Figura 6: Tempo de evolução em anos, após hepatite pós-transfusional.

Cerca de 60% dos pacientes, após surto agudo da doença, desenvolvem hepatite crônica, cerca de 25% deles assintomática, com ALT normais e alterações histológicas mínimas, assim permanecendo por vários anos, até a sua detecção mediante pesquisa diagnóstica laboratorial apropriada. Existe cura espontânea, após surto agudo da doença, em cerca de 15% dos pacientes portadores de VHC. O prognóstico da doença a longo prazo é mal conhecido, porém admite-se no consenso geral, que a maioria dos pacientes não morre da sua doença hepática (Conte, 2000).

1.4.1. Epidemiologia

Segundo a OMS, estima-se que aproximadamente 3% da população mundial esteja infectada pelo vírus da hepatite C, com distribuição geográfica distinta. Cerca de 170 milhões são portadores crônicos e tem risco de desenvolver cirrose hepática e / ou câncer de fígado.

Estima-se que três a quatro milhões de pessoas são infectadas a cada ano, 70% dos quais irão desenvolver hepatite crônica. O VHC é responsável por 50-

76% dos casos de câncer de fígado, e dois terços de todos os transplantes de fígado no mundo desenvolvido (WHO, 2002).

Estima-se que de 30 a 40 mil novas infecções de VHC ocorram anualmente nos Estados Unidos (CRAWFORD, 2005; ALTER, 1997). Aproximadamente 3,9 milhões de americanos têm anticorpos contra o VHC, sendo que 75% destes, ou 2,7 milhões, têm evidência de infecção crônica conforme determinado pela presença de DNA viral no soro. Isso torna a hepatite C a infecção mais comum transportada pelo sangue, sendo responsável por quase metade dos pacientes americanos com doença hepática crônica. Dos anos 80 para cá, o número de infecções anuais caiu de 150 para 40 mil. Mas o número de pacientes com infecção de longa duração aumentará até 4 vezes até 2015. Por isso, é esperado que a prevalência de doença hepática crônica limitante e o risco de carcinoma hepatocelular aumentem (CRAWFORD, 2005; LACERDA & RAKELA, 1996).

Até o início da década de 90, a hepatite C era a principal causa de hepatite pós-transfusional. O índice de infecção pela via transfusional era superior a 40% em indivíduos politransfundidos, como hemodialisados e hemofílicos (DONAHUE et al. 1992, ALTER, M., 1995, BRUGUERA & TAPIAS 2000).

Atualmente, em países desenvolvidos, como Itália, Espanha e Estados Unidos, o risco de aquisição da hepatite C associado à hemoderivados é estimado em 1:127.000, 1:49.000, 1:200.000 unidades transfundidas de sangue, respectivamente (ALVAREZ et al. 2002, VELATI et al. 2002, CDC 2005). Essa redução se deve além do uso de ensaios imunoenzimáticos mais sensíveis e específicos para detecção de anti-HCV, a implantação de ensaios de detecção do RNA viral em bancos de sangue (Carneiro, 2005).

Lima e Magalhães (1991) estudando a soroprevalência de anti-HCV em doadores de sangue e a associação com vários fatores de risco, mostraram que a faixa etária que apresentou maior prevalência foi a de 30 a 39 anos. Em outro estudo, desenvolvido por Patino-Sarcineli et al. (1991), em doadores de sangue voluntários no Brasil, observou-se que a soro positividade estava fortemente

associada ao sexo masculino, à etnia não-branca e idades mais avançadas, o que provavelmente reflete um longo tempo de exposição à infecção, e baixas condições socioeconômicas (REZENDE, 2008).

De acordo com Stransky e Kyncl (2005), a epidemiologia das infecções pelo VHC tem mudado. Devido ao aumento do número de usuários de drogas injetáveis infectados, de 35% para 60%, e do número de infecções transmitidas pelo contato sexual de 7% para 20% (REZENDE, 2008).

Não se conhece com precisão a prevalência do VHC no nosso país. Há relatos em diversas áreas, sugerindo uma média de 1 a 2% da população em geral (ALVARIZ, 2004 apud FERREIRA; SILVEIRA, 2004), aproximadamente 3 milhões de brasileiros (PASSOS, 1999). Em pesquisa realizada pela Sociedade Brasileira de Hepatologia para analisar a “Epidemiologia do vírus C no Brasil” foi observada prevalência de anti-VHC em pacientes com doenças hematológicas, pré-doadores de sangue e hemodialisados, entre outros (FIGUEIREDO et al, 2003 apud FERREIRA & SILVEIRA, 2004). Resultados preliminares de inquérito nacional de base populacional nas capitais brasileiras, do Ministério da Saúde (MS), tem mostrado uma prevalência de anti-HCV variando entre 0,94 a 1, 89%, na faixa etária compreendida entre 10 a 69 anos de idade (DOU 195, 2007).

Estudos brasileiros demonstraram que a distribuição dos genótipos do VHC foi estatisticamente diferente entre as regiões do Brasil (Figura 7). O genótipo 1 foi o mais freqüente em todas as regiões, entretanto o genótipo 2 foi mais prevalente na região Centro-Oeste. A freqüência do genótipo 3 foi alta na região Sul. Os genótipos 4 e 5 foram raramente isolados e todos os casos encontrados foram na região Sudeste. Este padrão de distribuição foi semelhante ao encontrado na Europa, onde os genótipos 1 e 3, mais prevalentes, tiveram comportamento epidemiológico típico de cepas virais que expandiram espontaneamente nos últimos anos, através das transfusões sanguíneas (PYBUS et al., 2001; CAMPIOTTO et al., 2005).

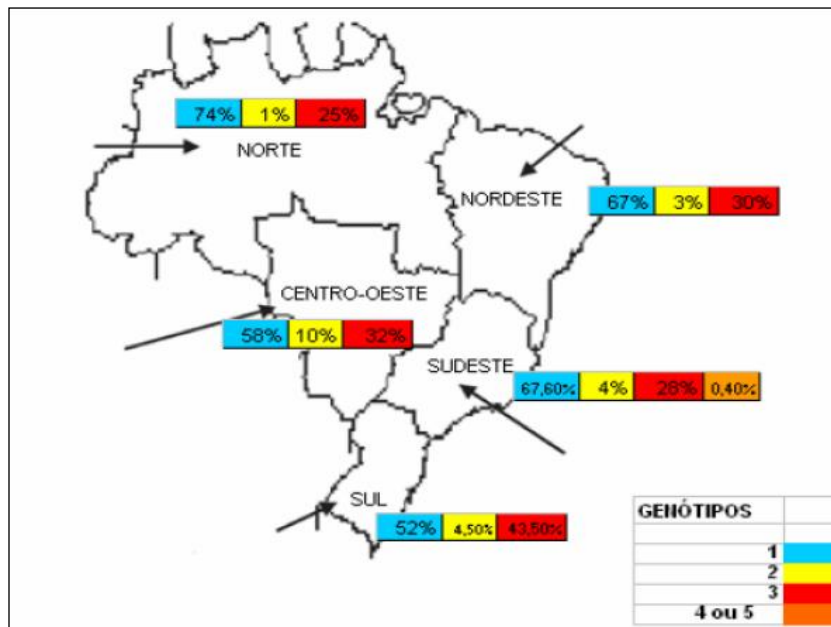


Figura 7: Prevalência dos diferentes genótipos no Brasil Fonte: Adaptado de Campiotto et al., 2005.

Na região Amazônica, não existem dados suficientes sobre a real prevalência da infecção. A maioria dos dados disponíveis sobre soroprevalência da hepatite C é de doadores de sangue, hemofílicos e hemodialisados (BENSABATH & LEÃO, 2007). Os dados atualmente disponíveis apontam para uma alta prevalência da infecção pelo VHC na região, com taxas variáveis entre os diversos estados (FONSECA & BRASIL, 2004).

Atualmente, não existe uma vacina disponível que impeça a infecção pelo VHC. O desenvolvimento da vacina foi dificultado por pelo menos duas propriedades do VHC. Primeiro, existem no mínimo seis genótipos diferentes desse vírus, e cada um com numerosos subtipos. Em segundo, durante a replicação do VHC, as regiões hipervariáveis dentro de genes sofrem mutações constantemente. Essas propriedades permitem que esses vírus escapem da eliminação mediada pelo sistema imune. Aliada a isto, está o fato de que os pacientes que parecem ter eliminado uma infecção aguda por VHC não apresentam proteção imune contra infecções futuras. O VHC continuará a ser uma ameaça importante para a saúde mundial nas décadas futuras (LAI ME et al., 1994; SCHAECHTER, 2002).

1.4.2. TRANSMISSÃO

Estudos demonstram que 75% dos pacientes infectados pelo VHC apresentaram como principal fonte de infecção a via parenteral, seja de forma direta ou indireta. A transmissão via direta estaria provavelmente localizada no ambiente familiar, tendo como principais fatores: a exposição e transmissão por lesões cutâneas e de mucosa ou por compartilharem materiais cortantes; já, a via indireta estaria relacionada com o contato íntimo prolongado ou através de contaminação instrumental e utensílios contaminados com sangue infectado, tais como: procedimentos médicos, odontológicos, de acupunturista, de tatuagem, serviços de manicure e pedicure, entre outros. (REZENDE, 2008).

A transfusão de sangue foi a principal fonte de infecção até que a partir de 1991, a pesquisa de anticorpos reativos para VHC passou a fazer parte da rotina da vigilância do sangue nos hemocentros (SANTOS et al, 2002). No Brasil, a partir de 1993, há obrigatoriedade dos testes sorológicos em candidatos doadores de sangue (STRAUSS, 2001).

Posteriormente foram detectados outros fatores de risco, além da transfusão sanguínea. Gerando assim grupos de risco máximo para a infecção pelo VHC: usuários de drogas endovenosas, pessoas com tatuagens e/ou “piercings”, alcoólatras, portadores de HIV, transplantados, hemodialisados, hemofílicos, presidiários, múltiplos parceiros sexuais e profissionais da área da saúde (CDC, 2002; STITES et al., 2004). Figueiredo e colaboradores, revisando a literatura, encontraram que a frequência do VHC é baixa em profissionais da área de saúde, porém esse grupo pode ser considerado como de risco para contrair a hepatite C.

Em suma, qualquer condição de comportamento ou ocupação que resulte em exposição constante a sangue ou produtos de sangue constitui risco para a aquisição de hepatite C (RACZ & CANDELAS, 2004).

1.4.3. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da hepatite é feito pela avaliação bioquímica da função hepática. Avaliação laboratorial inicial deve incluir: bilirrubina, ALT, AST, fosfatase alcalina, tempo de protrombina, proteína total, albumina, globulina, hemograma e coagulograma (WHO, 2002).

O diagnóstico da hepatite C inicia com a detecção de anticorpos anti-HCV através do teste imunoenzimático ELISA. Entretanto, esse teste não é capaz de confirmar uma infecção ativa do VHC. O teste de ELISA de terceira geração apresenta melhor nível de sensibilidade e especificidade, com este teste, normalmente é possível obter-se resultados positivos a partir da 10ª semana. Ele utiliza proteínas recombinantes (*core*, NS3, NS4, NS5) que tem como função capturar anticorpos anti-HCV circulantes no soro dos pacientes. Essas proteínas são empregadas também no teste denominado imunoblot. Esse teste é complementar ao ELISA e foi desenvolvido para distinguir as reatividades sorológicas específicas das não-específicas encontradas no teste de ELISA (SILVA & ROSSETTI, 2001; COELHO et al, 2006).

Uma das limitações dos ensaios imunológicos está relacionada com a janela imunológica. O período médio de incubação observado para o aparecimento de anticorpos anti-HCV é de 7 a 8 semanas, mas essa faixa pode variar entre 2 e 26 semanas (DI BISCEGLIE, 1998; MARCELLIN, 1999; PAWLITSKY, 1999). Além disso, a simples detecção dos anticorpos não fornece indicações da resposta ao tratamento, já que tendem a continuar por tempo indeterminado, mesmo após a eliminação do vírus (DE-PARIS et al., 2000).

As técnicas de biologia molecular representam ferramentas indispensáveis para confirmar a infecção pelo vírus da hepatite C, estabelecer critérios diagnósticos a partir da identificação do genótipo viral e acompanhar a resposta terapêutica. Basicamente, são utilizadas três técnicas para o diagnóstico molecular: testes qualitativos, os quais informam a presença do RNA viral no soro ou

plasma; testes quantitativos, que detectam a quantidade de RNA viral (ou carga viral) na amostra examinada; e tipagem genética de isolados (ARAÚJO & OLIVEIRA, 2005).

A presença do RNA-HCV é considerada a forma mais confiável e direta de detecção da replicação e infecciosidade viral. Na prática, a detecção qualitativa de RNA do VHC é alcançada através da técnica de RTPCR (*Reverse Transcriptase-PCR*) que consiste na transformação do RNA viral em um DNA complementar (cDNA) que é então utilizado como molde para a amplificação de milhares de cópias da sequência genômica esperada. A detecção de RNA do VHC pela técnica de RT-PCR é de fundamental importância para o diagnóstico da hepatite C, pois detecta com rapidez pequenas quantidades do genoma viral em amostras clínicas. A presença de RNA do VHC pode ser identificada em alguns indivíduos no período de uma ou duas semanas após a infecção. Os testes de genotipagem e quantificação viral devem ser empregados, quando se considera a possibilidade de tratamento com fármacos antivirais (SILVA & ROSSETTI, 2001).

Apesar de o teste ter as desvantagens de alto custo, problemas de transporte e armazenamento das amostras, presença de inibidores da PCR e a possibilidade de contaminação da amostra (ARAÚJO & OLIVEIRA, 2005), esse método permite detectar indivíduos infectados pelo VHC que ainda não desenvolveram anticorpos vírus-específicos, diagnosticar a infecção em neonatos de mães portadoras do vírus, resolver resultados sorológicos indeterminados, monitorar pacientes beneficiados com o tratamento antiviral e identificar o VHC em indivíduos imunossuprimidos (SPECTER, 1999 apud ARAÚJO & OLIVEIRA, 2005).

A biópsia hepática continua sendo o meio mais seguro utilizado no diagnóstico, no estabelecimento do prognóstico e na indicação de terapêutica das hepatites crônicas. O risco de evolução para cirrose está relacionado com o estágio de fibrose e o grau de atividade necro-inflamatória (RIBEIRO, 2004). Histologicamente, o padrão de lesão na hepatite por VHC tem como características a destruição hepatocitária, através de processo imunológico que conduz a uma fibrose progressiva e subversão da arquitetura hepática, culminando com a cirrose.

O processo inflamatório pode ser notado em três localizações distintas: o parênquima hepatocelular, a zona de transição entre os hepatócitos e o espaço-porta (RIBEIRO, 2004).

Dessa forma, a classificação histopatológica das hepatites crônicas varia segundo os seguintes achados: alterações hepáticas mínimas, hepatite crônica discreta, moderada ou intensa e cirrose. Tais alterações histológicas são quantificadas de 0 a 4, para alterações da arquitetura hepática e para atividade inflamatória nas três regiões, parênquima, zona de transição e espaço-porta (RIBEIRO, 2004).

Em pacientes portadores de hepatite viral crônica, a definição precisa do grau de fibrose é de grande relevância para determinar o risco de progressão da doença hepática e decidir pela necessidade de uma terapia antiviral imediata. Tais aspectos são verdadeiramente importantes no caso de pacientes com hepatite viral crônica ou esteatose alcoólica ou não alcoólica que ainda se encontram numa fase compensada em que não há sinais clínicos ou laboratoriais de cirrose. Nesse grupo de pacientes, a biópsia hepática é de grande valor na avaliação da presença, tipo e estágio de fibrose hepática; entretanto, o procedimento é custoso, invasivo e de difícil standardização (SEBASTIANI & ALBERTI, 2006).

A avaliação da fibrose e atividade necro-inflamatória também é importante no que diz respeito ao estabelecimento de terapia antiviral na hepatite C: a realização, nos últimos 24 meses, de biópsia hepática com evidência de atividade necro-inflamatória de moderada a intensa (A2 ou superior pela classificação de Metavir) e/ou fibrose moderada a intensa (F2 ou superior pela classificação de Metavir); além de detecção do RNA-VHC por técnica biomolecular (PCR qualitativo); idade entre 12 e 70 anos; e contagem de plaquetas superior a 50.000/ mm³ e de neutrófilos superior a 1.500/ mm³, são critérios gerais de inclusão na terapia para hepatite viral crônica C (BRASIL, 2007)

A avaliação da fibrose hepática nesta classificação vai dos estágios 0 a 4, sendo 0 ausência de fibrose e 4 a presença de cirrose (TABELA 3).

TABELA 3: Classificação histológica de fibrose hepática – Modelo Metavir. Fonte: Adaptado de POYNARD et al, 2001.

ALTERAÇÃO ARQUITETURAL (FIBROSE)	
F0	Sem fibrose
F1	Fibrose portal sem septos
F2	Fibrose portal com raros septos
F3	Fibrose portal com numeroso septos sem cirrose
F4	Cirrose
ATIVIDADE INFLAMATÓRIA	
A0	Sem atividade
A1	Atividade discreta
A2	Atividade moderada
A3	Atividade severa

1.4.4. TRATAMENTO

O tratamento da hepatite C tem como objetivo primário a supressão sustentada da replicação viral, visando desta forma deter a progressão da doença hepática. A redução da atividade inflamatória costuma impedir a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular, havendo também melhora na qualidade de vida dos pacientes (STRAUSS, 20001).

Ainda não se sabe se esse benefício irá significar, no futuro, cura da hepatite C ou prevenção de cirrose e das suas complicações (hipertensão porta e insuficiência hepática) ou do câncer do fígado. Também não está estabelecido se o tratamento previne a transmissão do vírus da hepatite C para outras pessoas, mesmo em pacientes que tiveram boa resposta ao tratamento (EASL,1999).

Em 1998, foram publicados dois ensaios clínicos envolvendo 1.744 pacientes que mostraram maior taxa de resposta viral sustentada com a terapia combinada de interferon alfa (INF- α) e ribavirina sobre a monoterapia com INF- α (HUTCHINSON,1998), tendo sido constatado maior benefício no tratamento de

pacientes com genótipo 1 por 48 semanas e genótipo não-1 por 24 semanas. Essa conduta foi posteriormente ratificada pelo Consenso Internacional de Paris realizado em 1999 (EASL,1999).

Os medicamentos disponíveis até o momento, entretanto, nos mais diversos esquemas em termos de doses, duração ou associações conseguem atingir os objetivos propostos em menos da metade dos pacientes tratados. A precocidade do diagnóstico nos leva a tratar pacientes freqüentemente assintomáticos, impedindo que quase a metade deles evolua para fases sintomáticas da doença hepática, de mais difícil controle. Além da baixa eficácia terapêutica, os medicamentos disponíveis, a saber, Interferon e Ribavirina, provocam efeitos colaterais importantes e devem ser administrados por período de tempo prolongado, exigindo monitorização médica especializada constante (STRAUSS, 2001).

Uma nova forma de interferon foi desenvolvida, que se chama interferon peguilado ou peginterferon. Consiste em unir uma molécula de polietilenoglicol à molécula de INF- α . Tornando-se maior, o interferon é mais dificilmente metabolizado, dessa forma suas dosagens sanguíneas permaneceriam elevadas por um maior tempo. A atividade biológica do interferon permanece qualitativamente inalterada, porém mais fraca do que a do interferon livre (SSP, 2009), e a sua administração, ao invés de ser três vezes por semana, passa a ser semanal (MANNS, 2001).

1.4.5. IMUNOLOGIA

A primeira linha de defesa contra qualquer agente viral é feita pela resposta inata (Figura8), de forma inespecífica. Essa resposta é mediada por proteínas séricas e receptores de superfície em diversas células, capazes de interagir de forma imediata a agentes invasores como microorganismos ou substâncias estranhas.

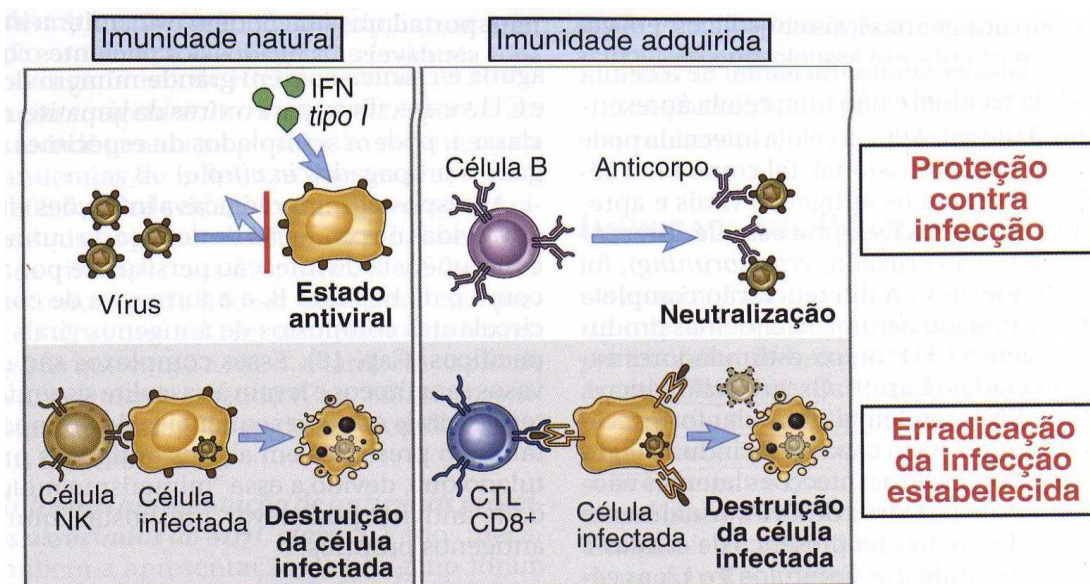


Figura 8: Respostas imunológicas natural e adquirida contra vírus. Fonte: ABBAS, 2008.

As infecções virais agudas são debeladas pela ação do interferon tipo I (INF-I) ou das células NK (*Natural killer*), que são secretadas pela ativação celular (ROITT, I., 1999). A maioria das células infectadas reconhece a cadeia de RNA viral do VHC e responde com a produção de INF-I (α e β). O INF-I tem várias ações antivirais como a expressão de proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) que facilitam o reconhecimento de antígenos virais pelo sistema imune, ativação de células (macrófagos e células NK) com habilidade de destruir células infectadas e inibir diretamente a replicação viral (VISO, 2004).

O VHC tem habilidade de evadir a resposta imune inata incluindo a resposta imune e atividade antiviral dos interferons. Após a infecção pelo VHC, há

produção de altos títulos de anticorpos anti-VHC contra múltiplos epitopos virais que são insuficientes para debelar a permanência do vírus (TAYLOR, 2000). A expressão da região hipervariável NS1/E2 do envelope do VHC estimula os linfócitos B para produção de anticorpos neutralizantes contra o VHC. O vírus sofre pressão seletiva do hospedeiro, o que estimulará a elevada variação nucleotídica e o aparecimento de mutações das proteínas do envelope, resultando no escape aos anticorpos neutralizantes e, conseqüentemente, a cronicidade da doença (VISO, 2004)

As diferentes mutações dão origem às *quasiespécies* do VHC que circulam como uma mistura de variantes imunológicas, sendo que qualquer uma delas pode passar a cepa dominante quando as outras cepas coexistentes são controladas pelo sistema imune (MAJOR, 1997). A alta taxa de mutação do VHC cria oportunidade de seleção de variantes genômicas, o que confere vantagem ou elimina o sítio de reconhecimento da resposta imune. A ação dos anticorpos neutralizantes no controle da infecção do VHC ou sua persistência permanece incerta (VISO, 2004).

Diversas pesquisas apontam a resposta específica ao VHC restrita a MHC classe I, através de LT CD8+ contribuírem para eliminação viral bem como o desenvolvimento de doença hepática na infecção pelo VHC. Embora a resposta celular citotóxica mediada por LT CD8+ tenha, inicialmente o objetivo de eliminar a infecção viral do organismo, sua execução defeituosa é um dos responsáveis pela cronificação da hepatite C (VISO, 2004; PAWLOTSKY, 2004).

Além dos LT CD8+, os LT CD4+ também podem estar envolvidos na lesão viral, mediados pelo aumento da expressão do MHC classe II. Os LT CD4+ ativados são essenciais para a montagem de uma resposta imune duradoura. Essas células liberam citocinas que contribuem para o dano tecidual hepático. Há algumas evidências de que os LT CD4+ poderiam ser diretamente citotóxicos, tal como os LT CD8+ contribuindo então, para a cronificação da doença (MARTINS, 2001).

1.4.6. PATOGENIA

O período de incubação do VHC varia de 5 a 10 semanas, embora tenha sido observado períodos mais curtos (2 semanas) e mais prolongados (4 meses) (PYBUS et al., 2001). Argumenta-se que fatores relacionados ao vírus, como carga viral e genótipo, poderiam influenciar a evolução da hepatite crônica pelo VHC. No entanto, não existe consenso, já que os resultados das pesquisas são divergentes (STRAUSS, 2001).

Várias pesquisas evidenciam uma provável patogênese imunomediada, já que parte dos portadores do VHC não desenvolve doença e alguns autores aceitam apenas o mecanismo imunomediado como responsável na lesão pelo VHC (VISO, 2004).

Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo VHC não foram ainda elucidados. A existência de *quasiespecies* e a grande capacidade mutagênica do vírus propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Assim, cerca de 85% dos indivíduos infectados evoluem para a cronicidade. A infecção crônica pelo VHC, além de evoluir lentamente, em anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001).

Nos últimos anos, diferentes pesquisas têm evidenciado que as lesões hepáticas se relacionam aos mecanismos imunomediados. A qualidade da resposta imunológica mediada por células parece ser crucial para a eliminação ou persistência do VHC. Os linfócitos T CD4⁺ apresentam padrões de respostas distintas: Th1 e Th2; com secreção de interleucina 2 e interferon gama, estimulando a resposta anti-viral do hospedeiro e produção de interleucinas 4 e 10, que estimulam a formação de anticorpos e inibem a resposta Th1, respectivamente. O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 seria responsável tanto pela

incapacidade de eliminação do VHC como pela maior ou menor gravidade da lesão hepática (MISSALE et al., 1996).

O VHC infecta os hepatócitos, e não existindo evidências de indução do efeito citopático nestas células, a destruição dos mesmos ocorre devido ao ataque das células T citotóxicas que reconhecem os antígenos virais na superfície destas células. Portanto, os vírus produzem lesões por mecanismos indiretos (imunitários). Linfócitos T CD4⁺ ajudam a promover a maturação do linfócito T CD8⁺, desse modo, as células infectadas são alvos obrigatórios destas células, que reconhecem epítomos via MHC I, e destroem-nas por indução de apoptose. O vírus interage igual, direta ou indiretamente com o sistema linfóide, causando desordem linfoproliferativa incluindo crioglobulinemia e autoimunidade. Por todo este conjunto, a célula pode ser lesada e morta mesmo que o vírus não tenha efeito citopático. A destruição da célula infectada é indispensável para a erradicação da infecção, já que os anticorpos só podem neutralizar os vírus ou opsonizá-los, se os encontrarem livres na circulação, o que acontece somente quando a célula infectada é destruída (BRASILEIRO FILHO, 2006).

A apoptose representa defesa do hospedeiro contra a infecção viral pela qual a morte da célula infectada previne a disseminação do vírus (PAROLIN & REASON, 2001). Por outro lado a lesão hepatocelular se faz pelo reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição. A dinâmica desse processo mostra-se extremamente variável, fazendo com que a reação necro-inflamatória do fígado tenha diferentes intensidades. Admite-se que o processo inflamatório contínuo e ineficiente, em termos de eliminação total dos vírus, constitui o principal responsável pela fibrose (STRAUSS, 2001). A presença de corpos apoptóticos em espécimes de biopsia hepática de portadores de hepatites virais é achado comum e ilustra a participação da apoptose como mecanismo de morte celular nessas infecções (PAROLIN & REASON, 2001).

Durante a infecção viral o principal mecanismo efetor de morte das células infectadas pelo vírus é mediado pelos linfócitos T citotóxicos e células NK (PAROLIN & REASON, 2001). Em condições patológicas, o grande número de

células que sofre apoptose pode suplantar a capacidade fagocitária do fígado. Nessas circunstâncias, os corpos apoptóticos não-fagocitados sofrem processo secundário de necrose, com resposta inflamatória. Portanto, nessas circunstâncias, a elevação dos níveis séricos de aminotransferases pode ser observada, refletindo tanto aumento da apoptose, como necrose hepatocelular (PATEL & GORES, 1998).

O vírus da hepatite C pode modular a apoptose em diferentes etapas. Vários estudos têm demonstrado que a proteína cerne deste vírus pode ligar-se à cadeia de morte do receptor do FNT-1, aumentando a sensibilidade da célula à apoptose induzida por esta citocina (Patel & Gores, 1998). A patogênese do VHC não está ainda bem caracterizada. Resta saber se o vírus tem efeito citopático direto ou não, além de uma explicação aceitável para a sua persistência e replicação tecidual hepática (CONTE, 2000).

1.5. PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA

Embora o VHC seja responsável pela maioria dos casos de doença hepática crônica na Amazônia Oriental, são escassos os dados sobre resposta terapêutica da doença, não havendo ainda, estudos que demonstrem a resposta ao tratamento antiviral dos pacientes com hepatite C crônica e associação com outros fatores do hospedeiro, como os genéticos.

Neste contexto, diversos estudos enfocando a importância da genética do hospedeiro na predisposição à infecção e na evolução desta tem sido conduzido. A variabilidade de respostas a infecção viral pode ser melhor elucidada a partir da associação com fatores genéticos do hospedeiro, possibilitando o entendimento dos mecanismos de evolução e resposta ao tratamento. Tem-se descrito a associação entre o polimorfismo e evolução favorável da infecção pelo VHC. Além disso, polimorfismos de genes KIR estão associados com a eliminação espontânea do VHC (KHAKOO ET AL, 2004; MONTES-CANO, 2005).

Estudos da apoptose são fundamentais não só para compreensão dos fenômenos biológicos e fisiopatológicos, mas também para delinear estratégias terapêuticas adequadas. A fibrose é um dos mecanismos em que o controle da apoptose pode vir a revelar-se essencial quer na fisiopatologia quer como alvo terapêutico condicionando o destino da célula estrelada ativada (TIMR, 2003). Em muitos modelos de lesão hepática, a inibição das caspases freqüentemente impede a apoptose (PAROLIN, 2001).

Um gene candidato para esse estudo é o gene CASP 8, o qual está envolvido nos processos apoptóticos (SUN et al.,2007). O que faz com que as caspases sejam alvos atraentes para uma estratégia farmacológica, quando, na patogênese da doença, o processo de apoptose esteja envolvido.

1.5.1. O GENE CASP8

A caspase 8 é codificada pelo gene CASP8, localizado no braço longo do cromossomo 2 na posição 2q33 (Figura 9). A deleção de seis nucleotídeos na posição -652 no promotor desse gene (-652 6N del) destrói o sitio de ligação da proteína 1 diminuindo a transcrição do gene. Essa mutação já foi descrita na literatura em associação com vários tipos de câncer, reduzindo a susceptibilidade de formar alelo-dose dependente para câncer de pulmão, gástrico, esofageal, colorectal, cervical e de mama (Sun et al, 2007).

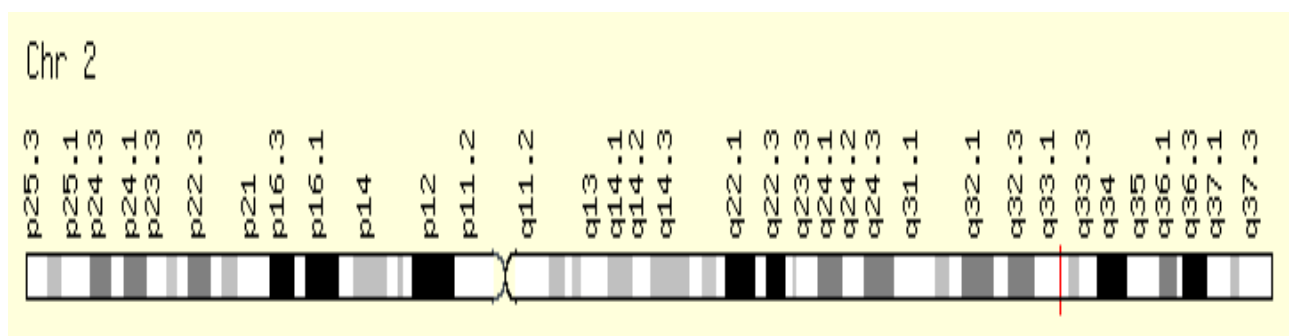


Figura 9: Localização do gene CASP 8 Fonte: Gene Cards, 2009

Por outro lado, estudos em famílias humanas com deficiência genética herdada da protease caspase 8 revelou que indivíduos homozigotos manifestam defeitos na apoptose de linfócitos e na homeostase. (CHUN et al, 2002). Defeitos na apoptose também estão relacionados com diversas doenças hepatobiliares, representando um mecanismo de lesão tecidual (PAROLIN, 2001). Indivíduos afetados e com síndromes proliferativas autoimune também tem defeitos na ativação de linfócitos T, B e células NK que determina a imunodeficiência (CHUN et al, 2002).

A deficiência da caspase8 em humanos é compatível com o desenvolvimento normal e mostra que essa protease tem um papel pós-natal na ativação de linfócitos imaturos (CHUN et al, 2002).

1.5.2. CASPASES E APOPTOSE

A apoptose ou morte celular programada, muitas vezes é um benefício para o organismo, servindo como um mecanismo de defesa. A célula recebe um sinal para se autodestruir, mas sem causar inflamação.

A maquinaria intracelular responsável pela apoptose parece ser semelhante em todas as células animais. Esta família depende de uma família de proteases denominadas *Caspases*. Estas apresentam uma cisteína no sítio ativo e cliva suas proteínas-alvo em ácido aspártico específico. As caspases são sintetizadas na célula com um precursor inativo, ou *procaspases*, os quais são normalmente ativados pela clivagem do ácido aspártico por outras caspases (Figura 10-A). Uma vez ativada, as caspases clivam e então ativam outras procaspases, resultando em uma cascata de amplificação proteolítica (ALBERTS et al, 2002; Figura 10-B).

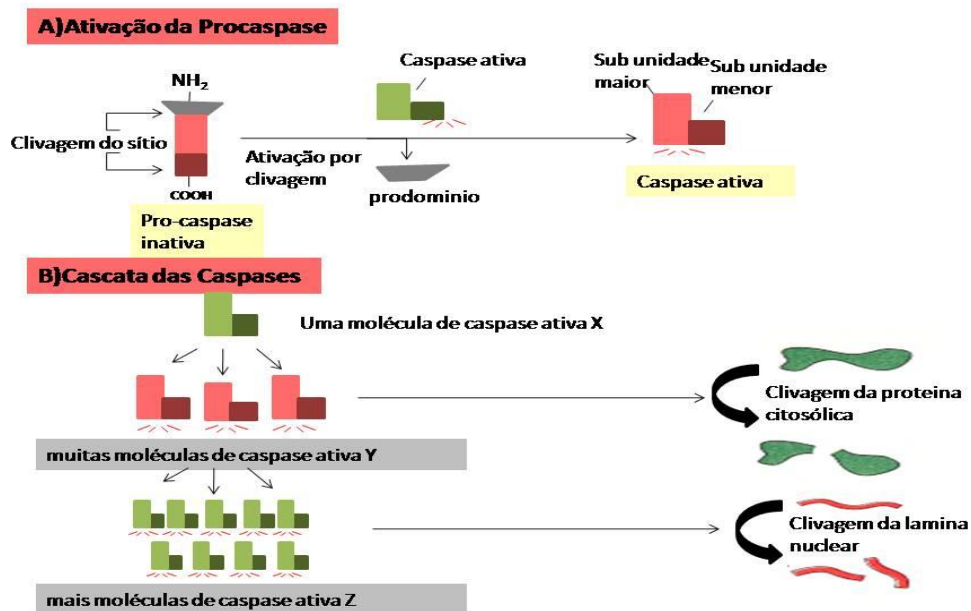


Figura 10: Cascata de caspase envolvida na apoptose.(A) Ativação das procaspases;(B) Cascata as caspases. Fonte: Adaptado de ALBERTS et al, 2002

A ativação é desencadeada por proteínas adaptadoras que fazem com que múltiplas cópias de procaspases específicas, conhecidas como *procaspases iniciadoras*, se unam firmemente, em um complexo ou agregado. São dotadas de uma pequena atividade de protease, quando são forçadas a entrar no complexo, sua proximidade faz com que uma clive a outra, desencadeando sua mútua ativação. Em outros casos, a agregação causa uma mudança conformacional que ativa as procaspases. Dentro de momentos, a caspase, ativa no topo da cascata, cliva a próxima procaspase para estimular o sinal de morte, que se estende para toda a célula (ALBERTS, et al., 2002; Figura 6-B).

A ativação da via de morte intracelular, como a entrada em um novo estágio do ciclo celular, é normalmente desencadeada por um modelo totalmente tudo-ou-nada. A cascata de protease não é somente destrutiva e auto-estimulada, mas também irreversível (ALBERTS et al., 2002).

A ativação da procaspase pode ser desencadeada de fora da célula por uma ativação dos receptores da morte na superfície da célula (Figura 11). Os linfócitos assassinos, por exemplo, podem induzir apoptose pela produção de uma proteína denominada *ligante Fas* (Fas L), que liga o receptor de morte da proteína Fas a superfície da célula alvo. O agrupamento da proteína Fas recruta os adaptadores de proteínas intracelulares que ligam e agregam moléculas

procaspase-8, que clivam e ativam as próximas procaspases, para induzirem apoptose. Algumas células estressadas ou danificadas matam a si mesmas produzindo ligante Fas e proteínas Fas, desencadeando uma cascata de caspases intracelular (ALBERTS et al, 2002).

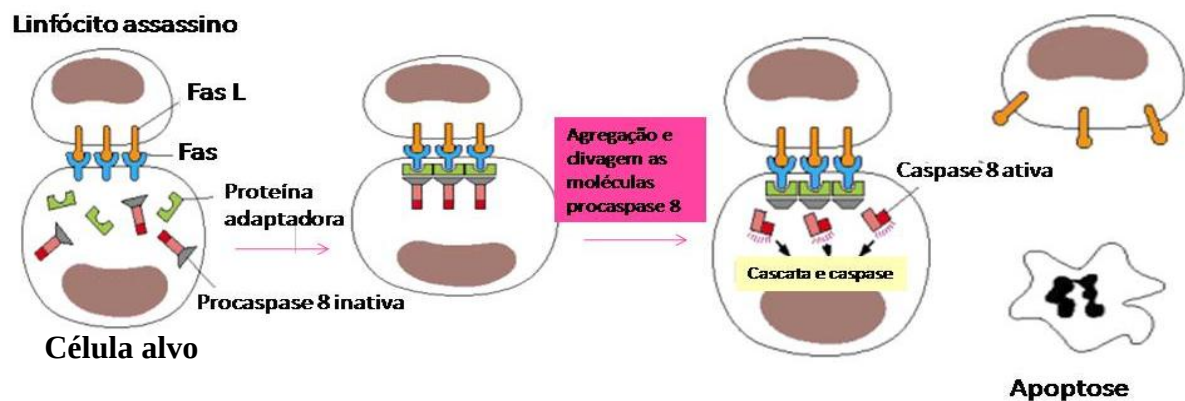


Figura 11: Indução da apoptose via extracelular. Fonte: Adaptado de ALBERTS et al, 2002

As células linfóides e muitos outros tipos celulares expressam Fas. O Fas L é uma proteína homotrimérica de membrana, que é expressa principalmente nos LT depois da ativação pelo antígeno e pela interleucina-2 (IL-2). Quando os LT maduros são repetidamente estimulados por antígenos, eles co-expressam Fas e Fas L.

O Fas liga-se ao Fas L na mesma célula ou nas células adjacentes. Os domínios de morte intracelulares aglomerados ligam-se a uma proteína adaptadora contendo um domínio de morte citosólico FADD (para domínio de morte associado ao Fas). FADD, por sua vez, liga-se ao pró-domínio da caspase-8 que sofre ativação autocatalítica e é capaz de ativar as caspases efetoras e determinar a apoptose (Figura 12). A morte celular induzida por ativação parece ser a mais eficaz para evitar a ativação descontrolada dos linfócitos (ABBAS, 2003).

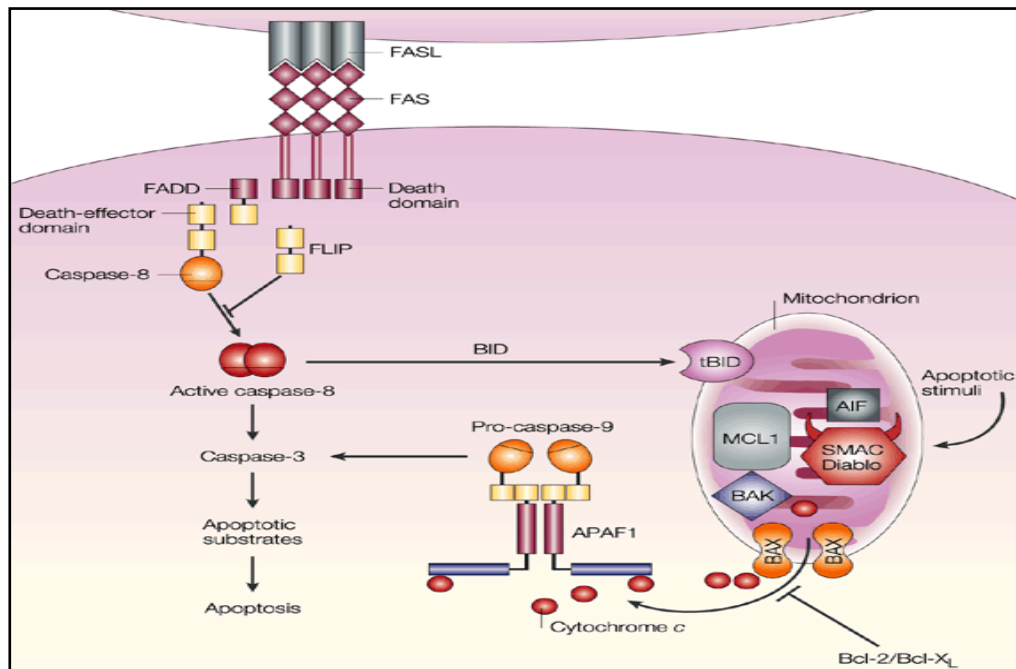


Figura 12: Via apoptótica. Fonte: Revista Nature 2002

O receptor-Fas é expresso em uma variedade de células, incluindo células epiteliais, hematopoiéticas e linfócitos B e T ativados. O padrão de expressão tecidual do ligante Fas é mais restrito, sendo expresso nos linfócitos T maduros CD4⁺ e CD8⁺ e nas células NK ativadas. A expressão simultânea de receptor-Fas e ligante-Fas em linfócitos maduros ativados podem representar mecanismo de autolimitação da resposta imunológica (PATEL, 1995).

A apoptose via sistema Fas tem sido documentada como um dos mecanismos de citotoxicidade pelos quais os linfócitos T citotóxicos induzem à morte dos hepatócitos nas hepatites virais. (Figura 13) No fígado, o receptor-Fas é expresso nos hepatócitos, colangiócitos, células estelares ativadas e células de Kupffer.

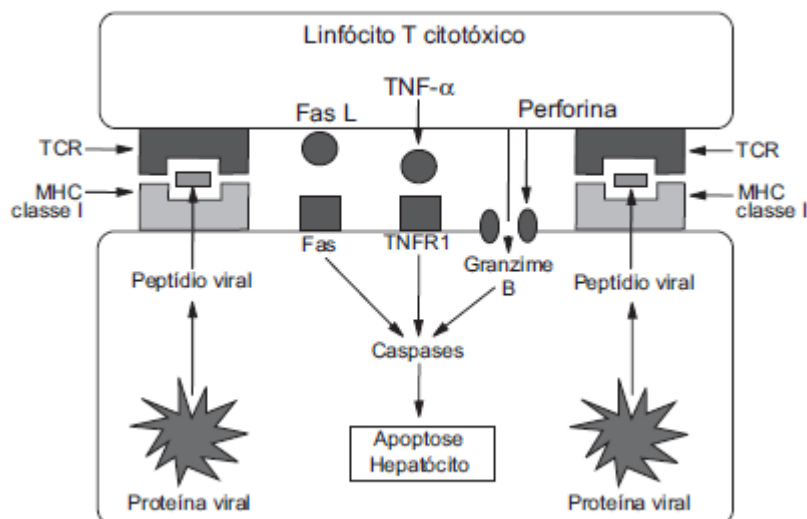


Figura 13: Mecanismo de Morte Celular dos Hepatócitos nas Hepatites Virais.
Fonte: Adaptado de Pessaire et al.

A ativação da caspase-8 via receptor-Fas é importante mecanismo iniciador da apoptose dos hepatócitos em condições fisiológicas e patológicas, sendo de extrema relevância na fisiopatologia de diversas doenças hepáticas. Em condições normais, os hepatócitos expressam baixos níveis de receptores-Fas. Citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-1, ou a presença de estresse oxidativo, que resulta na lesão de DNA e ativação do *p53*, podem aumentar a expressão dos receptores-Fas, tornando as células mais suscetíveis a apoptose pelo sistema Fas. Simultaneamente, o estresse oxidativo aumenta a expressão do ligante-Fas, o que pode levar a processo conhecido como "fratricídio", no qual hepatócitos vizinhos podem se destruir uns aos outros pela indução da apoptose (PAROLIN, 2001).

Recentemente, identificou-se uma expressão significativamente reduzida do receptor-Fas em formas agressivas de hepatocarcinoma, especialmente em tumores pouco diferenciados e que cursam com invasão da veia porta, ou extra capsulares. A perda da expressão do receptor-Fas em tais tumores, provavelmente reflete mecanismo de adaptação para evitar a morte das células tumorais pelo sistema imune (PAROLIN, 2001).

A caspase 8 é uma caspase iniciadora implicada no processo de apoptose. Dado o seu envolvimento em apoptose uma variedade de estudos tem examinado polimorfismos no gene da caspase 8 no que diz respeito ao risco diminuído a diversos tipos de câncer (SERGENTANIS & ECONOMOPOULOS, 2009).

A morte celular por apoptose é um evento comum nas diferentes doenças hepáticas, podendo representar papel importante em sua patogênese. A apoptose representa defesa do hospedeiro contra infecção viral pela qual a morte da célula infectada previne a disseminação do vírus. Sendo assim, as caspases ocupam função de destaque na execução do programa de morte celular. A possibilidade de inibição ou indução farmacológica da apoptose abre grande perspectiva no tratamento das doenças hepatocelulares (PAROLIN, 2001).

1.6. OBJETIVO

1.6.1. OBJETIVO GERAL

Investigar se o polimorfismo ins/del de 6N na posição -652 na região promotora do gene CASP8, relacionado com o processo apoptótico celular, confere risco/proteção para o desenvolvimento da Hepatite C na população de Belém.

1.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar a frequência alélica do polimorfismo -652 6N ins/del no gene CASP8 na população de pacientes com o VHC e na população controle;

-Associar o polimorfismo -652 6N ins/del no gene CASP8 com a Hepatite C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

O Estudo realizado é do tipo caso-controle na população de Belém-Pará, em pacientes procedentes desse ou de outros municípios do Estado.

Foram genotipadas 99 amostras de pacientes, não aparentados, de pacientes de ambos os sexos, sem limites de idade, com diagnóstico de hepatite C, que não apresentam co-infecção, atendidos e regularmente matriculados no Programa de Hepatopatias Crônicas (PHC) do Grupo do Fígado da Santa Casa de Misericórdia do Pará (Grupo do Fígado - FSCM-PA); do Hemocentro do Pará (HEMOPA) e do Laboratório de Virologia da UFPA por intermédio do Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto.

Para a população controle, foram genotipadas 209 amostras de indivíduos aparentemente saudáveis, não aparentados e selecionados randomicamente sendo, portanto, representativos da população de Belém.

2.2. COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras foram obtidas através da coleta de 5mL de sangue periférico em sistema de coleta a vácuo, com EDTA. Seguidamente transportadas ao laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade Federal do Pará, para extração de DNA e genotipagem.

O DNA foi extraído de amostras sangue venoso periférico através do método fenol-clorofórmio (Anexo 1), por meio do protocolo descrito na literatura (Sambrook et al, 1989).

2.3. GENOTIPAGEM

A genotipagem foi feita por PCR-SSP para polimorfismo inserção/deleção de 6 nucleotídeos (AGTAAG) na posição -652 (rs3834129) na região promotora do gene caspase 8 em pacientes e na população controle.

A PCR teve como volume final 15 µl de solução, sendo constituídos de: 8,3 µl de água bidestilada; 1,5 µl de tampão (10X); 1,0 µl de MgCl₂ (50mM); 1,0 µl de dNTP (1,25mM), 1,0 µl de cada *primer* (5,0mM); 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1,0 µL de DNA.

As Sequências 5'-3', dos *primers* utilizados foram: Forward primer 5'-CTGCATGCCAGGAGCTAAGT-3' e Reverse primer 5'-GCCATAGTAATTCTTGCTCTGC-3' de acordo com Sunet al. (2007). A desnaturação inicial é feita a 94°C durante 3min, em seguida 30 ciclos envolvendo desnaturação, hibridização e extensão a 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 1min, respectivamente, e a extensão final acontece a 72°C por 30 min.

2.4. ELETROFORESE

Para visualização do produto de amplificação foi realizada eletroforese em Gel de acrilamida a 10% (Anexo 2) em cuba eletroforética vertical, sendo aplicados 10,0 µL de cada amostra constituídas de 5 µL de azul de bromofenol e 5,0 µL de produto da PCR, homogeneizados. O tempo de migração foi de 12h, com 110V de voltagem. Foram visualizados (Figura 14) dois fragmentos de 171 e 177 pares de bases caracterizado a deleção e a inserção, respectivamente.



Figura 14: Gel de Poliacrilamida 10% corado com Nitrato de Prata e Hidróxido de Sódio. Os números 1, 2 e 3 indicam, respectivamente, indivíduos heterozigotos In/Del (177/171pb), indivíduos homozigotos Del (171pb) e homozigotos In (177 pb).

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise das frequências alélicas entre os grupos foi feita por contagem direta e a comparação entre tais frequências foi feita por Qui-quadrado. Além disso, estimou-se o *Odds Ratio* (OR) com seu intervalo de confiança (IC) de 95% e Teste de Wilcoxon utilizando o programa Bioestat 5.0 (AYRES, 2007).

3. RESULTADOS

As frequências alélicas e genóticas das populações estudadas podem ser observadas na Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4: Frequência alélica em pacientes e controles

In/Del 6N -652	Ins 6N-177pb	Del 6N- 171 pb
Pacientes	0,62	0,38
Controles	0,55	0,44

(OR=1,26; IC95% 0,89-1,78).

Tabela 5: Frequência genotípica em pacientes e controles

In/Del 6N -652	Pacientes [n=99 (%)]	Controles [n=209(%)]
Ins/Ins	33 (33.3%)	55 (26.3%)
Ins/Del	56 (56.7%)	124 (59.3%)
Del/Del	10 (10.0%)	30 (14.4%)

Ao analisar a frequência alélica nas populações estudadas, temos que: a população de pacientes encontra-se em borderline ($\chi^2= 3,797$; $p= 0,0513$) e a população controle não está em equilíbrio de Hardy- Weinberg ($\chi^2= 8,683$; $p=0,0032$). Observou-se também, através da análise da frequência genotípica, um excesso de heterozigotos nas populações.

Neste estudo, não houve associação do polimorfismo Del 6N -652 na região promotora do gene CASP 8 com hepatite C (OR=1,26; IC95% 0,89-1,78). Contudo encontrou-se uma maior frequência do alelo INS (177 pb) na população de pacientes do que na população controle.

4. DISCUSSÃO

A literatura sugere que vários polimorfismos da CASP8 e CASP10 podem estar associados com um risco reduzido de câncer de mama em populações com ancestralidade européia e que o CASP8 e variantes da CASP10 parecem agir conjuntamente (Sun et al, 2007). Os estudos são controversos, alguns estudos demonstram susceptibilidade reduzida, enquanto outros estudos não encontram nenhuma associação. Isso se estende desde estudos caso/controle até estudos com etnias, como por exemplo, em chineses foram publicados resultados totalmente controversos (SUN, 2007; HAIMAN, 2008).

Neste contexto, ressalta-se o carcinoma hepatocelular, uma importante complicação da hepatite C. Se polimorfismos da Caspase 8, particularmente a deleção de 6 pb na região promotora que compromete seus níveis de expressão, estão associados ao câncer, este pode ser um importante fator prognóstico/preditivo na evolução clínica da hepatite C, sendo, portanto importante conhecer as frequências deste polimorfismos na população de Belém e em pacientes com hepatite C.

Sun et al, (2007) identificou um polimorfismo de deleção de seis nucleotídeos na posição -652 (rs3834129) na região promotora do gene da caspase 8 que está associado com um menor risco a diversos tipos de cânceres. Um estudo de meta-análise, feito por Sergeantanis (2009) mostrou a associação do polimorfismo Del 6N -652 associado com o risco reduzido de câncer de mama e concluiu que todos os estudos realizados são de fraca potência, necessitando de um número amostral muito elevado (aproximadamente 28.228 indivíduos). Esse mesmo estudo encontrou associação, porém em borderline.

Sendo que este presente estudo não encontrou associação de tal polimorfismo com Hepatite C. As populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e observa-se um excesso de heterozigotos. Tal resultado pode ser espúrio, visto que não se observou uma tendência a excesso de heterozigotos na literatura (Tabela 6).

Tabela 6: Frequência Observada e Esperada de heterozigotos na literatura.

Referência	Frequência Observada	Frequência Esperada
Gangwar, R 2009	101	97.6
Chunying Li, 2008	440	417.28
Ming Yang, 2008	323	337.86
Sun, 2007	1831	1847.4
Sun, 2007	348	354.5
Sun, 2007	328	323.8
Sun, 2007	142	137.9
Sun, 2007	280	280.8
Sun, 2007	371	370.7
Sun, 2007	102	101.9

Comprando as frequências por teste de Wilcoxon tem-se: $T=27$; $p=0,95$

Contudo a frequência elevada do alelo INS (177 pb) em pacientes, remete que este polimorfismo pode estar relacionado com a evolução clínica da hepatite C, estando associado com a evolução com fibrose para carcinoma hepatocelular e até mesmo com o clearance (cura espontânea) do VHC.

Soung et al. (2004) encontrou que polimorfismos no gene CASP 8 é frequente no carcinoma hepatocelular (CHC), sugerindo que mutações neste gene podem levar à perda da sua função de morte celular e contribuir para a patogênese do CHC. Coincidentemente a incidência de CHC é maior em asiáticos que em europeus, o que se correlaciona com a frequência do alelo CASP8*6N INS, que é mais elevada em pacientes que em controles.

A apoptose também é importante no processo de fibrose hepática e cirrose (STRAUS,2001; PAROLIN,2001), sendo assim observa-se que a frequência do alelo CASP8*6N INS é maior em asiáticos (aproximadamente 80%; Sun 2007), onde também observamos uma incidência maior de fibrose e cirrose.

Assim, o presente estudo descreve pela primeira vez a variabilidade de um importante polimorfismo em Belém e em pacientes com hepatite C na região, além de propor importantes questões para estudos futuros, como a associação destes polimorfismo com fibrose, cirrose e CHC.

5. CONCLUSÃO

Não foi observada associação do polimorfismo ins/del de 6N na posição - 652 na região promotora do gene CASP8 com Hepatite C na população de Belém.

A frequência alélica do polimorfismo CASP8*6N Del é menor em pacientes do que em controles, já o polimorfismo CASP8*6N INS se mostra maior em pacientes do que em controles.

Este achado abre novas perspectivas para estudos, relacionando polimorfismos do gene casp8 com a evolução clínica da Hepatite C associado com a evolução para a fibrose e CHC.

6. REFERÊNCIAS

1. ABBAS, ABUL K.; Lichtman, A. H., Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular** 4 ed. Rio de Janeiro: Reiventer, 2003
2. ALBERTI, A. ; BENVEGNÙ, L. Manegment of Hepatits C. **Journal of Hepatology**, v. 38, suppl. 1, p. 104-118, 2003.
3. ALBERTS, B. JOHNSON, A., WALTER, P., et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4ed. Artmed, 2002. Cap 17, p.1011-113.
4. Alter MJ 1995. Epidemiology of hepatitis C in the West. **Semin Liver Dis** 15: 5-14.
5. ALTER, H. J. To C or not to C: these are the questions. **Blood**, v. 85(7), p. 1681-1695, 1995.
6. ALTER, H. J.; SEEFF, L. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: A perspective on long-term outcome. **Seminar in Liver Diseases**, v. 20. N. 1, p. 17-34, 2000.
7. ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, Suppl.1, p. 62S- 65S, 1997 apud PASSOS, A. D. C. Aspectos Epidemiológicos das Hepatites Virais. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 36, p. 30, jan./mar. 2003.
8. Alvarez M, Oyonarte S, Rodríguez PM, Hernández JM 2002. Estimated risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain. **Transfusion** 2: 994-998.
9. ALVARIZ, F.G. Hepatite C crônica: aspectos clínicos e evolutivos. **Moderna Hepatologia**, v. 30, p.20-32, 2004.
10. ALVARIZ, F.G. Hepatite C Crônica: aspectos clínicos e evolutivos. **Moderna Hepatologia**, Ano 30 - Edição Especial, p 20 – 32, 2004 apud FERREIRA, C.T.; SILVEIRA, T.R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 482, 2004.
11. AMOROSO, P.; RIPICETTA, M.; TOSTI, M.E.; MELE, A.; SPADA, E.; BUONOCORE, S.; et al. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis. C. **J. Hepatol.**, v. 28, p.939-944,1998.
12. ARAÚJO, F.M.G.; OLIVEIRA, G.C. Métodos Diagnósticos Moleculares na Hepatite C Crônica. In: TEIXEIRA, R.; MARTINS FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C. **Hepatite**

- C: Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa.** Belo Horizonte, Coopmed, 2005, 212 p.
13. AVILA, S.L.M.; FERREIRA, A.W. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes.** Ed: Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.
 14. AYRES M.; AYRES Jr M.; AYRES D.L.& SANTOS A.S. **BioEstat. Versão 5.0.** Instituto de Desenvolvimento sustentável Mamirauá. IDSM / MCT / CNPq. Belém, Pará, Brasil. 2007.
 15. BENSABATH, G.; LEÃO, R.N.Q. Epidemiologia na Amazônia Brasileira. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais.** São Paulo: Atheneu, 2007, p.11-26.
 16. BLANC, P.; BORIES, P; MICHEL, H. **Hepatite Viral Crônica: Hepatites Crônicas pelo Vírus C: Diagnóstico Diferencial.** In: COELHO, J. C. U. (editor científico) **Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia.** 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi. 1996. p. 1147.
 17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C.** Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007.
 18. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: patologia.** ed: Editora Guanabara Koogan: Belo Horizonte; 2006.
 19. BRECHOT, C. Hepatitis C virus 1b, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 25(3), p. 772- 774, 1997.
 20. Bruguera M, Tapias JMS 2000. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **Nephrol Dial Transplant** 15: 12-14.
 21. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S 2000. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: **Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification** 40:143-159.
 22. CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO F.J.; SPINELLI, V.; et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.**, v, 38(1), p.41-9, 2005.

23. CARNEIRO, M. A. S. **Estudo Epidemiológico e Molecular da Infecção pelo Vírus da Hepatite C em Pacientes em Hemodiálise no Estado de Goiás.** Tese de doutorado. Goiania. Universidade Federal de Goiás, 2005
24. **CDC.** Guidelines for Viral Hepatitis Surveillance and Case Management. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports, p. 1-43, 2002.
25. **Centers for Disease Control and Prevention** 2005. hepatitis C: training transmission: transfusions/CDC Hepatitis.
26. CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.
27. Chun, H. J.; Zheng, L.; Ahmad, M.; Wang, J.; Speirs, C. K.; Siegel, R. M.; Dale, J. K.; Puck, J.; Davis, J.; Hall, C. G.; Skoda-Smith, S.; Atkinson, T. P.; Straus, S. E.; Lenardo, M. J. : Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. **Nature** 419: 395-399, 2002
28. COELHO, H. S.M et al, Hepatites. Editora Rubio - Rio de Janeiro, 2006
29. CONRY-CANTILENA, C.; VANRADEN, M.; GIBBLE, J.; MELPOLDER, J.; SHAKIL, A.O.; VILADOMIU, L.; CHEUNG, L.; DIBISCEGLIE, A.; HOOFNAGLE, J.; SHIH, J.W. Routes of infection, viremia and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.**, v 334(26), p. 1691-6, 1996.
30. CONTE, V. P. Hepatite Crônica por vírus C. Parte. Considerações gerais. **Gastroenterol V.** 37 - no. 3 - jul./set. 2000
31. CRAWFORD, J. M. **Fígado e Trato Biliar: Doenças Infecciosas.** In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (editores científicos) **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. p. 932- 955.
32. DA SILVA, C.M.D.; ROSSETTI, M.L.R. Hepatite C e Testes diagnósticos. **Caderno de Farmácia**, v. 17(2), p.111-115, 2001.
33. DE-PARIS, F; PEREIRA, F.; AZZULIN, E. Importância dos testes moleculares para acompanhamento da hepatite C e prevalência dos diferentes genótipos

- do vírus da hepatite C em uma população do Rio Grande do Sul. **Caderno de Farmácia**, v.16, n.1, p. 7-11, 2000.
34. DI BISCEGLIE, A.M.D. Hepatitis C. **Lancet**, v. 351, p. 351-355, 1998.
 35. DI BISCEGLIE, A.M.D.; BACON, B.R. The unmet challenges of hepatitis C. **Sci Am.**, v. 281(4), p. 80-85, 1999.
 36. DONAHUE JG, MUNOZ A, NESS PM, BROWN DE, YAWN DH, MCALLISTER HA, REITZ BA, NELSON KE 1992. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. **N Engl J Med** 327: 369-373.
 37. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C - **Paris Consensus Statement**. **J Hepatol** 1999;30:956-61.
 38. FIGUEIREDO E.Q.G., COTRIM H.P., TAVARES-NETO J. Frequência do Vírus da Hepatite C em profissionais da saúde: revisão sistemática da literatura. **GED** 2003; 22(2): 53-60.
 39. FONSECA, J.C.; BRASIL, L.M. Infecção pelo vírus da hepatite C na região Amazônica brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, supl. II, p. 1-8, 2004.
 40. Gayotto, L. C. C.; Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva** 19:137-140, 2000.
 41. Gene Cards an academic web site of the **WEIZMANN INSTITUT OF SCIENCE**. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=Casp8> Acesso em: 05 dez. 2009
 42. GISH, R.G.; AFDHAL, N.H.; DIETERICH, D.T.; REDDY, K.R. Management of hepatitis C virus in special populations: patient and treatment considerations. Clin **Gastroenterol Hepatol.**, v. 3(4), p.311-8, 2005.
 43. HAIMAN CA, GARCIA RR, KOLONEL LN, HENDERSON BE, WU AH, LE MARCHAND L (2008) A promoter polymorphism in the CASP8 gene is not associated with cancer risk. **Nat Genet** 40:259–260 (author reply 260–261)
 44. Hepcentro- Anatomia hepática. Disponível em: <http://www.hepcentro.com.br/anatomia.htm> Acessado em 03 jan. 2010
 45. HOOFNAGLE, J. H. Hepatitis C: The Clinical Spectrum of Disease. **Hepatology**, v. 26, n. S3, p. 15S-20S, set. 1997.

- 46.IV SEFARM Semana farmacêutica. Mini-curso Hepatites virais: Capacitação em vigilância epidemiológica das hepatites virais, PNHV 2005 **Ministério da Saúde**. Votuporanga, São Paulo. UNIFEV, 2006.
- 47.Kew M, François G, Lavanchy D, Margolis H, Damme PV, Grob P, Hallauer J, Shouval D, Leroux-Roels G, Meheus A 2004. Prevention of hepatitis C virus infection. **J Viral Hep** 11: 198-205.
- 48.KHAKOO, S. I.; THIO, C. L.; MARTIN, M. P.; BROOKS, C. R.; GAO, X.; ASTEMBORSKI, J.; CHENG, J.; GOEDERT, J. J.; VLAHOV, D.; HILGARTNER, M.; COX, S.; LITTLE, A.; ALEXANDER, G. J.; CRAMP, M. E.; O'BRIEN, S.J.; ROSEMBERG, W. M. C.; THOMAS, D. L.; CARRINGTON, M. HLA and NK Cell Inhibitory Receptor Genes in Resolving Hepatitis C Virus Infection. **Science**, v. 305, n. 872. 2004.
- 49.Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Nakano Y, Furuta S, Akahane Y, Nishioka K, Purcell RH. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. **Hepatology** 12:671-675, 1990.
- 50.LACERDA, M. A. M. L.; RAKELA, J. **Hepatite Viral Aguda: Hepatite C: Epidemiologia e Patogênese**. In: COELHO, J. C. U. (editor científico) **Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi. 1996. p. 1137
- 51.LAI, M.E.; MAZZOLENI, A.P.; ARGIOLOU, F.; DE VIRGILIS, S.; BALESTRIERI, A.; PURCELL, R.H.; et al. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. **Lancet**, v. 343, p.388-390, 1994.
- 52.LIMA, A.R.; MAGALHAES, V. Hepatite C: revisão da etiologia, epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Bras. Clin Terap.*, v. 20, p.377-408, 1991.
- 53.Major, M.E., Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. **Hepatology** 1997;25:1527-38.
- 54.Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peg-interferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic treatment of chronic hepatitis C:
- 55.MARCELLIN, P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. **Journal of Hepatology**, v. 31, (Suppl.1): 9-15, 1999.

56. Martins, E.B.G. O fígado e o sistema imunológico. In: Gayotto LCC, Alves VAF. **Doenças do fígado e vias biliares** 2001;93-101.
57. McHutchinson JG, Gordon SC, Schiff, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. **N Engl J Med** 1998;339:1458-92.
58. MELLO, L.A.; MELO-JUNIOR, M.R.; ALBUQUERQUE, A.C.C.; COELHO, M.R.C.D. Soroprevalência da hepatite C em pacientes hemodialisados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 290-294, maio-jun. 2007.
59. Merck Shap & Dohme-Modelo anatomico3D. Disponível em: http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/hcp/especialidades/oftalmologia/common/hcp/library/emed_tools/emed_tools_sistema.html Acesso em: 03 jan. 2010
60. MISSALE, G.; BERTONI, R.; LAMONACA, V.; VALLI, A.; MASSARI, M.; MORI, C.; RUMI, M.G.; HOUGHTON, M.; FIACCADORI, F.; FERRARI, C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C vírus infection are associated with different vigor of the antiviral cell-mediated immune response. **J. Clin. Investig.**, v. 98, p.706-714, 1996.
61. MONTELLA, M.; CRISPO, A.; GRIMALDI, M.; ANGELETTI, C.; AMORE, A.; RONGA, D.; SABBATINI, M.; PISANI, A.; SPITERI, D.; SERRAINO, D. Prevalence of hepatitis C vírus infection in different population groups in southern Italy. **Infection**, v. 33, p.9-12, 2005.
62. MONTES-CANO, M.A.; CARO-OLEAS, J.L.; ROMÉRO-GOMEZ, J.M.; DIAGO, M.; ANDRADE, R.; CARMONA, I.; REINA, J.A.; NUNEZ-ROLDAN, A.; ESCRIBANO, M.F. HLA-C and KIR genes in Hepatitis C Vírus Infection. **Human Immunology**, v.66, n.11, p. 1106-1109, 2005.
63. NUNES, P. P.; MOREIRA, A. L. **Fisiologia Hepática**- texto de apoio. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2007
64. PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. **Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares** Arq Gastroenterol.38,nº2,abr./jun. 2001
65. PASSOS, A. D. C. Aspectos Epidemiológicos das Hepatites Virais. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 36, p. 30 - 36, jan./mar. 2003.
66. PASSOS, A.D.C. Doenças emergentes e hepatite C. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, p. 226- 227, 1999.
67. Patel, T.; Gores, G. Apoptosis and hepatobiliary disease. **Hepatology** 1995;21:1725-41.

68. PATIÑO-SARCINELI, F.; et al. Prevalence and risk factors for hepatitis C antibodies in volunteer blood donors in Brasil. *Transfusion*, v. 31, p.138-11, 1991. PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic Test for Hepatitis C. **J Hepatol.**, v. 31, p.71-79, 1999.
69. PAWLOTSKY, J.M. Diagnostic Test for Hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 31 (Supl. 1), p. 71-79, 1999.
70. Pawlotsky, J.M. Pathophysiology of hepatitis C infection and related liver disease. **Trends Microbiol (England)**, Feb 2004;12(2):96-102.
71. PELLICANO, R.; MLADENOVA, I.; DIMITROVA, S.M.; BRUNO, C.M.; SCIACCA, C.; RIZZETTO, M. The epidemiology of hepatitis C vírus infection. An update for clinicians. **Minerva Gastroenterol Dietol.**, v. 50, p.1- 7, 2004.
72. Perkins, J.A. **Medical and Scientific Illustrations**. Board Certified Medical Illustrator Associate Professor of Medical illustration Rochester Institute of Technology. Disponível em: <http://people.rit.edu/japfaa/> Acesso em: 04 dez. 2009
73. Pessayre D, Haouzi D, Fau D, Robin MA, Mansouri A, Berson A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. **J Hepatol** 1999;31:760-70.
74. POYNARD, T.; RATZIU, V.; BENMANOV, Y.; DI MARTINO, V.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C: Detection and Significance. **Seminars in Liver Disease**, v. 20, n. 1, 2000.
75. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS HEPATITE VIRAL C. **Diário Oficial da União**, n. 195, terça-feira, 9 de outubro de 2007.
76. PYBUS, O.G.; CHARLESTON, M.A.; GUPTA, S.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E.C.; HARVEY, P.H. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. **Science**, v. 292, p.2323-2325, 2001.
77. RACZ, M. L.; CANDELAS, J. A. N. **Hepatites Virais**. In: TRABULSI, L. R.; ALTHERTUM, F. (editores científicos) **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 2004, p. 607, 613 - 614.
78. REZENDE, C; MALTA, R. C. G.; CUSTÓDIO, F. L. C; FERREIRA, D. J.; Hepatite C: Inimigo silencioso. **Ciencia e Cultura-Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitario da FEB**, v.3,nº2, Nov. 2008

79. RIBEIRO, L.S.; COELHO, A.M.; PÁDUA, A.F.M.; DIAS, L.L.; AZEVEDO, D.C.; MOURA, F.M.; MENDES, G.S.; MIRANDA, H.C.T.; PROIETTI, F.A. Fibromialgia e Infecção Crônica pelo Vírus da Hepatite C: Ausência de Associação em Duas Amostras. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n. 2, p. 97-105, mar./abr. 2007.
80. RIBEIRO, M. F. G. S. **Fatores prognósticos da evolução da hepatite C**. São Paulo, 2004. 133 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
81. ROBERTSON, B.; MYERS, G.; HOWARDS, C. Classification, nomenclature and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International committee on vírus taxonomy. **Archive of Virology**, v. 143, p.2493-2503, 1998.
82. Roitt I, Brostoff J, Male D. **Imunologia**. São Paulo: Manole 1999;1-12. Introdução ao sistema imune.
83. SAMBROOK J.; FRITCH E.F. & MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, 1989.
84. SANTOS, N.; ROMANOS, M.T.V.; Wigg, M.D. **Introdução à virologia humana**. 1ªed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002
85. SANTOS, R. M, **EDITORIAL**. GE v.10, jan./fev.2003
86. SCHAECHTER, M. **Microbiologia** - mecanismos das doenças infecciosas. Ed: Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.
87. SEBASTIANI, G.; ALBERTI, A. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 23, p. 3682-3694, 2006.
88. SEEFF, L.B. Natural History of chronic Hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5, p. 35-46, 2002.
89. SERGENTANIS TN, ECONOMOPOULOS KP. Association of two CASP8 polymorphisms with breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**. 2009 Jul 24.
90. SILVA, C. M. D.; ROSSETTI, M. L. R Hepatite C e Testes Diagnósticos **Caderno de Farmácia**, v17, n2, p 111-115, 2001
91. SIMMONDS, P.; MELLOR, J.; SAKULDAMRONGPANICH, T.; NUCHAPRAYOON, C.; TANPRASERT, S.; HOLMES, E.C.; SMITH, D.B. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia:

- comparison with classifications based upon sequence similarity. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p.3013-24,1996.
92. SPECTER, S. Viral Hepatitis: diagnosis, therapy, and prevention, 1999 apud ARAÚJO, F.M.G.; OLIVEIRA, G.C. Métodos Diagnósticos Moleculares na Hepatite C Crônica. In: TEIXEIRA, R.; MARTINS FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C. **Hepatite C: Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa**. Belo Horizonte, Coopmed, 2005, 212 p.
 93. SSP- Schering-Plough. Pegintron – **Bula** do Medicamento. Disponível em [:www.pegintron.com.br/bula.asp](http://www.pegintron.com.br/bula.asp). Consulta: 27 nov. 2009
 94. STEVENS,A.; LOWE, J. **Patologia** 2ª ed. Manole, 2002
 95. STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G.; IMBODEN, J. **Imunologia médica**. Ed: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2004.
 96. STRANSKY, J.; KYNCL, J. Has the epidemiology of hepatitis C vírus infections changed? **Klin Mikrobiol Infect Lek.**, v. 11(2), p.62-66, 2005.
 97. STRAUSS,E. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 34(1):69-82, jan-fev, 2001.
 98. SULKOWSKI, M.S.; THOMAS, D.L. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection in injection drug users: implications for treatment. **Clin Infect Dis.**, v. 40(S.5), p.263-9, 2005.
 99. SUN T, GAO Y, TAN W, MA S, SHI Y, YAO J, GUO Y, YANG M, ZHANG X, ZHANG Q, ZENG C, LIN D. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers. **Nat Genet.** 39:605-13, 2007.
 100. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor- 5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. **Hepatology** 2003; 37: 87-95.
 101. Taylor, D.R., Shia ST, Lai MMC. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes and Infection** 2000;2:1743-1756.
 102. TEIXEIRA, R.; MARTINS FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C. HEPATITE C: ASPECTOS CRÍTICOS DE UMA EPIDEMIA SILENCIOSA. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 1761-1765, ago. 2006.

103. Thomson BJ, Finch RG 2005. Hepatitis C virus infection. **Clin Microbiol Infect** 11: 86-94.
104. Tong M. J., El-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion- associated hepatitis C. New England **Journal of Medicine** 332:1463-1466, 1995.
105. Velati C, Romano L, Baruffi L, Pappalettera M, Carreri V, Zanetti AR 2002. Residual risk of transfusion-transmitted HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy. **Transfusion** 42: 989-993;
106. VISO, A. T. R. **Resposta Imune ao Vírus da Hepatite C e Características Genéticas Determinantes**. II Congresso da Sociedade paulista de infectologia para manuseio e Terapia da Hepatite C, 2004
107. WASLEY, A.; ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis.**, v. 20(1), p.1-16, 200.
108. WHO. Hepatitis C. World Health Organization. Global Alert and Response (GAR) 2002. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index.html>
Acesso em: 03 dez. 2009
109. WONG, T.; LEE, S.S. Hepatitis C: a review for primary care physicians. **CMAJ**, v. 174, p.649-659, fev. 2006.
110. ZARIFE, M.A.S; OLIVEIRA, E.C.P.; ROMEU, J.M.S.L.; REIS, M.G. Detecção do genótipo 4 do vírus da hepatite C em Salvador, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 6, p. 567-569, nov./dez. 2006.
111. ZEIN NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. **Clin Microbiol Rev** 2000;**13**(2):223-235.
112. ZEIN, N.N.; RAKELA, J.; KRAWITT, E.L.; REDDY, K.R.; TOMINAGA, T.; PERSING, D.H. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. **Ann Intern Med.**, v. 125(8), p. 634-9, 1996

ANEXO 1

EXTRAÇÃO DE DNA

I- LISE DE HEMÁCIAS

- Descongelar as amostras
- Centrifugar 1 minuto a 3.000 rpm.
- Adicionar 10 ml de Lise de Hemácias
- Agitar por 10 minutos
- Centrifugar por 20 minutos a 2.000 rpm (em cada etapa de lavagem) ou 500G por 10 minutos
- Retirar o sobrenadante com uma pipeta observando o não desprendimento do *pellet*.
- Repetir 3x até que as hemácias tenham sido eliminadas.

II- LISE DE LEUCÓCITOS

- Acrescentar ao *pellet* de células, 1,5ml de solução de lise de leucócitos
 - Desfazer completamente o *pellet* de células
 - Banho-Maria a 55°C por 30 minutos
- OBS:** Caso seja necessário pode-se interromper essa etapa por 24h.
- Adicionar 600 µL de solução de precipitação de proteínas (Acetato de Amônio)
 - Banho- Maria a 55°C por 30 minutos.

III-FENOL/CLOROFÓRMIO/ISOPROPANOL

- Centrifugar a 5.000G por 10 minutos
 - Transferir sobrenadante para outro tubo Falcon (15ml)
 - Adicionar 750 µL de clorofórmio e 750 µL de fenol saturado
- OBS:** Descartar a ponteira com fenol em descarte apropriado
- Agitar por 10 minutos. Centrifugar a 3.500 rpm por 20 minutos
 - Transferir sobrenadante para outro tubo Falcon (15ml)
 - Acrescentar 1,5 ml de solução Clorofórmio/Isopropanol (proporção 24:1)

- Agitar por 10 minutos. Centrifugar a 3.500 rpm por 20 minutos
- Transferir sobrenadante para outro tubo Falcon (15ml)
- Acrescentar 2,4 ml de Isopropanol e agitar por inversão até o aparecimento da “nuvem” de DNA.
- Centrifugar a 3.500 rpm por 10 minutos
- Desprezar sobrenadante (com pipeta) e deixar secar por 30 minutos.
- Hidratar com água autoclavada proporcionalmente à quantidade de DNA
- Transferir para tubos 2,0 ml ou 1,5 ml.

PREPARO DE SOLUÇÕES

Lise de Hemácias

Cloreto de Amonio	6,03g
EDTA	4,16g
Bicarbonato de Amonio	0,44g
Completar para 1 000 ml com Água destilada.	

Lise de Leucócitos

Tris- HCl	1,210g
EDTA	0,744g
Cloreto de Sódio	1,172g
SDS	0,5g
B- Mercaptoetanol	200 µL
Completar para 1 000 ml com Água destilada.	

Precipitação de Proteínas

Acetato de amônio	23,12g
Completar para 1 000 ml com Água destilada.	

ANEXO 2

ELETROFORESE

1. Gel de Acrilamida 10%

Água destilada	35 mL
TEB 10X	5 mL
Acrilamida 40% (Amresco)	10 mL
Persulfato de amônia (APS)	250 µL
Temed	50 µL

2. Tampão TEB 10X

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA	9.8 g
Água ultra-pura q.s.p	1000 mL
Ajustar o pH para 8.6	
Água destilada	100 MI