



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
(PPGMEDTROP)**

LUÍS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI SETTE

**OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO OCULTA PELOS VÍRUS DAS
HEPATITES B E C EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS E
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Recife-PE

2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

LUÍS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI SETTE

OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO OCULTA PELOS VÍRUS DAS
HEPATITES B E C EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS E
COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

Tese de Doutorado apresentada à banca avaliadora do
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito para obtenção do
título de Doutor em Medicina Tropical

Orientador

**Prof.: Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes
Neto**

Professor Associado do Departamento de
Medicina Clínica do CCS/UFPE

Recife - PE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI SETTE

**OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO OCULTA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C
EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS E COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 23/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Coutinho Domingues (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Maria Valente (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr^ª. Andréa Dória Batista (Examinadora Externa)
Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH-HC/UFPE)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Cristina, pelos ensinamentos da vida, carinho, amor e educação.

À minha esposa Cecília pelo companheirismo, amor e carinho incondicionais.

Aos meus filhos Felipe, Eduardo e Rodrigo, para os quais tudo faço na vida.

Ao meu primo, orientador e amigo, Edmundo, por todos ensinamentos, paciência e generosidade.

À todos os pacientes que em um gesto de altruísmo participaram desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais que sempre se esforçaram ao máximo para ofertar para mim e para meus irmãos a melhor educação, sem faltar carinho e amor.

Agradeço a minha esposa, companheira e amor da minha vida, Cecília, que esteve sempre ao meu lado dando-me suporte e preenchendo em meus filhos o vazio deixado por minha ausência temporária.

Agradeço ao meu primo, amigo e orientador, Edmundo, por todos os ensinamentos, todo o carinho, paciência e estímulo para ser pesquisador e professor. Um verdadeiro exemplo a ser seguido e em quem me espelho como ser humano, médico e educador.

Agradeço à Dra. Lucila Valente, minha professora, colega de profissão e amiga, que sempre se empenhou em manter viva a união da Nefrologia da UFPE, abrindo as portas para mim e para meus colegas de profissão, sempre com muito profissionalismo, gentileza, carinho e educação.

Agradeço a Profa. Norma Lucena, brilhante pesquisadora, que abriu as portas do seu laboratório para mim e que sempre, desde o primeiro contato, tratou-me com enorme respeito e educação. Por quem tenho enorme admiração e carinho e sem a qual esta pesquisa não seria possível.

Agradeço a Sávio Vieira, colega de pós graduação, brilhante e educado, que, com muita paciência e determinação, ensinou-me os mais básicos conceitos e técnicas da pesquisa de bancada. Um verdadeiro exemplo de pesquisador.

Agradeço enormemente a Dra. Nathalia Campelo, aluna de iniciação científica e amiga, que foi o braço forte desta pesquisa. Sempre organizada, dedicada e de bom humor. Agradeço por ter permitido ambiente tranquilo e prazeroso durante as coletas, pelo respeito com os pacientes e pelos ensinamentos.

Agradeço a Daniele Oliveira, pela paciência e competência na coleta das amostras.

A todos os meus professores desde o ensino fundamental até a pós-graduação por me ajudarem a construir o conhecimento que adquiri e a descobrir a ciência e a pesquisa.

Agradeço especialmente a todos os pacientes que disponibilizaram seu tempo para a pesquisa, pela paciência, generosidade e humildade com que colaboraram.

Agradeço a todos os funcionários e colegas médicos dos Ambulatórios de Glomerulopatia e Doença Renal Crônica pelo apoio e suporte.

RESUMO

As infecções ocultas pelos vírus das Hepatite C (IOHCV) e Hepatite B (IOHBV) podem estar relacionadas às manifestações intra e extra hepáticas. Sabe-se que pacientes com doença renal crônica (DRC) em hemodiálise apresentam maior prevalência de infecção pelo HCV e pelo HBV, tanto em suas formas clássicas quanto ocultas. No entanto, não há estudos na literatura que avaliaram a ocorrência da IOHCV e IOHBV em pacientes com DRC pré-diálise (DRCPD). Adicionalmente, foi demonstrado elevada ocorrência de IOHCV em pacientes com glomerulopatias (GP), sugerindo associação etiopatológica entre o vírus e a doença renal. Porém, apenas este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência da IOHCV em pacientes com GP e tem-se advogado que novos estudos sejam feitos com outras populações para que haja melhor entendimento entre a relação da IOHCV com as GP. Os relatos de ocorrência de IOHBV em pacientes com GP também são escassos. Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de IOHCV e IOHBV em pacientes com DRCPD e com GP. Foi realizado estudo transversal entre 2016-17 em pacientes com DRCPD e com GP. Foram incluídos adultos, com acompanhamento > 3 meses e *clearance* de creatinina < 60 mL/min/1.73m² (grupo DRC) e com diagnóstico de GP por biópsia renal com microscopia óptica e imunofluorescência (grupo com GP). Foram excluídos gestantes, puérperas, portadores de GP, pacientes com HBsAg, anti-HCV ou anti-HIV positivo. Pacientes do grupo DRC com GP também foram excluídos. Foram considerados pacientes com IOHCV aqueles que apresentaram anti-HCV negativo e pesquisa do HCV-RNA por PCR negativa no soro, porém positiva no ultracentrifugado plasmático ou em células mononucleares periféricas (PBMC) e IOHBV aqueles HBsAg negativo mas a pesquisa do HBV-DNA por PCR positivo no soro. Foram avaliados 91 pacientes em cada grupo com ocorrência de IOHCV em 16,5% (15/91) do grupo DRC, sendo 14 identificados em PBMC e 1 no ultracentrifugado e de 13,2% (12/91) no grupo de GP, sendo 6 identificados em PBMC's e 6 no ultracentrifugado plasmático. A IOHCV no grupo DRC apresentou maior frequência em pacientes mais velhos ($p=0.002$); com DRC de etiologia multifatorial ($p=0,019$) e com a positividade para anti HBc + Anti-HBs ($p=0,001$). Já no grupo de pacientes com glomerulopatia, a IOHCV apresentou associação com a idade, pacientes mais jovens apresentaram maior probabilidade de apresentar a infecção ($p=0,043$) e com o sexo masculino ($p=0,008$). Os pacientes com Nefropatia por IgA apresentaram a maior frequência de IOHCV (33,3%; 2/6), seguida pela glomerulonefrite membranoproliferativa (25%; 1/4) e da GESF/DLM (16,7%; 5/30). Foram testados com a pesquisa do HBV-DNA por PCR 78 pacientes no grupo com glomerulopatia e 66 no grupo DRC com a ocorrência de

IOHBV em ambos os grupos de 0%. Desta forma, conclui-se que a ocorrência de IOHCV em pacientes com DRCPD e com Glomerulopatia foi elevada. Novos estudos serão necessários para avaliar a influência deste tipo de infecção na transmissibilidade desta virose na DRC e para esclarecer a fisiopatologia da agressão renal provocada pelo HCV e as repercussões do tratamento antiviral sobre a glomerulopatia. Nenhum paciente apresentou IOHBV.

Palavras-Chave: Hepatite C. Insuficiência Renal Crônica. Hepatite B. Glomerulonefrites.

ABSTRACT

Occult Hepatitis C (OHCVI) and Hepatitis B Infections (OHBVI) may be related to intra- and extra-hepatic manifestations. It is known that patients with chronic kidney disease (CKD) on hemodialysis have a higher prevalence of HCV and HBV infection, both in their classic and occult forms. However, there are no studies in the literature that have evaluated the occurrence of OHCVI and OHBVI in patients with pre-dialysis CKD (PDCKD). In addition, it has been demonstrated a high occurrence of OHCVI in patients with glomerulopathies (GP), suggesting an etiopatological association between the virus and renal disease. However, only one study aimed to evaluate the occurrence of OHCVI in patients with GP and it has been advocated that new studies be done with other populations so that there is a better understanding between the relation of OHCVI with GP. Reports of the occurrence of OHBVI in GP patients are also scarce. This study aimed to evaluate the occurrence of OHCVI and OHBVI in patients with PDCKD and GP. A cross-sectional study was conducted between 2016-17 in patients with PDCKD and GP. Adult patients with > 3 months of follow-up and creatinine clearance <60 mL / min / 1.73m² (CKD group) and renal biopsy with optical microscopy and immunofluorescence (GP group) were included. Pregnant women, postpartum women, those with hereditary GP or who were infected with HBV (HBsAg positive), HCV or HIV were excluded. Patients from the CKD group with GP were also excluded. OHCVI was defined when patients were anti- HCV negative and HCV-RNA negative in plasma but positive in the ultracentrifuged plasma or peripheral mononuclear cells (PBMC) and OHBVI when HBsAG was negative in plasma but HBV-DNA positive by PCR. 91 patients in each group were evaluated. OHCVI was present in 16.5% (15/91) of the CKD group, 14 of whom were identified in PBMC and 1 in the ultracentrifugated plasma and 13.2% (12/91) in the GP, 6 in PBMCs and 6 in ultracentrifugated plasma. OHCVI in the CKD group presented higher frequency in older patients ($p = 0.002$); with CKD of multifactorial etiology ($p = 0.019$); with positive for anti-HBs plus anti-HBc ($p = 0.001$). In the GP group IOHCV was associated with age, younger patients were more likely to present infection ($p = 0.043$) and males ($p = 0.008$). Patients with IgA Nephropathy presented the highest frequency of IOHCV (33.3%, 2/6), followed by membranoproliferative glomerulonephritis (25%, 1/4) and FSGS/minimal change disease (16.7%, 5/30). HBV-DNA screening by PCR was tested in 78 patients in the GP group and 66 in the CKD group with the occurrence of IOHBV of 0% in both groups. Therefore the occurrence of IOHCV in patients with PDCKD and GP was high. Further studies will be needed to evaluate the influence of this type of infection on the

transmissibility of this virus in CKD and to clarify the pathophysiology of HCV-induced renal injury and the repercussions of antiviral treatment on glomerulopathy. No patients had IOHBV.

Keywords: Hepatitis C. Chronic Renal Insufficiency. Hepatitis B. Glomerulonephritis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência de infecção oculta pelo HCV(IOHCV) em pacientes em hemodiálise em estudos publicados entre 1995 e 2015.....	21
Tabela 2	Ocorrência de infecção oculta pelo HBV (IOHBV) em pacientes em Hemodiálise em estudos publicados entre 2004 e 2016.....	24
Tabela 1	Distribuição dos parâmetros clínicos de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes com doença renal crônica - HC-UFPE - outubro de 2015 a outubro de 2017.....	60
Tabela 2	Distribuição dos fatores de risco para infecção por hepatites Virais de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes com doença renal crônica - HC-UFPE - outubro de 2015 a outubro de 2017.....	61
Tabela 3	Distribuição dos anticorpos contra o vírus da Hepatite B de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 89 pacientes com doença renal crônica - HC-UFPE - outubro de 2015 a outubro de 2017.....	62
Tabela 1	Distribuição dos parâmetros clínicos de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes Glomerulopatias - HC-UFPE – março 2016 a abril de 2017.....	76
Tabela 2	Distribuição dos fatores de risco para infecção por hepatites Virais de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes com Glomerulopatias - HC-UFPE - março 2016 a abril de 2017.....	78
Tabela 3	Prevalência de Infecção Oculta pelo HCV entre Pacientes com Glomerulopatias Primárias e Secundárias HC-UFPE - março 2016 a abril de 2017.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Celsius
ALT	Alanina aminotransferase
C3	Fração C3 do complemento
ccc	<i>Covalent close circular</i>
CD4	<i>Cluster differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster differentiation 8</i>
cols.	Colaboradores
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxirribunucleotídeos Fosfatados
DRC	Doença Renal Crônica
DRCPD	Doença Renal Crônica Pré-Dialítica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gravidade
GC	Glomerulonefrite Crioglobulinêmica
GGT	Gama Glutamiltransferase
GM	Glomerulonefrite membranosa
GNMP	Glomerulonefrite membranoproliferativa
HBcAg	Antígeno do Core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno de replicação do vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de Superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HC	Hospital das Clínicas
HCL	Ácido Clorídrico
HCV	Vírus da Hepatite C
HD	Hemodiálise
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HR	<i>Hazard Ratio</i>

HRV	Regiões hipervariáveis
IC	Imunocomplexos
IC95%	Intervalo de Confiança
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOHBV	Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B
IOHCV	Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite C
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
M	Molar
m ²	Metro quadrado
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
NS5A	Proteína não estrutural 5A
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
RNA	Ácido ribonucleico
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	Thermus aquaticus polimerase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris-EDTA
TNF	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
V	Volts
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Relação entre as Hepatites Virais e as Glomerulopatias.....	17
2.1.1 GLOMERULOPATIA ASSOCIADA A HEPATITE C.....	17
2.1.2 GLOMERULOPATIA ASSOCIADA A HEPATITE B.....	18
2.2 Hepatites Virais em pacientes com Doença Renal Crônica Pré- Dialise (DRCPD).....	19
2.2.1 HEPATITE C E DRCPD....	19
2.2.2 HEPATITE B E DRCPD.....	22
2.3 INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE C.....	24
2.4 Infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite B	28
3 HIPÓTESES E MODELO TEÓRICO	30
3.1 HIPÓTESES.....	30
3.2 MODELO TEÓRICO.....	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 PRIMÁRIO	32
4.2 SECUNDÁRIOS.....	32
5 MÉTODO	33
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	33
5.2 DESENHO DO ESTUDO.....	33
5.3 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	33
5.3.1 POPULAÇÃO DA PESQUISA E LOCAL DO ESTUDO.....	33
5.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	34
5.3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	34
5.3.4 TIPO DE AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	35
5.3.5 DEFINIÇÃO DE TERMOS, OPERACIONALIZAÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	36
5.3.6 MÉTODOS DE COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS.....	40
5.3.7 QUALIDADE DOS INSTRUMENTOS DE MEDIDA.....	41
5.3.8 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS.....	41
6 RESULTADOS.....	53
6.1 ARTIGO 1	53
6.2 Artigo 2	70
6 Resultados HBV-DNA.....	84
7 CONCLUSÃO	85
APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO PADRONIZADO	86
APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	87
APÊNDICE C- Artigo 1- versão em inglês	90
APÊNDICE D- Artigo 2- versão em inglês.....	112

ANEXO A- APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA 127

1 INTRODUÇÃO

A infecção oculta pelo vírus da hepatite C (IOHCV) é caracterizada pela presença do seu material genético em células mononucleares sanguíneas, no plasma ultracentrifugado ou no tecido hepático, na ausência de anticorpos e do genoma viral no soro não ultracentrifugado. Por sua vez, a infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOHBV) é caracterizada pela ausência do antígeno de superfície (HBsAg) no soro com a identificação do genoma viral (HBV-DNA) no plasma ou no tecido hepático. (RAIMONDO et al., 2007)(CASTILLO et al., 2004).

Foi demonstrado, recentemente, elevada prevalência de IOHCV em pacientes com glomerulopatias não hereditárias, sugerindo associação fisiopatológica entre o vírus e a doença renal (CASTILLO et al., 2014). No entanto, faltam dados na literatura que suportem estes achados e que avaliem a presença da IOHBV em pacientes com glomerulopatias, assim como das infecções ocultas em pacientes com doença renal crônica pré- dialítica (DRCPD) de outras etiologias.

De fato, Castilho e cols., ao analisarem 87 pacientes com diagnóstico de glomerulopatias, identificaram IOHCV em 39% dos pacientes com glomerulopatias não hereditárias, e em 3,8% das hereditárias (CASTILLO et al., 2014). Observaram também que os pacientes com IOHCV apresentaram menores taxas de filtração glomerular e maiores de progressão para doença renal crônica terminal, corroborando o possível papel fisiopatológico e prognóstico do vírus da hepatite C (HCV) na doença glomerular.

Em contraposição, estudo realizado na Alemanha com 834 pacientes com doença renal crônica em hemodiálise e transplantados renais, incluindo pacientes com glomerulopatias, evidenciou IOHCV em menos de 1% dos pacientes, sugerindo que esta forma de infecção apresenta frequência baixa nesta população (BAID-AGRAWAL et al., 2014). Os autores sugeriram que a baixa prevalência encontrada poderia ser decorrente da baixa prevalência de HCV na população da Alemanha que oscila em torno de 0,3%.

A prevalência de IOHBV não é conhecida nos pacientes com glomerulopatias, porém, há relato de um caso na literatura de reativação da IOHBV em paciente com síndrome nefrótica que foi submetido a imunossupressão (DU et al., 2013). Neste caso, antígenos virais foram demonstrados no tecido renal na ausência de antígenos, anticorpos ou DNA viral no soro, corroborando o possível papel fisiopatológico entre esta infecção oculta e a

glomerulopatia. No entanto, este foi o único caso descrito na literatura e faltam estudos que avaliem a prevalência da IOHBV nestes pacientes.

Embora as infecções ocultas pelos vírus das hepatites B e C possam ser mais frequentes em pacientes com glomerulopatias, os estudos descritos acima não avaliaram a ocorrência desta forma de infecção nos pacientes com doença renal de outras etiologias, podendo este ser um viés de seleção, uma vez que a prevalência de hepatites virais é maior em pacientes com doença renal do que na população geral (BERGMAN et al., 2005) (LEMOS et al., 2008).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência da infecção oculta pelos vírus das hepatites B e C em pacientes com glomerulopatias e em pacientes com DRCPD de outras etiologias.

Desta forma, este estudo poderá contribuir para a identificação de possíveis agentes virais associados às doenças glomerulares e a doença renal crônica, bem como sugerir medidas de prevenção, fatores de risco, formas de rastreamento e terapias específicas para estes pacientes com IOHBV e IOHCV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RELAÇÃO ENTRE AS HEPATITES VIRAIS E AS GLOMERULOPATIAS

Apesar de o fígado ser o principal órgão acometido pelas hepatites virais, as manifestações extra-hepáticas podem ocorrer devido a mecanismos de autoimunidade, tanto induzida pelos vírus quanto pela ação direta destes no tecido, uma vez que seu material genético é encontrado em diversos órgãos, incluindo os rins (RODRÍGUEZ-IÑIGO et al., 2000) (BLACKARD; KEMMER; SHERMAN, 2006). Neste contexto, impõe-se o papel das infecções pelas hepatites virais no acometimento glomerular, onde as hepatites C e B apresentam-se como principais agentes virais causadores de glomerulonefrites.

2.1.1 GLOMERULOPATIA ASSOCIADA A HEPATITE C

A infecção pelo HCV está relacionada a diversas lesões glomerulares. Dentre elas destacam-se a glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) e a glomerulonefrite crioglobulinêmica (GC) (JOHNSON et al., 1993) (LOPES et al., 1999).

A GNMP é a glomerulopatia mais frequentemente relacionada a infecção pelo HCV. Tem como característica a síndrome nefrótica associada a síndrome nefrítica (JOHNSON et al., 1993)(YAMABE et al., 1995) (LOPES et al., 1999). Na biópsia renal, a microscopia óptica revela duplicação da membrana basal glomerular associada a proliferação endocapilar e mesangial, e na imunofluorescência usualmente há depósitos de IgM, IgG e C3 no mesângio e nas alças capilares (MEYERS et al., 2003). Vasculites de pequenos e médios vasos estão presentes quando há o componente crioglobulinêmico associado (ROCCATELLO et al., 2007).

Outras glomerulonefrites relacionadas a infecção pelo HCV foram descritas e incluem a nefropatia pela IgA, glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite pós-infecciosa, microangiopatia trombótica, glomerulosclerose segmentar e focal, glomerulonefrite fibrilar e a imunotactóide (YAMABE et al., 1995) (MARKOWITZ et al., 1998) (SABRY et al., 2005).

Castillo e cols. descreveram a presença da infecção oculta pelo HCV (IOHCV) em pacientes com glomerulopatias mediadas por imunocomplexos, dentre elas as mais prevalentes foram a nefropatia por IgA (50%), nefrite lúpica (47%), glomerulonefrite

membranosa (40%) e glomerulonefrite membranoproliferativa (33%) (CASTILLO et al., 2014). Esta ocorrência da IOHCV nos diferentes subtipos de glomerulonefrites difere do que foi observado na infecção clássica pelo HCV, certamente, pelo menor número de casos pesquisados para IOHCV.

O tratamento da glomerulonefrite associada ao HCV tem como pilares a eliminação da replicação viral, com drogas antivirais de ação direta ou com o uso de ribavirina e interferon, bem como a diminuição da produção e ação tecidual das crioglobulinas, com uso de imunossupressores e plasmaferese (“KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis”, 2012).

2.1.2 GLOMERULOPATIA ASSOCIADA A HEPATITE B

Após identificação do antígeno de superfície HBsAg em 1965, Combes e cols. descreveram, primeiramente em 1971, um caso de glomerulonefrite membranosa (GM) com depósitos de imunocomplexos contendo HBsAg em um paciente de 53 anos (COMBES et al., 1971). Desde então, vários tipos histológicos têm sido associados a infecção pelo HBV como a GNMP e a nefropatia da IgA. No entanto, a GM continua sendo o tipo mais comum (LAI; LAI; TAM, 1989) (JOHNSON; COUSER, 1990) (TAN et al., 2014).

As glomerulopatias associadas ao HBV constituem um grupo de lesões renais mediadas por imunocomplexos (IC). Três diferentes antígenos o HBsAg, HBcAg e HBeAg foram detectados em estudos por imunofluorescência como componentes dos IC (HIROSE et al., 1984)(OHBA et al., 1997).

O mecanismo pelo qual o IC é produzido e depositado no tecido renal ainda é incerto. Duas hipóteses se somam para explicar tal evento. A primeira se refere a formação de IC em decorrência da hepatite aguda e crônica e a outra hipótese se refere a replicação extrahepática do HBV com formação de IC *in situ*. De fato, He e cols. avaliando a presença de HBV-DNA por meio de hibridização *in situ* em 43 biópsias renais de crianças com glomerulonefrite associada ao HBV, observaram a positividade em 41 delas, demonstrando a replicação do vírus no tecido renal (HE et al., 1998). Esses dados foram corroborados por estudo realizado por Lin que avaliou mudanças dinâmicas na detecção do HBV-DNA por hibridização *in situ* nos pacientes com GM associada ao HBV e as associou com progressão da lesão renal, apontando o possível papel fisiopatológico da replicação viral no tecido renal (LIN, 1993).

As manifestações clínicas da GM associada a infecção pelo HBV são variáveis, mas frequentemente se apresentam como síndrome nefrótica, com proteinúria, edema e hipoalbuminemia, associadas a hipertensão arterial sistêmica e disfunção renal, que em geral têm caráter progressivo. Com efeito, estudo realizado em Hong Kong, com 21 pacientes com GM associada a infecção pelo HBV, com acompanhamento médio de 60 meses, revelou que 29% dos pacientes desenvolveram doença renal crônica progressiva e 10% destes apresentaram necessidade de diálise em 5 anos, a despeito do tratamento antiviral (LAI et al., 1991). Em pacientes com proteinúria nefrótica e doença hepática, o prognóstico parece ser ainda pior com cerca de 50% dos pacientes necessitando de diálise em 3 anos (TANG et al., 2005).

O tratamento das glomerulopatias associadas a infecção pelo HBV tem como objetivos o controle da síndrome nefrótica e preservação da função renal, a diminuição da agressão hepática e a erradicação viral. Desta forma, antivirais são preferíveis inicialmente e o uso de imunossupressores para controle da lesão mediada por IC tem sido alvo de controvérsia e deve ser utilizado em casos específicos, devido a possibilidade de aumento da replicação viral (LAI et al., 1990) (PAPATHEODORIDIS G, BUTI M, CORNBERG M, JANSSEN HL, MUTIMER D, POL S, RAIMONDO G, DUSHEIKO G, LOK A, 2009)

2.2 HEPATITES VIRAIS EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA PRÉ- DIALISE (DRCPD)

2.2.1 HEPATITE C E DRCPD

Alguns estudos têm demonstrado que pacientes com DRCPD apresentam maior prevalência de infecção pelo HCV quando comparados a população geral. De fato, Lemos e cols., após avaliarem 1041 pacientes com DRC com taxa de filtração glomerular média de 36 mL/min/1.73m², evidenciaram prevalência de infecção pelo HCV de 3,9%, enquanto que na população geral na cidade do Rio de Janeiro era cerca de 1,4%(LEMOS et al., 2008). Estes dados são corroborados em outras localidades como por exemplo na Itália e nos Estados Unidos.

De certo, estudo realizado por Li Cavoli e cols. evidenciou prevalência desta infecção em 6,25% dentre 320 pacientes com DRC atendidos na região italiana da Sicília, sendo que a prevalência de infecção pelo HCV naquela mesma região era de 3,5% na população sem DRC (LI CAVOLI et al., 2011). Já nos Estados Unidos, no estado do Alabama, Bergman e cols.,

avaliando 396 pacientes incidentes em hemodiálise, encontraram prevalência de infecção pelo HCV em 14,4% dos pacientes, cerca de 7 vezes maior do que na população geral. Estes autores também sugeriram que a infecção pelo HCV aconteceria predominantemente antes do início da hemodiálise uma vez que, após a instituição de medidas de precaução universal e da diminuição da necessidade de hemotransfusão com o uso de drogas estimuladoras da eritropoiese, a contaminação nosocomial se tornou baixa. De fato, este mesmo estudo acompanhou mais de 860 pacientes e encontrou taxa de soro positividade de 2,5% em 5 anos (BERGMAN et al., 2005). Adicionalmente, estudo Japonês avaliando 400 pacientes incidentes em HD revelou prevalência de infecção pelo HCV de 7,3%, ou seja, cerca de 50 vezes maior do que o da população voluntária controle que era de 0,15% (IWASA et al., 2008).

Além da maior prevalência, pacientes infectados pelo HCV apresentam maior chance de desenvolverem DRC. Em 2015, foi publicada metanálise que compilou 9 estudos de coorte e 5 estudos de corte transversal, que avaliou mais de 330 mil pacientes com infecção pelo HCV e mais de 2,6 milhões de indivíduos saudáveis. Neste estudo, houve risco de desenvolvimento de DRC cerca de 23% maior na população infectada pelo HCV quando comparada com a população não infectada (HR =1.23; IC95%: 1.12-1.34) (PARK et al., 2015).

Estes resultados foram corroborados por estudo de coorte realizado em Taiwan, onde foram acompanhados 3182 pacientes infectados pelo HCV, sem fatores tradicionais para desenvolvimento de DRC, e comparados com 15910 controles não infectados pelo vírus. Observou-se risco de desenvolver DRC cerca de 75% maior no grupo infectado quando comparado ao não infectado (HR: 1.75; IC95% 1.25-2.43, $p<0,009$)(CHEN et al., 2013).

Apesar de haver maior associação entre a infecção pelo HCV e o desenvolvimento de DRC não se sabe ao certo quais os mecanismos que levam a esta lesão. Algumas hipóteses foram aventadas para justificar tal associação, tais como: efeito citopático direto do vírus; a imunidade mediada por anticorpos com deposição de imunocomplexos no glomérulo; ativação de receptores *toll like* induzido pelo HCV; maior resistência à insulina, uma vez que as proteínas do core viral inibem a sinalização da insulina com desencadeamento de síndrome metabólica, disfunção endotelial e dano renal; além de aumento do estresse oxidativo induzido pelo vírus com aumento de interleucina-6 e TNF alfa (BARSOUM, 2007). (HARRISON, 2008)(SERFATY; CAPEAU, 2009)

Apesar de não haver estudos avaliando a prevalência de IOHCV em pacientes com DRCPD, algumas pesquisas relatam prevalência aumentada de IOHCV em pacientes em hemodiálise (HD), especialmente naqueles com níveis séricos elevados de aminotransferases como relatado por Barril e cols. Estes autores avaliaram 109 pacientes em HD com elevação de aminotransferases e evidenciaram IOHCV em 45% dos pacientes (BARRIL et al., 2008). Este estudo foi acompanhado por outros onde a prevalência de IOHCV também foi encontrada conforme demonstrado na **Tabela 1** (ABDELRAHIM et al., 2016; BARRIL et al., 2014; BOKHARAEI-SALIM et al., 2011; BOZKURT et al., 2014; CHOI et al., 2013; EL-SHISHTAWY et al., 2015; ESLAMIFAR et al., 2015; NAGHDI et al., 2017; OESTERREICHER et al., 1995; RAHNAVARDI; HOSSEINI MOGHADDAM; ALAVIAN, 2008)

Tabela 1. Ocorrência de infecção oculta pelo HCV(IOHCV) em pacientes em hemodiálise em estudos publicados entre 1995 e 2015 (Adaptado de DOLATIMEHR et al., 2017)

Autores	Ano	País	N pacientes	IOHCV n (%)
Oesterreiche e cols.	1995	Áustria	67	1 (1,75)
Barril e cols.	2008	Espanha	109	49 (45,0)
Choi e cols.	2013	Coreia	77	3 (3,90)
Baid-Agaraw e cols.	2014	Alemanha	417	1 (0,24)
Barril e cols.	2014	Espanha	201	49 (23,3)
Bozukurt e cols.	2014	Turquia	100	3 (3,4)
El Shishtawy e cols.	2015	Egito	51	8 (15,7)
Eslamifar e cols.	2015	Iran	70	0 (0)
Abdelrarim e cols.	2016	Egito	81	3 (3,7)
Anbber e cols.	2016	Egito	93	9 (20)

Em revisão sistemática realizada em 2016, Dolatimehr e cols. avaliaram 10 estudos com total de 1275 pacientes e a ocorrência de IOHCV em pacientes dialíticos variou de 0-45% (DOLATIMEHR et al., 2017). No entanto, estudo realizado na Alemanha por Agrawal e cols., com 417 pacientes em HD revelou prevalência de apenas 0,25%, provavelmente, refletindo a baixa prevalência da infecção pelo HCV na população geral encontrada neste país.

2.2.2 HEPATITE B E DRCPD

De maneira semelhante ao da infecção pelo HCV, pacientes infectados com o HBV apresentam maior risco de desenvolver DRC quando comparados aos não infectados. Em 2014, Chen e cols. avaliaram cerca de 17 mil pacientes infectados com o HBV, ainda sem tratamento, em Taiwan, entre os anos de 1999-2010 e compararam com 70 mil controles pareados. Neste estudo, o risco de desenvolver DRC entre o grupo infectado pelo HBV foi 3.85 vezes maior do que no grupo não infectado (CHEN et al., 2015).

Foi descrito também que cerca de 70% dos pacientes infectados pelo HBV apresentam DRC caracterizada por alterações urinárias ou de função renal conforme descrito por Amet e cols. Neste estudo francês, envolvendo 260 pacientes infectados pelo HBV, foi observado que 38,1% apresentavam proteinúria, 20,6% hematúria e 9% leucocitúria estéril, além de 3,5% portadores de DRC com TFG < 60 mL/min/1.73m² (AMET et al., 2015).

A soroprevalência de infecção pelo HBV é variável no mundo e associa-se a fatores geográficos e sócio econômicos, com íntima relação com a vacinação da população, especialmente quando realizada em estágios iniciais da DRC, quando a eficácia vacinal é mais evidente. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência da infecção pelo HBV varia de cerca de 6,2% em países do Pacífico Ocidental, 3,3% em países do mediterrâneo e 0,7% da população norte-americana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Os dados de prevalência de infecção pelo HBV em pacientes com DRCPD são escassos e de países em desenvolvimento, uma vez que a prevalência desta infecção em países desenvolvidos é baixa. Em estudo Turco realizado com 171 pacientes com DRCPD a prevalência de infecção pelo HBV foi de 10% e pode chegar a 44% em algumas regiões da Índia (SIT et al., 2007) (CHANDRA et al., 2004).

Até o momento, não há dados que avaliem a prevalência da IOHBV em pacientes com DRCPD e ainda não se sabe se a alta prevalência encontrada em alguns pacientes em diálise

pode ser decorrente de infecção prévia. Contudo, vários estudos avaliaram a prevalência desta infecção oculta em pacientes com DRC em HD ou diálise peritoneal. A prevalência de IOHBV em pacientes dialíticos varia no globo em cerca de 3,7% na América do Norte, 4,9% na Índia, de 0-26% na Itália e de 2,7-26,6% na Turquia **TABELA 2** (F. BLAINE HOLLINGER , PEIMAN HABIBOLLAHI , ALI DANESHMAND, 2010) (AGHAKHANI et al., 2010) (ALBUQUERQUE et al., 2012) (HELALY et al., 2015)(MINUK et al., 2004)(FABRIZI et al., 2005)(ALTINDIŞ et al., 2007)(YAKARYILMAZ et al., 2006)(JAIN; NIJHAWAN, 2008)(KONG et al., 2013)(DI STEFANO et al., 2009).

Tabela 2. Ocorrência de infecção oculta pelo HBV (IOHBV) em pacientes em Hemodiálise em estudos publicados entre 2004 e 2016.

Autores	Ano	País	N pacientes	IOHBV n (%)
Minuk, Gy e cols.	2004	Estado Unidos	241	9 (3,7)
Fabrizi, F e cols.	2005	Itália	213	0 (0)
Yakaryilmaz, F e cols.	2006	Turquia	188	5 (2,7)
Altindis, M e cols.	2007	Turquia	153	19 (12,4)
Jain, P	2008	Índia	102	5 (4,9)
Di Stefano, M e cols.	2009	Itália	128	34 (26,6)
Aghakani, A e cols.	2010	Iran	289	9 (3,1)
Albuquerque, A e cols.	2012	Brasil	201	3 (1,5)
Helaly, F e cols.	2016	Egito	100	32 (32)

2.3 INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE C

A prevalência de infecção pelo HCV oscila em torno de 3% da população mundial e se mantem há décadas como um problema de saúde pública. Dados recentes apontam que cerca de 657 mil pessoas estejam cronicamente infectadas pelo HCV no Brasil, no entanto, a prevalência da infecção crônica encontra-se em queda, especialmente, após cerca de 57 mil pacientes terem se beneficiado do tratamento com antivirais de ação direta que apresentam taxas de cura de 95% entre todos os casos tratados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A infecção crônica pelo HCV pode resultar em hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular, sendo esta infecção responsável por cerca de 75% das mortes ocasionadas por hepatites virais (CARREÑO, 2014) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A IOHCV se caracteriza pela presença do HCV-RNA em células mononucleares sanguíneas (PBMC), no plasma ultracentrifugado ou no tecido hepático, na ausência de

anticorpos ou genoma viral no soro (CASTILLO et al., 2004). Esta condição foi primeiramente descrita em pacientes com doença hepática crônica criptogênica que apresentavam marcadores de lesão hepática alterados e anti-HCV e HCV-RNA negativos, mas com material genético presente em amostras de biópsia hepática (CASTILLO et al., 2004). Posteriormente, foi demonstrado que testes não invasivos permitiam a identificação da IOHCV de maneira acurada e esta identificação foi incorporada a definição da IOHCV (BARTOLOME et al., 2007). Dentre os testes não invasivos destacam-se a identificação do HCV-RNA por PCR em PBMC e após ultracentrifugação do soro. Este último tem a capacidade de aumentar a sensibilidade na detecção do HCV-RNA por PCR em oito vezes quando comparados as técnicas de PCR rotineiras (QUIROGA et al., 2009).

O impacto da IOHCV na doença hepática tem sido relatado por diversos autores. Gad e cols. avaliaram 108 pacientes com hepatite crônica criptogênica e identificaram IOHCV por meio de biópsia hepática em 25% destes (GAD et al., 2012). Outros autores, avaliando 69 pacientes com doença hepática crônica de etiologia indeterminada, encontraram IOHCV em 10% dos casos através da identificação do HCV-RNA por PCR em células mononucleares periféricas (BOKHARAEI-SALIM et al., 2011).

Dois estudos reportaram elevada frequência de IOHCV em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Granieri e cols. avaliaram 25 pacientes com DHGNA e identificaram IOHCV em 8 (32%) biópsias hepáticas (GRANIERI et al., 2011). De maneira semelhante, Saad e cols. estudaram 27 indivíduos com DHGNA e detectaram o HCV-RNA na biópsia de 11 pacientes (41%)(SAAD, 2011).

A IOHCV não se restringe ao tecido hepático. De fato, pacientes com doença renal crônica (DRC) em hemodiálise (HD) apresentam prevalência elevada de IOHCV. Em estudo multicêntrico realizado na Espanha, Barril e cols. avaliaram 109 pacientes em HD que apresentavam alanina aminotransferase (ALT) ou gama-glutamilttransferase (GGT) alterados e identificaram 49 (45%) pacientes com HCV-RNA nas (PBMC). Neste mesmo estudo, a presença da IOHCV foi associada a maior mortalidade (39% vs. 20%; $p = 0.031$)(BARRIL et al., 2008). Em contrapartida, Baid-Agrawal cols. demonstraram na Alemanha a presença de IOHCV em apenas 0.25% dos pacientes em HD (BAID-AGRAWAL et al., 2014). Esta diferença na prevalência de IOHCV nos pacientes com DRC pode ser explicada tanto pela prevalência da infecção pelo HCV ser distinta entre os dois países (2% Espanha e 0,3% na Alemanha) quanto pela população estudada, uma vez que Barril e cols. avaliaram pacientes

com enzimas hepáticas alteradas enquanto que no estudo de Baid-Agrawal apenas 15% dos indivíduos apresentavam ALT e gama-GT alteradas.

Castillo e cols., na Espanha, ao analisarem 87 pacientes com diagnóstico de glomerulopatia, identificaram IOHCV em 39% dos pacientes com glomerulopatias não hereditárias quando comparados a 3,8% dos pacientes com glomerulopatias hereditárias. Neste estudo, o diagnóstico da infecção foi realizado por meio da identificação do genoma em PBMC ou por ultracentrifugação. Após 3 anos de seguimento, os níveis séricos de creatinina foram mais elevados e o *clearance* de creatinina reduzidos nos pacientes com IOHCV quando comparados com os indivíduos não infectados ($p = 0,015$ e $0,032$, respectivamente) (CASTILLO et al., 2014).

Outros estudos também revelaram associação entre IOHCV com doenças linfoproliferativas revelando a possível ação extrahepática desta infecção. Pacientes com infecção pelo HIV e usuários de drogas injetáveis também são grupos expostos ao maior risco de IOHCV e, desta forma, transmissibilidade do HCV (EL-SAYED et al., 2006) (YOUSSEF et al., 2012) (SUGDEN et al., 2013) (GATSERELIA et al., 2014).

Alguns estudos têm investigado a possível capacidade de transmissão da forma oculta do HCV. De fato, Cortés-Mancera e cols. descreveram transmissão e persistência de IOHCV em um paciente com cirrose criptogênica submetido a transplante hepático. Este indivíduo, após 10 meses do transplante, apresentou colestase crônica de etiologia indeterminada e foi submetido a novo transplante. O HCV foi identificado no fígado nativo e no primeiro fígado transplantado, com posterior sequenciamento e estudo filogenético, descartando contaminação cruzada (CORTÉS-MANCERA et al., 2010). Roque-Cuellar e cols. detectaram a presença de IOHCV em 13% dos parceiros heterossexuais soronegativos de indivíduos com infecção crônica pelo HCV (ROQUE-CUÉLLAR et al., 2011). A transmissão interfamiliar foi avaliada por Castillo e cols. em 102 membros da família de 50 indivíduos portadores de IOHCV e a positividade para anti-HCV foi de 9.8% (10/102), sugerindo possível transmissão domiciliar do HCV em indivíduos com IOHCV (CASTILLO et al., 2009).

Ainda não são conhecidos os motivos que levam ao desenvolvimento da forma oculta desta infecção. No entanto, estudos genômicos evidenciaram manifestações clínicas distintas em pacientes infectados com diferentes subtipos virais e isto poderia ser consequência da variabilidade genética presente em diferentes cepas de vírus (CHAN et al., 1992).

Os genótipos mais encontrados nos casos de IOHCV não são diferentes daqueles encontrados em pacientes com a infecção clássica pelo HCV e depende da região geográfica estudada. Conforme descrito por Castillo e cols., em estudo Espanhol com 57 pacientes com IOHCV, foi demonstrado que 100% destes eram do genótipo 1b, o mais prevalente na região (CASTILLO et al., 2004).

De fato, Humphreyset e cols. revelaram que o subtipo viral 3a apresenta duas regiões hipervariáveis, denominadas HVR495 e HVR575, que estão relacionadas a infecção aguda em pacientes usuários de drogas intravenosas. Adicionalmente, Hirotsuet e cols. identificaram pouco mais de 32 regiões variantes associadas a resistência viral presentes no gene da proteína 5A (NS5A). Atualmente, estudos genômicos têm demonstrado que variações genéticas entre diferentes cepas virais de HCV configuram um importante mecanismo de sobrevivência viral, contribuindo para sua patogenicidade e resistência frente ao sistema imunológico do hospedeiro (PARK et al., 2014)(HUMPHREYS et al., 2012)

Além do perfil genético da cepa infectante, o sistema imunológico do hospedeiro também está relacionado com a imunopatogênese da infecção pelo HCV, bem como a evolução e persistência da doença (WANG, 2010). Embora a maioria dos pacientes infectados apresente uma resposta imune celular específica ao HCV, somente 20% dos indivíduos infectados são capazes de realizar o *clearance* viral na fase aguda da doença (LECHNER et al., 2000) (COX et al., 2005). De fato, Burke e cols. observaram que pacientes incapazes de realizar o *clearance* viral, apresentam repostas celulares mais fracas e constataram a diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nestes indivíduos (BURKE; COX, 2010). Além disso, diferenças existentes entre as moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) poderiam direcionar respostas imunes pouco eficazes, já que alguns supertipos de HLA afetam a afinidade de reconhecimento e ligação dos linfócitos T à epítomos antigênicos (KUNIHOLM et al., 2010).

Por fim, estudos indicam que a sobrevida do vírus e a evolução da infecção podem estar ligadas a três principais fatores, a exaustão de linfócitos T, a falha na função humoral dos linfócitos (secreção de citocinas) e a disfunção de células dendríticas (THIMME et al., 2001)(WEDEMEYER et al., 2002).

O tratamento da IOHCV pode ser realizado com terapia antiviral conforme relatado por Pardo e cols.. Estes autores realizaram tratamento com interferon peguilado e ribavirina por 6 meses em 10 pacientes com IOHCV, que apresentavam anormalidades nos níveis

séricos de enzimas hepáticas associado a hepatite crônica na biópsia e que apresentaram detecção do HCV-RNA por PCR em células mononucleares do sangue periférico. Ao final do tratamento, 60% dos pacientes apresentaram normalização dos níveis séricos de ALT e em 70% dos casos o HCV-RNA não foi mais identificado nas células mononucleares, sugerindo comportamento semelhante ao da infecção clássica pelo HCV (PARDO et al., 2006).

2.4 INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE B

A infecção oculta pelo vírus da hepatite B (IOHBV) é caracterizada pela ausência do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) sanguíneo na presença do HBV-DNA no tecido hepático ou no soro (RAIMONDO et al., 2007). Sabe-se que, em decorrência do seu ciclo celular peculiar, em particular a conversão de sua forma circular relaxada para a forma covalente circular fechada (cccDNA), o HBV é capaz de permanecer por longos períodos integrado ao DNA do hepatócito hospedeiro com consequente replicação viral. Sua estabilidade e persistência, em conjunto com a longa meia vida dos hepatócitos, possibilita que a infecção pelo HBV perdure por toda a vida (ZOULIM, 2005).

Os mecanismos pelos quais os portadores da IOHBV permanecem com o HBsAg negativo ainda são desconhecidos. Alguns destes indivíduos são portadores da mutação no antígenos de superfície S, portanto com HBsAg indetectável aos métodos atuais, ou possuem mutações que inibem a expressão desse antígeno ou da replicação viral (CHAUDHURI et al., 2004)(HASS et al., 2005).

Já o mecanismo proposto para explicar a ausência de HBsAg é obscuro, mas a desregulação do sistema imune do hospedeiro (principalmente linfócito T) a co-infecção com outros agentes infecciosos (HCV) e fatores epigenéticos certamente estão envolvidos (SHIH et al., 1993) (PENNA et al., 1996) (DOITSH; SHAUL, 1999)

É importante ressaltar que a IOHBV é fonte de transmissão do HBV, relatado tanto em modelos animais quanto em humanos submetidos a transfusão de sangue e transplante de órgãos, os quais foram capazes de induzir hepatite B aguda nos receptores (CHAZOUILLÈRES et al., 1994) (WACHS et al., 1995) (DICKSON et al., 1997). Além disso, pacientes com IOHBV podem apresentar reativação aguda da infecção com aparecimento do perfil sorológico típico (LOK et al., 1991), especialmente quando submetidos a imunossupressão (BESSONE; DIRCHWOLF, 2016).

A prevalência da IOHBV é bastante variada e, possivelmente, reflete a distribuição da infecção pelo HBV na população avaliada. Indivíduos com HCV são particularmente predispostos a apresentarem IOHBV, conforme descreveram Cacciola e cols. Estes autores encontraram IOHBV em um terço dos pacientes com infecção pelo HCV e esta prevalência foi ainda maior nos países do leste asiático (CACCIOLA et al., 1999).

Outro grupo sob risco de IOHBV são os usuários de drogas injetáveis e hemofílicos. Estudo realizado com 188 usuários de droga em Baltimore revelou prevalência de IOHBV em 45% dos indivíduos (TORBENSON et al., 2004). De maneira semelhante, Toyoda e cols., estudando população de 43 hemofílicos, revelaram prevalência da IOHBV em 51% dos indivíduos (TOYODA et al., 2004).

Os dados de prevalência de IOHBV disponíveis nos pacientes com DRC em HD são divergentes e variam de 0 a 26% (F. BLAINE HOLLINGER, PEIMAN HABIBOLLAHI, ALI DANESHMAND, 2010). Neste contexto, alguns autores consideram a IOHBV como possível fonte de contaminação nas unidades de hemodiálise e sugerem precauções que incluem o rastreamento de todos os pacientes com pesquisa de HBV-DNA por PCR (BESISIK et al., 2003). No entanto, esta medida não é realizada de rotina devido a menor evidência científica desta via de contaminação nessa população e do custo-benefício.

Em contrapartida, recentemente, Kim e cols. avaliaram a prevalência da IOHBV em 159 pacientes em HD e em 112 indivíduos saudáveis, todos residentes em área endêmica para infecção pelo HBV e constataram prevalência de 1.2% e 2.5%, respectivamente (KIM et al., 2014). A ocorrência de IOHBV em pacientes transplantados renais parece ser baixa também, como constatou Franz e cols. em estudo realizado no Rio de Janeiro com 207 pacientes receptores de transplante renal, onde a frequência de IOHBV foi de 1% (FRANZ et al., 2013).

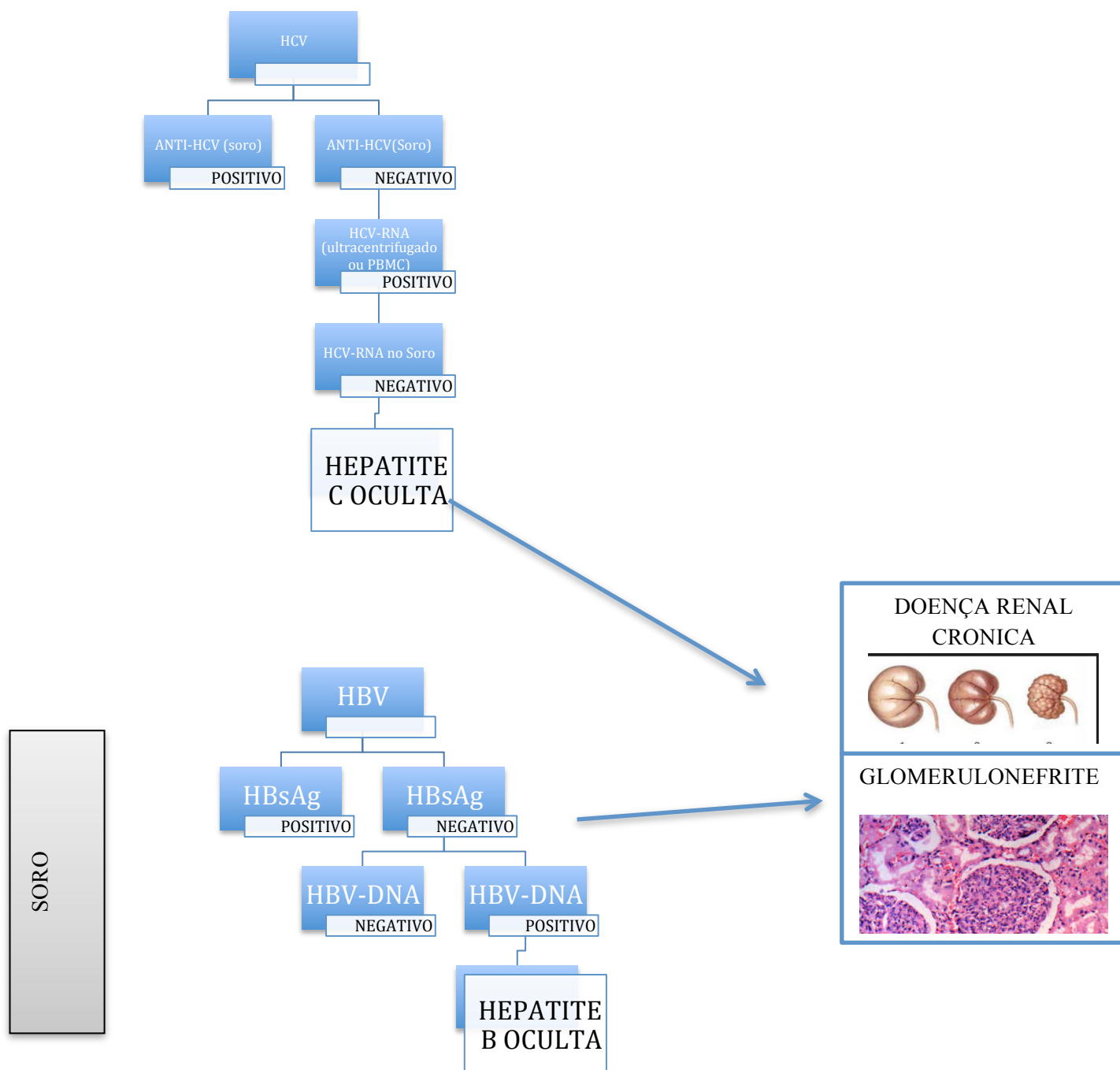
Poucos estudos relacionaram as glomerulopatias com IOHBV. Recentemente, foi descrito caso de reativação do HBV em paciente com IOHBV portador de síndrome nefrótica que foi submetido a tratamento imunossupressor (DU et al., 2013). Em outro estudo, Kong e cols. avaliaram biópsias renais de 500 indivíduos com glomerulonefrite e HBsAg negativo e constataram antígenos virais (HBsAg ou HBcAg) por imunofluorescência em 9 pacientes (1,8%). No entanto, neste estudo não foi avaliada a presença do HBV-DNA no soro e, desta forma, não foi confirmada a ocorrência da IOHBV em pacientes com glomerulopatias (KONG et al., 2013).

3 HIPÓTESES E MODELO TEÓRICO

3.1 HIPÓTESES

As infecções ocultas pelos vírus das hepatites B e C são frequentes nos pacientes com glomerulopatias e em pacientes com doença renal crônica pré-diálise de outras etiologias.

3.2 MODELO TEÓRICO



4 OBJETIVOS

4.1 PRIMÁRIO

Avaliar a ocorrência das infecções ocultas pelos vírus das hepatites B e C em pacientes com glomerulopatias e em pacientes com doença renal crônica pré-diálise de outras etiologias.

4.2 SECUNDÁRIOS

- Descrever e comparar as características demográficas, clínicas, fatores de risco para aquisição das hepatites virais e características laboratoriais em pacientes com e sem infecção oculta pelo vírus das hepatites B e C.
- Avaliar a ocorrência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatite B (anti-HBs e anti-HBc) nos pacientes com glomerulopatias e com doença renal crônica pré-diálise.

5 MÉTODO

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE. A participação teve caráter voluntário e não interferiu no atendimento do paciente no ambulatório. As informações desta pesquisa e os resultados dos exames respeitaram a privacidade do paciente. Os riscos que os pacientes correram foram aqueles decorrentes da coleta de sangue e os pacientes com a sorologia positiva puderam se beneficiar, já que alguns destes exames não são realizados de rotina. Quando foi encontrado algum destes pacientes infectados foi encaminhado para o Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

O material coletado foi armazenado em alíquotas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFPE e no Laboratório de Imunogenética Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ. Os questionários foram armazenados em pastas na Disciplina de Nefrologia no Hospital das Clínicas da UFPE.

5.2 DESENHO DO ESTUDO

O estudo foi do tipo transversal com caráter analítico, uma vez que foi verificada a prevalência das formas ocultas das hepatites B e C em pacientes com glomerulopatias e com doença renal crônica e suas relações com as características biológicas, clínicas, laboratoriais, a classificação da doença renal crônica em estágios e com os parâmetros histológicos e etiológicos das glomerulopatias.

5.3 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.3.1 POPULAÇÃO DA PESQUISA E LOCAL DO ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida nos ambulatórios de Glomerulopatias e de DRC do Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE onde foram avaliados pacientes pré-diálise. Estes ambulatórios são referência estadual no tratamento de pacientes com glomerulopatias e com DRC no estado de Pernambuco, principalmente, da região metropolitana do Recife. Neste ambulatório o atendimento é realizado por médicos nefrologistas e residentes, sob supervisão de preceptores. O atendimento é realizado semanalmente, em prontuário próprio e segue rotinas e protocolos de tratamento específicos do serviço. São atendidos cerca de 25 pacientes semanalmente, em cada um dos ambulatórios.

A população estudada foi composta por pacientes do Sistema Único de Saúde acompanhados nos ambulatórios de Glomerulopatias e de DRC do HC-UFPE. Estes pacientes foram encaminhados de diversos serviços do estado e da própria instituição para acompanhamento nefrológico.

Para seleção dos pacientes para o estudo, nos dois referidos ambulatórios, inicialmente o pesquisador analisou os prontuários dos pacientes agendados para o atendimento, de acordo com a demanda de cada ambulatório e selecionou os pacientes em que estava definida a etiologia da DRC e da Glomerulopatia.

Em seguida, durante a rotina de assistência médica, os pacientes selecionados foram convidados a participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Aqueles que concordaram em participar foram submetidos à entrevista e responderam questionário elaborado especificamente para o estudo. Foram convocados para avaliação todos os casos atendidos consecutivamente no período do estudo que preencheram seguintes os critérios de inclusão e exclusão:

5.3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A) PARA TODOS OS GRUPOS:

Adultos maiores de 18 anos oriundos dos Ambulatórios de DRC e de Glomerulopatias do HC-UFPE e que concordaram em se submeter às etapas do estudo, após leitura e assinatura do TCLE.

B) GRUPO I: DOENÇA RENAL CRÔNICA

Apresentar acompanhamento e diagnóstico de doença renal crônica por no mínimo 3 meses e taxa de filtração glomerular $< 60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$.

C) GRUPO II: GLOMERULOPATIAS

Paciente com Glomerulopatias diagnosticada por biópsia renal.

5.3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A) GESTANTES OU PUÉRPERAS

B) PORTADORES DE INFECÇÃO PELO HCV (ANTI-HCV POSITIVO)

C) PORTADORES DE INFECÇÃO PELO HBV (HBsAG POSITIVO)

5.3.4 TIPO DE AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

a) TIPO DE AMOSTRAGEM

A amostra foi de conveniência e comportou a demanda espontânea e consecutiva do atendimento aos pacientes realizado nos Ambulatórios no período indicado para o estudo.

b) DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Como faltam dados na literatura sobre a ocorrência das IOHCV e IOHBV em pacientes com DRCPD, e apenas um estudo revela ocorrência elevada da IOHCV em pacientes com glomerulopatias, foi realizado cálculo de tamanho de amostra de acordo com esta prevalência conforme dados abaixo:

Com o conhecimento das prevalências, a amostra foi calculada da seguinte forma:

- **Tipo de estudo:** Prevalência
- **Precisão absoluta (a diferença entre a prevalência real e estimada):** até 10%
- **Erro:** 5%

Desta forma, o estudo de prevalência utilizado como base foi o único disponível até o momento da elaboração do projeto em que a prevalência de IOHCV em pacientes com Glomerulopatias foi de 39%. O valor destes dados foram extrapolados para aqueles com DRC e também para pacientes com IOHBV.

Desta maneira, o cálculo de tamanho de amostra para esta prevalência foi de 91 pacientes conforme cálculo demonstrado abaixo:

Valores calculados com os dados de entrada

Proporção na população: 39%
 Precisão absoluta: 10
 Nível de significância: 5%
 Tamanho da amostra calculado: 91

Para outros valores do nível de significância temos:

Nív. de signif.	Tamanho da amostra
0.1%	258
1%	158
10%	64

Adaptado www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/amostra.html ; Laboratório de epidemiologia e estatística, SP.

5.3.5 DEFINIÇÃO DE TERMOS, OPERACIONALIZAÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

5.3.5.1 DEFINIÇÃO DOS TERMOS

a) GLOMERULOPATIA

Definição teórica	Definição operacional
Doenças glomerulares caracterizadas por alterações inflamatórias em um dos compartimentos do glomérulo com comprometimento da estrutura ou função.	Presença de proliferação de células próprias, esclerose, depósitos de imuno complexos ou espessamento de membrana basal glomerular evidenciada por biópsia renal na microscopia óptica, imunofluorescência ou eletrônica.

B) DOENÇA RENAL CRÔNICA

Definição teórica	Definição operacional
Lesão renal > 3 meses definida por anormalidades estruturais ou funcionais com ou sem diminuição no ritmo de filtração glomerular (RFG) manifestadas por: Anormalidades histopatológicas renais Marcadores de lesão renal, como anormalidades urinárias ou anormalidades sanguíneas ou alterações em exames de imagem OU RFG < 60 mL/min/1,73 m ² por > 3 meses	Ritmo de filtração glomerular < 60 mL/min/1,73 m ² por > 3 meses

C) INFECÇÃO OCULTA PELA HEPATITE C

Definição teórica	Definição operacional
Presença de HCV-RNA no hepatócito ou em célula mononuclear ou em ultracentrifugado sérico na ausência do anti-HCV ou HCV-RNA no soro	Presença de HCV-RNA na célula mononuclear ou em ultracentrifugado sérico na ausência do anti-HCV. Quando positivo na célula mononuclear ou ultracentrifugado, negativo no soro não ultracentrifugado

D) INFECÇÃO OCULTA PELA HEPATITE B

Definição teórica	Definição operacional
Presença de HBV-DNA no hepatócito ou	Presença de HBV-DNA no soro na

no soro na ausência de antígeno HBsAg no soro	ausência de antígeno HBsAg no soro
---	------------------------------------

5.3.5.2 Operacionalização e Categorização das Variáveis

A) VARIÁVEIS DEPENDENTES

Variável Dependente	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE C	Presença de HCV-RNA no hepatócito ou em célula mononuclear ou em ultracentrifugado sérico na ausência do anti-HCV ou HCV-RNA no soro	Presença de HCV-RNA na célula mononuclear ou em ultracentrifugado sérico na ausência do anti-HCV. Quando positivo na célula mononuclear ou ultracentrifugado, negativo no soro não ultracentrifugado	1. Positivo 2. Negativo

Variável Dependente	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE B	Presença de HBV-DNA no hepatócito ou no soro na ausência de antígeno HBsAg no soro	Presença de HBV-DNA no soro na ausência de antígeno HBsAg no soro	1. Positivo 2. Negativo

B) VARIÁVEIS INDEPENDENTES

1) VARIÁVEIS BIOLÓGICAS

Variáveis Biológicas	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
IDADE	Variável contínua definida pela data de nascimento que consta do Registro Geral fornecido pelo paciente	Calculada em anos pela data de nascimento que consta do Registro Geral fornecido pelo paciente e registrado na data de aplicação do questionário	Não categorizada
COR DA PELE	Variável qualitativa nominal. Definida pelo paciente quando arguido.	Aquela respondida pelo paciente após arguição.	1. Negra 2. Branca 3. Parda 4. Amarela
SEXO			1. Masculino 2. Feminino

2) VARIÁVEIS CLÍNICAS:

Variáveis Clínicas	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
GLOMERULOPATIA	Variável qualitativa nominal. Doenças glomerulares caracterizadas por	Presença de proliferação de células próprias, esclerose, depósitos de imuno complexos ou	1. Doença de Lesões Mínimas 2. Glomeruloesclerose Segmentar e focal 3. Glomerulonefrite Membranosa

	alterações inflamatórias imunes ou não, em um dos compartimentos do glomérulo com comprometimento da estrutura ou função.	espessamento de membrana basal glomerular evidenciada por biópsia renal na microscopia óptica, imunofluorescência ou eletrônica.	4. Glomerulonefrite Membranoproliferativa 5. Nefropatia por IgA 6. Nefrite lúpica
DOENÇA RENAL CRÔNICA PRÉ-DIÁLISE	Variável qualitativa ordinal. Lesão renal > 3 meses definida por anormalidades estruturais ou funcionais com ou sem diminuição no ritmo de filtração glomerular (RFG) manifestadas por: Anormalidades histopatológicas renais Marcadores de lesão renal, como anormalidades urinárias ou anormalidades sanguíneas alterações em exames de imagem OU RFG < 60 mL/min/1,73 m ² por > 3 meses que não necessita de terapia renal substitutiva	Ritmo de filtração glomerular < 60 mL/min/1,73 m ² por > 3 meses pelo CKD-EPI.	1. Estágios 3a (RFG 59-45 mL/min/1,73 m²) 2. Estágio 3b (RFG 44-30 mL/min/1,73 m²) 3. Estágio 4 (RFG 29-15 mL/min/1,73 m²) 4. Estágio 5 (RFG <15 mL/min/1,73 m²)
HEMOTRANSFUSÃO	Variável qualitativa nominal	Recebimento de sangue ou derivados	1. Sim 2. Não
TATUAGEM	Variável qualitativa nominal	Uso de tatuagem	1. Sim 2. Não
PIERCING	qualitativa nominal	Uso atual ou pregresso de piercing	1. Sim 2. Não
INFECÇÃO SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL	qualitativa nominal	Passado de uretrite, cervicite, doença inflamatória pélvica ou vesículas em genitália externa	1. Sim 2. Não
PRESERVATIVO	Variável qualitativa ordinal	Uso prévio de preservativo	1. Regular 2. Irregular 3. Nunca

USO DE DROGA ENDOVENOSA	Qualitativa nominal	Uso de droga ilícita injetável	1. Sim 2. Não
PESO	Quantitativa Contínua	Avaliação do peso em Quilogramas	
ALTURA	Quantitativa Contínua	Avaliação do altura em metros	
ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC)	Quantitativa Contínua	Divisão do peso pelo quadrado da altura (Peso/A^2)	
OBESIDADE	Variável qualitativa nominal	IMC > ou igual a $30\text{kg}/\text{m}^2$	1. Sim 2. Não
HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	Variável qualitativa nominal	pressão arterial sistematicamente acima de 140x90mmHg, baseada na média de duas ou mais medidas em duas ou mais ocasiões ou uso de drogas antihipertensivas	1. Sim 2. Não
DIABETES	Variável qualitativa nominal	Uso de insulina ou hipoglicemiante oral ou glicemia de jejum ≥ 126 ou hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ em duas ou mais ocasiões segundo registro em prontuário.	1. Sim 2. Não
DISLIPIDEMIA	Variável qualitativa nominal	Uso de drogas antilipemiantes (estatinas ou fibratos)	• Sim • Não
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	qualitativa nominal	Passado de isquemia encefálica permanente ou transitória com ou sem sequela motora	1. Sim 2. Não
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	qualitativa nominal	Passado de isquemia miocárdica ou revascularização miocárdica	1. Sim 2. Não
HEMODIÁLISE PRÉVIA	qualitativa nominal	Realização de pelo menos uma sessão de hemodiálise	1. Sim 2. Não
FAMILIAR CONTAMINADO	qualitativa nominal	Presença de familiar ou morador domiciliar portador de hepatite viral crônica	1. Sim 2. Não
CIRURGIA PRÉVIA	qualitativa nominal	Passado de cirurgia	1. Sim 2. Não

5.3.6 MÉTODOS DE COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS

- Métodos de Coleta dos Dados

Os métodos de coleta dos dados estão descritos em etapas especificadas a seguir.

Etapas 1: foi procedida análise dos prontuários dos pacientes pré agendados para atendimento na rotina dos ambulatorios. Aqueles que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão foram informados do objetivo e etapas do estudo e convidados a participar. Em seguida foram convidados a ler em conjunto com o pesquisador e assinar o TCLE, após concordância dos termos. Depois, os pacientes responderam a questionário padronizado para o estudo.

Etapas 2: Aqueles que preencheram todas as fases da Etapa 1 foram submetidos a coleta de amostras de sangue para realização das análises virológica e sorológicas virais.

Etapas 3: uma alíquota da amostra coletada foi centrifugada e armazenada em freezer -20 °C no laboratório central do Hospital das Clínicas e enviada para análise no Laboratório São Camilo, onde foram realizadas as análises: anti-HCV, Anti-HBc total, Anti-HBs e HBsAg e pesquisa qualitativa de HBV-DNA.

Etapas 4: outra alíquota foi enviada ao laboratório Aggeu Magalhães, onde foi submetida a ultracentrifugação do plasma e separação de células mononucleares para pesquisa do HCV-RNA por PCR. Uma fração desta alíquota foi separada para realização pesquisa do HCV-RNA por PCR no soro não ultracentrifugado.

Etapas 5: após avaliação das sorologias e análises dos dados os pacientes positivos foram notificados por meio de telefonema ou telegrama para comparecer ao serviço de Nefrologia e realizar avaliação e novas análises dos dados além de serem notificados no Núcleo de Epidemiologia do HC de acordo com a portaria 1271 de 2014 do Ministério da Saúde

- Processamento dos dados

Foram utilizados os Softwares STATA/SE 12.0 e o Excel 2010 para armazenamento e processamento dos dados. Em todos os testes foram aplicados intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram apresentados em forma de artigo científico padronizado para revista a ser submetido com suas respectivas tabelas com frequências absoluta e relativa. As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão. Para verificar a existência de associação foi utilizado Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. Às variáveis quantitativas foi aplicado o teste de

normalidade de Kolmogorov-Smirnov e a comparação dos grupos foi utilizado o Teste t Student (Distribuição Normal) e Mann-Whitney (Não Normal).

5.3.7 QUALIDADE DOS INSTRUMENTOS DE MEDIDA

- Questionário Padronizado

Elaborado especificamente para este estudo. Nele constam todas as variáveis contidas no estudo. **ANEXO 1**

- Análise Laboratorial da Função Renal e Marcadores de Lesão Hepática

Toda a análise bioquímica foi realizada no Laboratório Central do HC-UFPE de maneira automatizada a seguir discriminados: para aminotransferases, aspartato amino-transferase (AST) e alanino amino-transferase (ALT) UV Diasys-Architect c8000; para creatinina, Architect Abbott. No Laboratório São Camilo foram realizadas as seguintes análises: pesquisa do anti-HCV por ELISA 3 geração (ADVIA Centaur®); teste imunocromatográfico rápido para determinação qualitativa de antígeno superfície Hepatite B (HBsAg) em amostras de soro (ADVIA Centaur®); Anti-HBs, imunoensaio por quimioluminometria direta de (ADVIA Centaur®); Anti-HBc qualitativo total (IMUNOISSAI IMUNOLITE 2000).

- Análise laboratorial do HCV-RNA e HBV DNA

A do PCR para HCV no soro, plasma ultracentrifugado e nos monócitos foi realizada no Departamento de Imunologia do centro de pesquisas Aggeu Magalhães. A pesquisa do HBV-DNA por PCR foi realizado no Laboratório São Camilo.

5.3.8 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS

- Aplicação do Questionário Padronizado

Os pacientes foram selecionados e avaliados consecutivamente, de acordo com a demanda dos Ambulatórios de Glomerulopatias e DRC do HC-UFPE. Após análise do prontuário, os pacientes selecionados foram convidados a participar do estudo e aqueles que concordaram, após leitura e assinatura do TCLE, foram submetidos à entrevista, procedimentos realizados pelo pesquisador, para a aquisição de informações conforme questionário elaborado.

- Coleta e Processamento da Amostra

Foram coletados 15 mL de sangue em dois tubos, sendo 5 mL em dois tubos secos e outros 5 mL num tubo com *Ethylenediaminetetraaceticacid* (EDTA). Um tubo seco foi encaminhado ao Laboratório do Hospital das Clínicas, onde foi centrifugado à 720 x g, durante 5' para obtenção do soro que foi armazenado em dois tubos *ependorfs*, sendo um para análise virológica (anti HCV, HBsAg, Anti-HBc) e o outro para a do HBV-DNA por PCR e enviados para o Laboratório São Camilo. O material coletado em outro tubo seco e no tubo com EDTA foi enviado ao Laboratório de Imunogenética (LIG) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco, onde foram realizadas as análises experimentais relacionadas a identificação HCV. O tubo EDTA teve o sangue centrifugado no gradiente de Ficoll, para a obtenção do plasma, utilizado na caracterização do perfil imunogenético do paciente, e análise imunológica, incluindo a verificação da infecção viral a partir de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) extraídas da amostra do tubo seco.

- SEPARAÇÃO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

O processo de separação foi realizado pelo Ficoll-Histopaque (GE Healthcare, Little Chalfont - UK), através de um gradiente de densidade gerado por centrifugação. Inicialmente, foi colocado 3 mL de Ficoll em um tubo cônico e adicionados 5 mL da amostra sanguínea. Para a formação do gradiente de densidade foi realizada a centrifugação durante 30 minutos a uma velocidade de 720 x g. Após esta etapa o plasma foi estocado em freezer e o anel de PBMC's coletado, lavado com Tampão Fosfato Salino (PBS), e então, as células foram contadas e fracionadas.

- ULTRACENTRIFUGAÇÃO DE SOROS

O processo de ultracentrifugação dos soros de pacientes foi realizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz PE). Foram adicionado aos 2 mL de soro uma solução de sucrose a 10%, a ultracentrifugação foi ocorreu numa velocidade de 100.000 x g por 17 horas a uma temperatura de 4° C. O sedimento foi dissolvido em 250 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA [pH 7.5]) e foi utilizado posteriormente na extração do RNA total.

- Detecção do HCV-RNA

A)PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Os pacientes incluídos no estudo tiveram 8 mL de seu sangue coletado em dois tubos, sendo 4 mL em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 4 mL em tubo seco e separadas através do gradiente de densidade estabelecido pelo procedimento separação celular por ficoll-paque.

As amostras sanguíneas obtidas em tubo seco foram inicialmente centrifugadas à 3000 xg por 7 min em temperatura ambiente para obtenção do soro. Em seguida 2 mL do soro foi adicionado no tampão de sacarose 10%, numa proporção de 1:1 e ultracentrifugado à 100.000 xg por 17h à 4° C. Por fim, o *pellet* obtido através da ultracentrifugação foi eluído em 200 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) RNase-free. Outros 2mL do soro (não ultracentrifugado) foram armazenados e foram realizadas as etapas de extração de RNA e ampliação do genoma da mesma maneira da realizada no soro ultracentrifugado e no RNA extraído da PBMC.

B) EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total foi realizada através do reagente *TRIzol* (Invitrogen, California - USA) seguindo o protocolo do fabricante. O soro ultracentrifugado e as PBMC's foram utilizados como amostra para extração. As amostras foram homogeneizadas em *TRIzol* e o RNA precipitado com isopropanol e centrifugado a 12.000 xg, e então, o RNA precipitado foi lavado com etanol 75% gelado. Após o procedimento de lavagem o RNA foi diluído em água DEPC (dietilpirocarbonato) RNase-free, incubado por 10 min a 55° C e armazenado a -80° C.

C) AMPLIAÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA HEPATITE C

A detecção viral foi realizada por reação em cadeia polimerase (PCR), utilizando como amostra de amplificação o RNA total extraído do soro ultracentrifugado e da PBMC. Inicialmente foi realizada uma etapa de síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando uma a enzima transcriptase reversa (RT). A amplificação foi realizada utilizando os primers UTRLC1 (5'- CAAGCACCTATCAGGCAGT -3') e o UTRLC2 (5'- CTTACGCAGAAAGCGTCTA -3') descritos previamente por Bartolomé et al. (2007). Para amplificar a sequência do promotor de HCV foi realizada uma reação com volume final de 20 µL, contendo tampão 1x PCR Rxn (Invitrogen Life Technologies, California - USA), 5 mM de MgCl₂, 10 pmol de DNTPs, 5 µM de cada primer (UTRLC1 e UTRLC2), 1 unidade de taq polimerase e 100 ng de cDNA.

Os controles positivo e negativo consistiram de uma amostra de paciente sabidamente positivo para hepatite C clássica e o mix de PCR sem adição de DNA, respectivamente. A

detecção do produto da PCR foi feita através de corrida eletroforética, com tensão elétrica fixa de 100 V, em gel de agarose a 2% corado com SYBR safe. O tampão de corrida utilizado foi o TAE 1x (Tris-base 0,4 M, EDTA 20 mM, acetato de sódio 0,13 M, pH 8,0) e visualizados através do transiluminador L-PIX (Loccus, São Paulo - Brasil).

- Detecção do HBV-DNA

Os pacientes incluídos no estudo tiveram alíquotas de seu sangue coletado, centrifugados e armazenados a -20 °C. As amostras foram posteriormente enviadas para o laboratório São Camilo onde foram submetidas a detecção automatizada quantitativa do HBV-DNA. Foi utilizado o teste COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 para amplificação de ácido nucleico e detecção do DNA do HBV no soro. Neste teste, a preparação das amostras é automatizada seguida por amplificação e detecção do DNA-alvo do HBV e apresenta limite de detecção 300 genomas virais por mL.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHIM, S. S. et al. Occult hepatitis C virus infection among Egyptian hemodialysis patients. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1388–1393, ago. 2016.
- AGHAKHANI, A. et al. Occult Hepatitis B Virus Infection in Hemodialysis Patients With Isolated Hepatitis B Core Antibody: A Multicenter Study. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 14, n. 3, p. 349–353, 20 jan. 2010.
- ALBUQUERQUE, A. C. C. DE et al. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 558–562, out. 2012.
- ALTINDIŞ, M. et al. [Investigation of hemodialysis patients in terms of the presence of occult hepatitis B]. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 41, n. 2, p. 227–33, abr. 2007.
- AMET, S. et al. Prevalence of renal abnormalities in chronic HBV infection: The HARPE study. **Liver International**, v. 35, n. 1, p. 148–155, 2015.
- BAID-AGRAWAL, S. et al. Prevalence of occult hepatitis C infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 5, p. 928–33, maio 2014.
- BARRIL, G. et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 12, p. 2288–92, dez. 2008.
- BARRIL, G. et al. Impact of Isolated Hepatitis C Virus (HCV) Core-Specific Antibody Detection and Viral RNA Amplification among HCV-Seronegative Dialysis Patients at Risk for Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 3053–3056, 1 ago. 2014.
- BARSOUM, R. S. Hepatitis C virus: from entry to renal injury--facts and potentials. **Nephrology, dialysis, transplantation**, v. 22, n. 7, p. 1840–8, jul. 2007.
- BARTOLOME, J. et al. Ultracentrifugation of Serum Samples Allows Detection of Hepatitis C Virus RNA in Patients with Occult Hepatitis C. **Journal of Virology**, v. 81, n. 14, p. 7710–7715, 15 jul. 2007.
- BERGMAN, S. et al. Hepatitis C infection is acquired pre-ESRD. **American journal of kidney diseases**, v. 45, n. 4, p. 684–9, abr. 2005.
- BESISIK, F. et al. Occult HBV infection and YMDD variants in hemodialysis patients with chronic HCV infection. **Journal of hepatology**, v. 38, n. 4, p. 506–10, abr. 2003.
- BESSONE, F.; DIRCHWOLF, M. Management of hepatitis B reactivation in immunosuppressed patients: An update on current recommendations. **World Journal of Hepatology**, v. 8, n. 8, p. 385, 2016.
- BLACKARD, J. T.; KEMMER, N.; SHERMAN, K. E. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. **Hepatology**, v. 44, n. 1, p.

15–22, jul. 2006.

BOKHARAEI-SALIM, F. et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian patients with cryptogenic liver disease. **Journal of medical virology**, v. 83, n. 6, p. 989–95, jun. 2011.

BOZKURT, I. et al. **Hepatitis C and occult hepatitis C infection among hemodialysis patients from central Anatolia**, v. 8, n.1, p.435-440

BURKE, K. P.; COX, A. L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1–3, p. 216–227, 12 jul. 2010.

CACCIOLA, I. et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 1, p. 22–6, 1 jul. 1999.

CARREÑO, V. Seronegative occult hepatitis C virus infection: Clinical implications. **Journal of clinical virology**, v. 61, p. 315–320, 28 set. 2014.

CASTILLO, I. et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients in Whom the Etiology of Persistently Abnormal Results of Liver-Function Tests Is Unknown. p. 7–14, 2004a.

CASTILLO, I. et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 2004b.

CASTILLO, I. et al. Hepatitis C virus infection in the family setting of patients with occult hepatitis C. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 7, p. 1198–203, jul. 2009.

CASTILLO, I. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. **Kidney International**, v. 86, n. 3, p. 619–624, 19 set. 2014.

CHAN, S.-W. et al. Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 5, p. 1131–1141, 1 maio 1992.

CHANDRA, M. et al. Prevalence of Hepatitis B and Hepatitis C Viral Infections in Indian Patients with Chronic Renal Failure. **Intervirolgy**, v. 47, n. 6, p. 374–376, 2004.

CHAUDHURI, V. et al. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5, p. 1356–71, nov. 2004.

CHAZOUILLÈRES, O. et al. “Occult” hepatitis B virus as source of infection in liver transplant recipients. **The Lancet**, v. 343, n. 8890, p. 142–146, jan. 1994.

CHEN, Y.-C. et al. Hepatitis C virus itself is a causal risk factor for chronic kidney disease beyond traditional risk factors: a 6-year nationwide cohort study across Taiwan. **BMC Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 187, 2013.

CHEN, Y.-C. et al. A nationwide cohort study suggests chronic hepatitis B virus infection increases the risk of end-stage renal disease among patients in Taiwan. **Kidney**

International, v. 87, n. 5, p. 1030–1038, 2015.

CHOI, Y. S. et al. Two Distinct Functional Patterns of Hepatitis C Virus (HCV) -Specific T Cell Responses in Seronegative , Aviremic Patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.

COMBES, B. et al. Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane. **Lancet**, v. 2, n. 7718, p. 234–7, 31 jul. 1971.

CORTÉS-MANCERA, F. M. et al. Occult hepatitis C virus infection in a re-transplanted patient with liver failure of unknown etiology. **Rev Col Gastroenterol**, v. 25, n. 1, p. 72–80, 2010.

COX, A. L. et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1741–1752, 6 jun. 2005.

DI STEFANO, M. et al. Occult HBV infection in hemodialysis setting is marked by presence of isolated antibodies to HBcAg and HCV. **Journal of Nephrology**, v. 22, n. 3, p. 381–386, 2009.

DICKSON, R. C. et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. **Gastroenterology**, v. 113, n. 5, p. 1668–74, nov. 1997.

DOITSH, G.; SHAUL, Y. HBV transcription repression in response to genotoxic stress is p53-dependent and abrogated by pX. **Oncogene**, v. 18, n. 52, p. 7506–13, 9 dez. 1999.

DOLATIMEHR, F. et al. Prevalence of occult HCV infection in hemodialysis and kidney-transplanted patients: a systematic review. **Future Virology**, v. 12, n. 5, p. 315–322, maio 2017.

DU, W. et al. HBV reactivation in an occult HBV infection patient treated with prednisone for nephrotic syndrome: case report and literature review. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 394, jan. 2013.

EL-SAYED, G. M. et al. Viral genomes and antigen detection of hepatitis B and C viruses in involved lymph nodes of Egyptian non-Hodgkin's lymphoma patients. **The Egyptian journal of immunology / Egyptian Association of Immunologists**, v. 13, n. 1, p. 105–14, jan. 2006.

EL-SHISHTAWY, S. et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Hemodialysis Patients; Single Center Study. **Electronic physician**, v. 7, n. 8, p. 1619–1625, 20 dez. 2015.

ESLAMIFAR, A. et al. Occult hepatitis C virus infection in Iranian hemodialysis patients. **Journal of nephropathology**, v. 4, n. 4, p. 116–20, out. 2015.

F. BLAINE HOLLINGER , PEIMAN HABIBOLLAHI , ALI DANESHMAND, S. M. A. R
EVIEW Occult Hepatitis B Infection in Chronic Hemodialysis Patients : **Hepatitis monthly**, v. 10, n. 3, p. 199–204, 2010.

FABRIZI, F. et al. Occult hepatitis B virus infection in dialysis patients: a multicentre survey.

Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 21, n. 11, p. 1341–7, 1 jun. 2005.

FRANZ, C. et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in kidney transplant recipients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 657–660, ago. 2013.

GAD, Y. Z. et al. Distinct immunoregulatory cytokine pattern in Egyptian patients with occult Hepatitis C infection and unexplained persistently elevated liver transaminases. **Asian journal of transfusion science**, v. 6, n. 1, p. 24–8, jan. 2012.

GATSERELIA, L. et al. Occurrence of occult HCV infection among Hiv infected patients in Georgia. **Georgian medical news**, n. 226, p. 37–41, jan. 2014.

GRANIERI, C. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in non alcoholic steatohepatitis and cryptogenetic liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, p. S91–S92, fev. 2011.

HARRISON, S. A. Insulin Resistance Among Patients With Chronic Hepatitis C: Etiology and Impact on Treatment. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 8, p. 864–876, 2008.

HASS, M. et al. Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals. **Hepatology**, v. 42, n. 1, p. 93–103, jul. 2005.

HE, X. Y. et al. In situ hybridization of hepatitis B DNA in hepatitis B-associated glomerulonephritis. **Pediatric nephrology**, v. 12, n. 2, p. 117–20, fev. 1998.

HELALY, G. F. et al. Occult hepatitis B virus infection among chronic hemodialysis patients in Alexandria , Egypt. **Journal of Infection and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 562–569, 2015.

HIROSE, H. et al. Deposition of hepatitis B e antigen in membranous glomerulonephritis: identification by F(ab')₂ fragments of monoclonal antibody. **Kidney international**, v. 26, n. 3, p. 338–41, set. 1984.

HUMPHREYS, I. S. et al. HCV genotype-3a T cell immunity: specificity, function and impact of therapy. **Gut**, v. 61, n. 11, p. 1589–1599, 2012.

IWASA, Y. et al. Patterns in the prevalence of hepatitis C virus infection at the start of hemodialysis in Japan. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 12, n. 1, p. 53–57, 5 fev. 2008.

JAIN, P.; NIJHAWAN, S. Occult hepatitis C virus infection is more common than hepatitis B infection in maintenance hemodialysis patients. **World journal of gastroenterology** , v. 14, n. 14, p. 2288–9, 14 abr. 2008.

JOHNSON, R. J. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 7, p. 465–70, 18 fev. 1993.

JOHNSON, R. J.; COUSER, W. G. Hepatitis B infection and renal disease: clinical, immunopathogenetic and therapeutic considerations. **Kidney international**, v. 37, n. 2, p.

663–76, fev. 1990.

KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. **Kidney international supplements**, v. 2, n. 2, p. 141, jun. 2012.

KIM, S. M. et al. Occult hepatitis B virus infection of hemodialysis patients: A cross-sectional study in a hepatitis B virus-endemic region. **Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis**, p. 1–6, 5 set. 2014.

KONG, D. et al. Detection of viral antigens in renal tissue of glomerulonephritis patients without serological evidence of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **International journal of infectious diseases**, v. 17, n. 7, p. e535-8, jul. 2013.

KUNIHOLM, M. H. et al. Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1514–1522, maio 2010.

LAI, K. N. et al. The therapeutic dilemma of the usage of corticosteroid in patients with membranous nephropathy and persistent hepatitis B virus surface antigenaemia. **Nephron**, v. 54, n. 1, p. 12–7, jan. 1990.

LAI, K. N. et al. Membranous nephropathy related to hepatitis B virus in adults. **The New England journal of medicine**, v. 324, n. 21, p. 1457–63, 23 maio 1991.

LAI, K. N.; LAI, F. M.; TAM, J. S. IgA nephropathy associated with chronic hepatitis B virus infection in adults: the pathogenetic role of HBsAG. **The Journal of pathology**, v. 157, n. 4, p. 321–7, abr. 1989.

LECHNER, F. et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 9, p. 1499–1512, 2000.

LEMOS, L. B. et al. Hepatitis C among predialysis patients: prevalence and characteristics in a large cohort of patients. **Nephron. Clinical practice**, v. 108, n. 2, p. c135-40, jan. 2008.

LI CAVOLI, G. et al. Incidence of hepatitis C virus infection in patients with chronic kidney disease on conservative therapy. **International journal of infectious diseases**, v. 15, n. 8, p. e514-6, ago. 2011.

LIN, C. Y. Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in kidney cells probably leading to viral pathogenesis among hepatitis B virus associated membranous nephropathy patients. **Nephron**, v. 63, n. 1, p. 58–64, jan. 1993.

LOK, A. S. et al. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. **Gastroenterology**, v. 100, n. 1, p. 182–8, jan. 1991.

LOPES, L. M. V. et al. Glomerulonefrite associada à infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 1–6, fev. 1999.

MARKOWITZ, G. S. et al. Hepatitis C viral infection is associated with fibrillary glomerulonephritis and immunotactoid glomerulopathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 12, p. 2244–52, dez. 1998.

MEYERS, C. M. et al. Hepatitis C and renal disease: an update. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, n. 4, p. 631–657, out. 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico de Hepatites virais. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 48, n. 24, p. 1–65, 2017.

MINUK, G. Y. et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1072–7, nov. 2004.

NAGHDI, R. et al. Occult hepatitis c infection among hemodialysis patients: A prevalence study. **Annals of Hepatology**, v. 16, n. 4, p. 510–513, 2017.

OESTERREICHER, C. et al. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. **Kidney international**, v. 48, n. 6, p. 1967–71, dez. 1995.

OHBA, S. et al. Differential localization of s and e antigens in hepatitis B virus-associated glomerulonephritis. **Clinical nephrology**, v. 48, n. 1, p. 44–7, jul. 1997.

PAPATHEODORIDIS G, BUTI M, CORNBERG M, JANSSEN HL, MUTIMER D, POL S, RAIMONDO G, DUSHEIKO G, LOK A, M. P. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 2, p. 227–42, fev. 2009.

PARK, C.-W. et al. Comparison of Quasispecies Diversity of HCV between Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma by Ultradeep Pyrosequencing. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

PARK, H. et al. A meta-analytic assessment of the risk of chronic kidney disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 22, n. 11, p. 897–905, 2015.

PENNA, A et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 5, p. 1185–94, 1 set. 1996.

QUIROGA, J. A et al. Identification of serologically silent occult hepatitis C virus infection by detecting immunoglobulin G antibody to a dominant HCV core peptide epitope. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 2, p. 256–63, fev. 2009.

RAHNAVARDI, M.; HOSSEINI MOGHADDAM, S. M.; ALAVIAN, S. M. Hepatitis C in Hemodialysis Patients: Current Global Magnitude, Natural History, Diagnostic Difficulties, and Preventive Measures. **American Journal of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 628–640, 2008.

RAIMONDO, G. et al. Occult hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 46, n. 1, p. 160–70, jan. 2007.

ROCCATELLO, D. et al. Multicenter study on hepatitis C virus-related cryoglobulinemic glomerulonephritis. **American journal of kidney diseases** v. 49, n. 1, p. 69–82, jan. 2007.

RODRÍGUEZ-IÑIGO, E. et al. Hepatitis C virus RNA in kidney biopsies from infected patients with renal diseases. **Journal of viral hepatitis**, v. 7, n. 1, p. 23–9, jan. 2000.

- ROQUE-CUÉLLAR, M. C. et al. Cellular immune responses and occult infection in seronegative heterosexual partners of chronic hepatitis C patients. **Journal of viral hepatitis**, v. 18, n. 10, p. e541-9, out. 2011.
- SAAD, Y. Prevalence of occult hepatitis C in egyptian patients with non alcoholic fatty liver disease. **Open Journal of Internal Medicine**, v. 1, n. 2, p. 33–37, 2011.
- SABRY, A. et al. HCV associated glomerulopathy in Egyptian patients: clinicopathological analysis. **Virology**, v. 334, n. 1, p. 10–6, 30 mar. 2005.
- SERFATY, L.; CAPEAU, J. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes: Clinical and pathogenic data. **Liver International**, v. 29, n. SUPPL. 2, p. 13–25, 2009.
- SHIH, C. M. et al. Suppression of hepatitis B virus expression and replication by hepatitis C virus core protein in HuH-7 cells. **Journal of virology**, v. 67, n. 10, p. 5823–32, out. 1993.
- SIT, D. et al. Seroprevalence of hepatitis B and C viruses in patients with chronic kidney disease in the predialysis stage at a university hospital in Turkey. **Intervirolgy**, v. 50, n. 2, p. 133–137, 2007.
- SUGDEN, P. B. et al. Rare occurrence of occult hepatitis C virus in apparently uninfected injecting drug users: a two-centre, masked, case-control study. **Journal of viral hepatitis**, v. 20, n. 10, p. 725–8, out. 2013.
- TAN, Z. et al. HBV serum and renal biopsy markers are associated with the clinicopathological characteristics of HBV-associated nephropathy. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 11, p. 8150–4, jan. 2014.
- TANG, S. et al. Lamivudine in hepatitis B-associated membranous nephropathy. **Kidney international**, v. 68, n. 4, p. 1750–8, out. 2005.
- THIMME, R. et al. Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1395–1406, 19 nov. 2001.
- TORBENSON, M. et al. High prevalence of occult hepatitis B in Baltimore injection drug users. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 51–7, jan. 2004.
- TOYODA, H. et al. Prevalence and clinical implications of occult hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan. **Journal of medical virology**, v. 73, n. 2, p. 195–9, jun. 2004.
- WACHS, M. E. et al. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg(-), HBcAb(+), HBIgM(-) organ donors. **Transplantation**, v. 59, n. 2, p. 230–4, 27 jan. 1995.
- WANG, S. Natural epitope variants of the hepatitis C virus impair cytotoxic T lymphocyte activity. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 16, p. 1953, 2010.
- WEDEMEYER, H. et al. Impaired Effector Function of Hepatitis C Virus-Specific CD8+ T Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 3447–3458, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global hepatitis report, 2017. **Global Hepatitis Report 2017**, v. 1, n. 1, p. 62, 2017.

YAKARYILMAZ, F. et al. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. **Renal Failure**, v. 28, n. 8, p. 729–735, 2006.

YAMABE, H. et al. Hepatitis C virus infection and membranoproliferative glomerulonephritis in Japan. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 2, p. 220–3, ago. 1995.

YOUSSEF, S. S. et al. Prevalence of occult hepatitis C virus in egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. **Hepatitis research and treatment**, v. 2012, p. 429784, jan. 2012.

ZOULIM, F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. **Journal of hepatology**, v. 42, n. 3, p. 302–8, mar. 2005.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1

ARTIGO FORMATADO SEGUNDO AS ESPECIFICAÇÕES DO PERIÓDICO:
NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION (NDT) (ISSN1460-2385)

Ocorrência de infecção oculta pelo vírus da hepatite C em pacientes com doença renal crônica pré-diálise

Autores: Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette¹, Edmundo Pessoa de Almeida² Lopes,
Nathália Campello Guedes dos Anjos¹, Sávio Augusto Vieira de Oliveira³, Norma Lucena-
Silva³

¹Disciplina de Nefrologia- Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco

²Disciplina de Gastroenterologia-Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco

³Laboratório de Imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco

RESUMO

INTRODUÇÃO: A infecção oculta pelo vírus da Hepatite C (IOHCV) pode estar relacionada a manifestações intra e extra hepáticas. Sabe-se que pacientes com doença renal crônica (DRC) em hemodiálise (HD) apresentam maior prevalência de infecção pelo HCV, tanto em sua forma clássica quanto na forma oculta. No entanto, não há estudos na literatura que avaliaram a ocorrência da IOHCV em pacientes com DRC pré-diálise (DRCPD).

OBJETIVOS: avaliar a ocorrência de IOHCV em pacientes com DRCPD.

METODOLOGIA: Foi realizado estudo transversal entre 2015-17 em pacientes com DRCPD. Foram incluídos adultos, com tempo de acompanhamento > 3 meses e com *clearance* de creatinina < 60 mL/min/1.73m². Foram excluídos gestantes, puérperas, portadores de glomerulopatias e pacientes com HBsAg, anti-HCV ou HIV positivos. Foram considerados pacientes com IOHCV aqueles que apresentaram anti-HCV negativo, com pesquisa por PCR do HCV-RNA positiva no ultracentrifugado plasmático ou em células mononucleares periféricas (PBMC) e com posterior demonstração de pesquisa por PCR do HCV-RNA no soro não ultracentrifugado negativa. **RESULTADOS:** Foram avaliados 91 pacientes com prevalência de IOHCV de 16,5% (15/91), sendo 14 identificados em PBMC e 1 no ultracentrifugado. A IOHCV apresentou maior frequência em pacientes mais velhos (69,4 vs. 60,9 anos; p=0.002); com DRC de etiologia multifatorial (p= 0,019); com a positividade para Anti-HBs (p= 0,018) e Anti-HBc (p= 0,001) e menor frequência naqueles com cirurgia prévia (p=0,05). **CONCLUSÃO:** A ocorrência de IOHCV em pacientes com DRCPD foi elevada e mais comum nos pacientes mais idosos e com passado de infecção pelo HBV.

PALAVRAS CHAVE: Hepatite C; Doença Renal crônica; células polimorfonucleares; reação em cadeia da polimerase; hepatites virais.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Occult hepatitis C viral infection (OCI) may be related to intra- and extra-hepatic manifestations. It is known that patients with chronic kidney disease (CKD) on hemodialysis (HD) have a higher prevalence of HCV infection, both in its classical form and in the occult form. However, there are no studies in the literature that have evaluated the occurrence of OCI in pre-dialysis patients with CKD (PDCKD). The aim of this study was to evaluate the occurrence of OCI in patients with PDCKD. **METHODS:** A cross-sectional study was conducted between 2015-17 in patients with PDCKD. Adults were included, with follow-up time of > 3 months and creatinine clearance <60 mL / min / 1.73m². Pregnant women, postpartum women with glomerulopathies and infected with HBV (HBsAg positive), HCV or HIV were excluded. Patients with OCI were those with anti-HCV negative, with negative HCV-RNA PCR, but positive in plasma ultra-centrifugation or in peripheral mononuclear cells (PBMC). **RESULTS:** Ninety - one patients were evaluated and the prevalence OCI was 16.9% (15/91), 14 of whom were identified in PBMC and one in ultra-centrifugation. OCI presented higher frequency in older patients (69.4 vs. 60.9 years; $p = 0.002$); with a CKD of mixed etiology ($p = 0.019$); with anti-HBs ($p = 0.018$) and Anti-HBs ($p = 0.001$) and lower frequency in those with previous surgery ($p = 0.05$).

CONCLUSION: The occurrence of OCI in patients with PDCKD was elevated and more common in the elderly and patients with HBV infection.

KEYWORDS: Hepatitis C; Chronic Kidney Disease; polymerase chain reaction; viral hepatitis; peripheral blood mononuclear cells.

INTRODUÇÃO

A infecção oculta pelo vírus da Hepatite C (IOHCV) é caracterizada pela presença do seu material genético em células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), no plasma ultracentrifugado ou no tecido hepático, na ausência de anticorpos (anti-HCV) e RNA do vírus no soro (CASTILLO et al., 2004). Esta forma de hepatite viral pode estar associada a lesões teciduais tanto no fígado (doença hepática crônica criptogênica e doença hepática gordurosa não alcoólica)(GAD et al., 2012)(GRANIERI et al., 2011)(SAAD, 2011), quanto extra-hepáticas (glomerulopatias, doenças linfoproliferativas e doença renal crônica dialítica)(CASTILLO et al., 2014)(YOUSSEF et al., 2012)(BARRIL et al., 2008).

Postula-se que a resposta imune celular específica nos pacientes com infecção oculta pelo HCV encontra-se presente, no entanto, com menor eficácia em relação a grupo controle sem infecção, e mais eficaz do que naqueles com a forma clássica da doença (QUIROGA et al., 2006).

Sabe-se que pacientes com doença renal crônica (DRC) em hemodiálise (HD) apresentam maior prevalência de infecção pelo HCV, tanto em sua forma clássica (FISSELL et al., 2004) quanto na forma oculta, podendo chegar a 45% dos indivíduos com IOHCV (BARRIL et al., 2008).

Adicionalmente, devido as medidas universais de precaução nas unidades de HD e a diminuição da necessidade de hemotransusão, alguns autores sugerem que as infecções pelos vírus das hepatites possam ocorrer ainda no período pré-dialítico (BERGMAN et al., 2005). De certo, pacientes com doença renal crônica pré-diálise (DRCPD) apresentam maior prevalência de infecção pelo vírus das hepatites B e C quando comparados a população geral (LEMOS et al., 2008)(LI CAVOLI et al., 2011)(IWASA et al., 2008). No entanto, não se encontram dados na literatura que avaliem a presença de IOHCV em pacientes antes do início de terapia renal substitutiva.

O estudo da epidemiologia da IOHCV em pacientes com DRCPD tem fundamental relevância pela: (i) maior prevalência de infecção clássica pelo HCV em pacientes em HD(FISSELL et al., 2004)(SAUNE et al., 2011); (ii) perspectiva do emprego de técnicas diagnósticas de IOHCV nestes pacientes antes do início da HD(CASTILLO et al., 2004); (iii) maior dificuldade para identificação de agressão hepática nos pacientes com DRC pelo níveis

séricos mais reduzidos de aminotransferases em virtude da hemodiluição (SETTE; LOPES, 2014) e, finalmente, (iv) possibilidade de tratamento do HCV com novos antivirais de ação direta com elevada eficácia e poucos efeitos colaterais (ROTH et al., 2015).

Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar a prevalência e aspectos epidemiológicos das IOHCV em pacientes com DRCPD.

PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado estudo de corte transversal de outubro de 2015 a abril de 2017 onde foram avaliados pacientes com DRCPD assistidos no ambulatório de DRC do Serviço de Nefrologia da Universidade Federal de Pernambuco. Foram incluídos pacientes adultos, com tempo de acompanhamento maior do que 3 meses e com *clearance* de creatinina estimado menor do que 60 mL/min/1.73m². Foram excluídos gestantes, puérperas, portadores de glomerulopatias e aqueles com infecção pelo HBV (HBsAg positivo), HCV (anti-HCV positivo) e HIV (anti-HIV positivo).

Após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, os pacientes foram submetidos a questionário que continha dados demográficos (sexo, idade, cor de pele), clínicos (estágio e etiologia da doença renal crônica), fatores de risco para aquisição das hepatites virais (hemotransfusão, tatuagem, piercing, uso de droga injetáveis). Em seguida foram coletados 20 mL de sangue para exames laboratoriais bioquímicos, sorológicos e virológicos.

Os níveis séricos de aminotransferases, aspartato amino-transferase (AST) e alanino amino-transferase (ALT) e da creatinina foram determinados por método automatizado (UV Diasys-Architect c8000, Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). O *clearance* de creatinina foi avaliado pela fórmula de CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (LEVEY et al., 2009)

A avaliação da infecção viral incluiu a pesquisa no soro de pacientes do anti-HCV por ELISA 3 geração, teste imunocromatográfico rápido para determinação qualitativa de antígeno superfície Hepatite B (HBsAg) e imunoensaio para Anti-HBs por quimioluminometria direta utilizando o sistema automatizado ADVIA Centaur[®]; e para o Anti-HBc qualitativo total utilizando o imunoensaio enzimático por quimiluminescência

IMMULITE 2000® (Siemens Healthcare Diagnósticos S.A, Brasil). Pacientes com resultados negativos na pesquisa de anti-HCV e HBsAg foram incluídos no estudo de IOHCV.

Detecção do HCV

Sangue periférico colhido em tudo seco foi inicialmente centrifugado à 3000 xg por 7 min em temperatura ambiente para obtenção do soro. Em seguida 2 mL do soro foram adicionados sob um tampão de sacarose 10%, numa proporção de 1:1 e ultracentrifugado à 100.000 x g por 17h à 4° C. O precipitado obtido através da ultracentrifugação foi eluído em 200 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) RNase-free (Invitrogen, California - USA). Adicionalmente, o sangue periférico coletado com anticoagulante foi submetido ao gradiente de densidade pelo ficoll-paque (GE Healthcare, Little Chalfont - UK) para obtenção de PBMC. Amostras de soro ultracentrifugado e de PBMC foram submetidas à extração de RNA total com o reagente *TRIzol* (Invitrogen), e síntese de cDNA utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante.

A detecção do HCV em amostra de soro ultracentrifugado e do PBMC foi realizada através da reação em cadeia polimerase (PCR) preparada com 100 ng de cDNA, 5 µM dos primers específicos para amplificação do genoma de HCV, UTRLC1 (5'-CAAGCACCTATCAGGCAGT-3') e UTRLC2 (5'-CTTCACGCAGAAAGCGTCTA-3'), tampão 1x PCR Rxn (Invitrogen Life Technologies, California - USA), 5 mM de MgCl₂ e 10 pmol de dNTPs. As condições de reação consistiram em um ciclo inicial de 10 min a 95°C seguidos por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e ao final uma extensão de 5 min a 72°C realizadas em um termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA). Os controles positivo e negativo consistiram de uma amostra de paciente sabidamente positivo para hepatite C clássica e o mix de PCR sem adição de DNA, respectivamente. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%, e visualizado no gel corado com o SYBR safe através do transiluminador L-PIX (Loccus, São Paulo - Brasil). A presença de fragmento de cerca de 230 pares de base na ausência de bandas inespecíficas foi considerada positivo. O resultado positivo foi confirmado por nova PCR a partir de outra amostra do paciente processada separadamente.

Foram considerados pacientes com IOHCV aqueles que apresentaram a pesquisa por PCR do HCV-RNA positiva no soro ultracentrifugado ou nos PBMC. Caso o HCV-RNA

fosse positivo no ultracentrifugado, o paciente era submetido a pesquisa no soro não ultracentrifugado para confirmar o diagnóstico de IOHCV.

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco inscrita sob o número de CAAE: 50121315.3.0000.5208.

RESULTADOS

Foram avaliados 154 pacientes e incluídos 123 (24 pacientes não foram incluídos por apresentarem tempo de acompanhamento < 3 meses e 7 por recusa em participar). Destes, 32 foram excluídos, sendo 23 pacientes com glomerulopatias, 3 por apresentarem sorologia positiva para HIV, 3 para HCV e 2 para HBV, além de 1 paciente por apresentar impossibilidade de coleta dos exames por dificuldade de punção venosa.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos 91 pacientes estão descritas na **Tabela 1**. A prevalência de IOHCV foi de 16,5% (15/91) sendo 14 identificados em PBMC e um no ultracentrifugado do soro. Dos 91 pacientes avaliados, 2 apresentaram amostra insuficiente para as análises sorológicas do HBV. Dos 89 pacientes analisados, 75 (82,4%) apresentavam Anti-HBc negativo, 9 (9,8%) positivo e 05 (5,5%) indeterminado e o Anti-HBs foi positivo em 44 (49,4%) dos pacientes.

Tabela 1 - Distribuição dos parâmetros clínicos de acordo com a ocorrência de infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes com doença renal crônica pré dialítica - HC-UFPE - outubro de 2015 a outubro de 2017

	Total (%) (n=91)		Hepatite C oculta				p
			Sim (%)		Não (%)		
			(n=15)		(n=76)		
Idade	62,4 ± 13,1		69,4 ±7,9		60,9 ± 13,5		0,002*
Idade ≥ 60 anos							0,001*
Sim	59	(64,8)	15	(100)	44	(57,9)	
Não	32	(35,2)	0	(0)	32	(42,1)	
Sexo							0,323***
Masculino	44	(48,4)	9	(60)	35	(46,1)	

Feminino	47	(51,6)	6	(40)	41	(53,9)	
Raça							0,719**
Pardo	50	(54,9)	7	(46,7)	43	(56,6)	
Branco	30	(33,0)	6	(40,0)	24	(31,6)	
Negro	11	(12,1)	2	(13,3)	9	(11,8)	
IMC	27,1±4,4		27,4±4,7		27,0±4,3		0,750*
TFG (mL/min/1.73m²)	21,6±10,3		24,6±10,6		21,0±10,2		0,231*
Estágio da DRC							0,580**
IIIa	2	(2,2)	0	(0)	2	(2,7)	
IIIb	22	(24,4)	6	(40,0)	16	(21,3)	
IV	38	(42,2)	5	(33,3)	33	(44,0)	
V	28	(31,1)	4	(26,7)	24	(32,0)	
Etiologia da DRC							0,019**
Multifatorial	31	(34,1)	11	(73,3)	20	(26,3)	
DM	26	(28,6)	1	(6,70)	25	(32,9)	
HAS	19	(20,9)	3	(20,0)	16	(21,1)	
DRPAD	7	(7,70)	0	(0)	7	(9,20)	
Outros	1	(1,1)	0	(0)	1	(1,3)	
ALT	18,1 (14,2 ; 23,2)		17,9 (15,2 ; 20,9)		18,1 (14,2 ; 24,7)		0,859 ^a
AST	19,5 (16,6 ; 24,8)		18,1 (17 ; 22,6)		19,5 (16,6 ; 25,3)		0,713 ^a

IMC: Índice de massa corpórea; **TFG:** taxa de filtração Glomerular; **DRC:** doença renal crônica; **DM:** diabetes Mellitus; **HAS:** hipertensão arterial sistêmica; **DRPAD:** doença renal policística autossômica dominante; **ALT:** alanina aminotransferase **AST:** Aspartato aminotransferase; *Teste T de Student ** Teste exato de Fischer; *** Teste Qui-quadrado de Pearson, ^a Teste Mann-Whitney

A IOHCV apresentou relação com a idade uma vez que pacientes mais idosos apresentaram maior risco de apresentar a infecção quando comparado aos mais jovens ($69,4 \pm 7,9$ vs. $60,9 \pm 13,5$; $p=0.002$). A etiologia multifatorial da DRC foi observada em 9 dos 14 casos (73,3%) dos pacientes com IOHCV e foi muito mais frequente do que nos casos sem IOHCV ($p= 0,019$). Não houve diferença entre os níveis séricos de aminotransferases entre os grupos com e sem IOHCV.

Os fatores de risco associados a infecção por hepatites virais foram avaliados e descritos na **Tabela 2**, de acordo com a ocorrência de IOHVC. Ter realizado cirurgia antes da

coleta dos exames foi o único fator de risco mais prevalente em pacientes sem IOHCV do que nos infectados.

Tabela 2 - Distribuição dos fatores de risco para hepatites virais de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes com doença renal crônica pré-dialítica - HC-UFPE - outubro de 2015 a outubro de 2017

	Total (%) (n=91)		Hepatite C oculta				p
			Sim (%)		Não (%)		
			(n=15)		(n=76)		
Piercing							
Sim	0	0	0	0	0	0	
Não	91	(100)	15	(100)	76	(100)	
Tatuagem							1,000*
Sim	3	(3,3)	0	(0)	3	(3,9)	
Não	88	(96,7)	15	(100)	73	(96,1)	
Acupuntura							1,000*
Sim	1	(1,1)	0	(0)	1	(1,3)	
Não	90	(98,9)	0	(0)	7	(98,7)	
Infecção Sexualmente Transmissível							0,509*
Sim	22	(24,2)	5	(33,3)	17	(22,4)	
Não	69	(75,8)	10	(66,7)	59	(77,6)	
Uso de preservativo							1,000*
Regular	4	(4,4)	0	(0)	4	(5,3)	
Irregular	15	(16,5)	2	(13,3)	13	(17,1)	
Nunca	72	(79,1)	13	(86,7)	59	(77,6)	

* Teste exato de Fischer; ^a p < 0,05

A presença de anticorpos contra antígenos do core (anti-HBc total) e contra antígenos de superfície (anti-HBs) foi mais frequente em pacientes com IOHCV quando comparados a pacientes não infectados, assim como a presença da sorologias positivas para Anti-HBs e Anti-HBc em associação, conforme se observa na **Tabela 3**. Quando avaliados isoladamente os pacientes que haviam apresentado contato com o vírus HBV estes apresentaram maior prevalência de IOHCV independentemente de terem sido vacinados (p=0,05). Não foi encontrada relação entre a ocorrência de IOHCV e sexo, cor de pele ou estágio da DRC.

Também não foi observada relação entre a IOHCV com fatores de risco para hepatites virais como: transfusão, tatuagens, piercing e uso de drogas injetáveis.

Tabela 3 - Distribuição dos anticorpos contra o vírus da hepatite B de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 89 pacientes com doença renal crônica - HC-UFPE - outubro de 2015 a outubro de 2017

	Total (%) (n=89)		Hepatite C oculta				p
			Sim (%)		Não (%)		
			(n=14)		(n=75)		
Anti-HBs +Anti-HBc total							
Positivo	13	(14,6)	7	(50)	6	(8)	0,001*
Anti-HBs							
Positivo	31	(34,8)	4	(28,6)	27	(36)	0,590*
Anti-HBs +Anti-HBc total							
Negativo	45	(50,6)	3	(21,4)	42	(56)	0.018*

* Teste exato de Fischer; ^a p < 0,05

DISCUSSÃO

Este foi o primeiro estudo que descreveu a ocorrência de IOHCV em pacientes com DRCPD. Sabe-se que pacientes com DRCPD apresentam maior ocorrência de infecção pelo HCV na forma clássica do que a população geral com prevalência de 3,9% a 7,3%, sendo até 7 vezes maior do que na população controle estudada. (LI CAVOLI et al., 2011) (LEMOS et al., 2008) (IWASA et al., 2008),

Uma das possibilidades para a elevada prevalência de IOHCV (16,5%) em nosso estudo poderia ser decorrente da baixa sensibilidade dos testes ELISA, ou seja, de resultados falso negativos do anti-HCV. Porém, nesse estudo, os pacientes foram submetidos a pelo menos duas pesquisas do anti-HCV. A primeira no diagnóstico da DRC e a segunda como critério de inclusão no estudo, ambas com resultados negativos e empregando ensaio imuno enzimático de terceira geração que apresenta acurácia próxima a 100% (KUMAR, 2014). A

outra possibilidade seria decorrente da deficiência imunológica dos pacientes com DRCPD que não seriam capazes de produzir anticorpos anti-HCV em títulos detectáveis.

Ainda poderíamos considerar a possibilidade de resultado falso positivo na reação de PCR para detecção do genoma viral na amostra clínica; contudo, seria pouco provável, pois além das diferentes etapas no procedimento serem realizadas em ambientes diferentes em fluxo laminar com reagentes de qualidade, os controles da reação foram adequados, e amostras com resultado positivo foram preparadas com a mesma mistura de reação de amostras com resultado negativo. Além do mais, resultado positivo foi confirmado por nova PCR a partir de outra alíquota de amostra clínica do paciente.

Não se sabe ao certo a relevância prática destes achados. Contudo, a alta frequência da IOHCV neste grupo pode ter papel significativo na transmissibilidade da doença dentro das unidades de HD. Neste estudo, a grande maioria dos pacientes (14/15) com IOHCV apresentava o genoma viral em PBMC os tornando potenciais transmissores da doença (CASTILLO, 2005). Além disso, cerca de 50% dos pacientes infectados não apresentam fatores de risco identificáveis para infecção pelo HCV (MEMON; MEMON, 2002)

Epidemiologicamente, em estudo filogenético realizado por Castillo e cols., foi constatado que pacientes com IOHCV apresentam transmissibilidade intrafamiliar elevada, semelhante aos pacientes com infecção crônica pelo HCV (CASTILLO et al., 2009). Adicionalmente, Roque-Cuellar e cols. avaliaram a resposta imunológica e a presença de IOHCV em parceiro heterossexuais de pacientes com a forma clássica da infecção e constataram resposta imunológica específica $CD4^+$ e $CD8^+$ e maior prevalência de IOHCV nos parceiros quando comparados a parceiros heterossexuais não infectados (ROQUE-CUÉLLAR et al., 2011).

Além de terem sido excluídos pacientes com glomerulopatias, uma vez que estes podem apresentar prevalência de até 39% de IOHCV, nossos resultados são fortalecidos pelo fato de terem sido utilizadas duas técnicas para a identificação da IOHCV, tanto a ultracentrifugação, quanto a identificação do genoma viral em PBMC's, o que aumenta a chance de detecção da IOHCV. De fato, Castillo e cols demonstraram que a positividade para o PCR para HCV em PBMC correspondeu a 82% dos casos positivos para IOHCV e, quando utilizada a ultracentrifugação, houve aumento do numero de pacientes positivos e, em nenhum dos casos, o exame foi positivo nas duas técnicas (CASTILLO et al., 2014).

A IOHCV esteve associada a maior idade, a ausência de cirurgia prévia, a etiologia multifatorial da DRC e a positividade para anticorpos de contato prévio com o HBV (Anti-HBc) e/ou de vacinação (Anti-HBs).

Certamente, pacientes mais idosos estão mais expostos a contaminação durante a vida e apresentam mais co-morbidades conforme descrito em metanálise publicada em 2016 por Alvarez e cols. (ALVAREZ; SMALDONE; LARSON, 2016) . Alguns autores constataram que a idade é fator de risco independente para aquisição da infecção pelo HCV (MINDIKOGLU; MILLER, 2009). Adicionalmente, estudo americano revelou que cerca de 75% dos pacientes infectados pelo HCV nasceram entre 1945-1965, os chamados *Baby Boomers*, após a segunda guerra mundial (SMITH et al., 2012). No entanto, ter sido submetido a procedimento cirúrgico foi fator de proteção para IOHCV, apesar da fraca significância estatística ($p=0.05$), o que é discordante da literatura (KARACA et al., 2006)(MARTÍNEZ-BAUER et al., 2008)(GAETA et al., 1999), porém não foi encontrada justificativa para tal achado paradoxal.

Pacientes com DRC de etiologia multifatorial foram aqueles com mais co-morbidades e, por conseguinte, aqueles mais expostos à convivência em ambientes hospitalares e a procedimentos propedêuticos e terapêuticos, fatores de risco conhecidos para infecção pelo HCV (MARTÍNEZ-BAUER et al., 2008). De fato, estudo caso controle realizado por Perez e cols. nos Estados Unidos, com casos agudos e sintomáticos de infecção pelo HCV, realizado com indivíduos maiores de 55 anos, constataram que a exposição ao ambiente de saúde com infusão de medicamentos intravenosos esteve relacionado ao risco de 2.7 vezes maior de infecção por HCV do que nos controles, com risco atribuível a exposição de 37% (OR 5 2.7; 95% CI: 1.3 - 5.8) (PERZ et al., 2013).

Adicionalmente, pacientes com IOHCV apresentaram maior positividade para o anti-HBc e o anti-HBs quando comparados aos não infectados. Sabe-se também que pacientes com infecção pelo HCV apresentam maior chance de contaminação pelo HBV, um vez que os fatores de risco para transmissão destas infecções são semelhantes (COOPER; KILBY, 2004). Possivelmente, a positividade para anti-HBs se deveu a maiores exposição destes pacientes a serviços de saúde por suas co-morbidades e maiores taxas de vacinação.

Este estudo apresentou algumas limitações, dentre elas destacam-se: a não quantificação da carga viral e a genotipagem que poderiam avaliar fatores epidemiológicos e

de transmissibilidade desta infecção, além de não ter sido realizado a identificação de HCV-RNA no plasma não ultracentrifugado de todos os pacientes.

Não se sabe ao certo os motivos que levam ao surgimento da forma oculta da infecção pelo HCV. Especula-se que fatores relacionados ao vírus podem estar envolvidos nesta forma de infecção, conforme descrito em estudos genômicos onde variações genéticas entre diferentes cepas virais de HCV configuram mecanismo de sobrevivência viral, contribuindo para sua patogenicidade e resistência frente ao sistema imunológico do hospedeiro (PARK et al., 2014)(HUMPHREYS et al., 2012). Especula-se também que fatores relacionados ao hospedeiro podem estar envolvidos na forma oculta de infecção pelo HCV. De certo, a resposta imune celular específica ($CD4^+$ e $CD8^+$) nos pacientes com IOHCV encontra-se presente, no entanto, de maneira menos eficaz em relação a grupo controle sem infecção, contudo, mais intensa do que naqueles com a forma clássica da doença (QUIROGA et al., 2006).

Adicionalmente, embora a maioria dos pacientes infectados apresente uma resposta imune celular específica ao HCV, somente 20% dos indivíduos infectados são capazes de realizar o *clearance* viral na fase aguda da doença (LECHNER et al., 2000)(COX et al., 2005). De fato, Burke e cols. observaram que pacientes incapazes de realizar o *clearance* viral, apresentam repostas celulares mais fracas e constataram a diminuição do número de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ nestes indivíduos (BURKE; COX, 2010). Além disso, diferenças existentes entre as moléculas do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), podem direcionar respostas imunes pouco eficazes, já que alguns supertipos de HLA afetam a afinidade de reconhecimento e ligação dos linfócitos T à epítomos antigênicos (KUNIHOLM et al., 2010).

Porém, o tratamento da IOHCV pode ser realizado com terapia antiviral conforme relatado por Pardo e cols.. Estes autores realizaram tratamento com interferon peguilado e ribavirina por 6 meses em 10 pacientes com IOHCV, que apresentavam anormalidades nos níveis séricos de enzimas hepáticas associado a hepatite crônica na biópsia e que apresentaram detecção do HCV-RNA por PCR em PBMC. Ao final do tratamento, 60% dos pacientes apresentaram normalização dos níveis séricos de ALT e em 70% dos casos o HCV-RNA não foi mais identificado nas células mononucleares, sugerindo comportamento semelhante ao da infecção pelo HCV(PARDO et al., 2006).

CONCLUSÃO

A ocorrência de IOHCV em pacientes com DRCPD neste estudo foi elevada e esteve relacionada com fatores de risco conhecidos para infecção pelo HCV. Novos estudos serão necessários para avaliar a influência deste tipo de infecção na transmissibilidade desta virose e o papel do tratamento dos pacientes com IOHCV.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não seria possível sem a colaboração e gentileza dos nossos pacientes.

Agradecemos ao Laboratório Aggeu Magalhães pela disponibilização do material e dos funcionários e aos profissionais do ambulatório de doença renal crônica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum dos pesquisadores apresentam conflito de interesses.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) sob o número de protocolo 429736-2016/9.

REFERENCIAS

- ALVAREZ, K. J.; SMALDONE, A.; LARSON, E. L. Burden of Hepatitis C Virus Infection Among Older Adults in Long-Term Care Settings: a Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, n. 4, p. 13, 25 abr. 2016.
- BARRIL, G. et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, n. 12, p. 2288–92, dez. 2008.
- BERGMAN, S. et al. Hepatitis C infection is acquired pre-ESRD. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 45, n. 4, p. 684–9, abr. 2005.
- BURKE, K. P.; COX, A. L. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1–3, p. 216–227, 12 jul. 2010.
- CASTILLO, I. et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients in Whom the Etiology of Persistently Abnormal Results of Liver-Function Tests Is Unknown. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 2004.
- CASTILLO, I. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. **Gut**, v. 54, n. 5, p. 682–685, 1 maio 2005.
- CASTILLO, I. et al. Hepatitis C virus infection in the family setting of patients with occult hepatitis C. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 7, p. 1198–203, jul. 2009.
- CASTILLO, I. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. **Kidney International**, v. 86, n. 3, p. 619–624, 19 set. 2014.
- COOPER, C.; KILBY, D. Clinical Significance of Hepatitis B Core Antibody Positivity in HCV-Infected and HCV/HIV Coinfected Individuals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1335–1337, 1 maio 2004.
- COX, A. L. et al. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1741–1752, 6 jun. 2005.
- FISSELL, R. B. et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. **Kidney international**, v. 65, n. 6, p. 2335–42, jun. 2004.
- GAD, Y. Z. et al. Distinct immunoregulatory cytokine pattern in Egyptian patients with occult Hepatitis C infection and unexplained persistently elevated liver transaminases. **Asian journal of transfusion science**, v. 6, n. 1, p. 24–8, jan. 2012.
- GAETA, G. B. et al. Surgical procedures as a major risk factor for chronic hepatitis C virus infection in Italy: evidence from a case-control study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 207–210, 1999.
- GRANIERI, C. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in non alcoholic steatohepatitis and cryptogenetic liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, p. S91–S92, fev. 2011.
- HUMPHREYS, I. S. et al. HCV genotype-3a T cell immunity: specificity, function and impact of therapy. **Gut**, v. 61, n. 11, p. 1589–1599, 2012.

IWASA, Y. et al. Patterns in the prevalence of hepatitis C virus infection at the start of hemodialysis in Japan. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 12, n. 1, p. 53–57, 5 fev. 2008.

KARACA, Ç. et al. Risk factors for the transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish population. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 2, p. 365–369, 2006.

KUMAR, T. M. Immunoassay systems. 2014.

KUNIHOLM, M. H. et al. Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1514–1522, maio 2010.

LECHNER, F. et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 9, p. 1499–1512, 2000.

LEMOS, L. B. et al. Hepatitis C among predialysis patients: prevalence and characteristics in a large cohort of patients. **Nephron. Clinical practice**, v. 108, n. 2, p. c135-40, jan. 2008.

LEVEY, A. S. et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604, 5 maio 2009.

LI CAVOLI, G. et al. Incidence of hepatitis C virus infection in patients with chronic kidney disease on conservative therapy. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e514-6, ago. 2011.

MARTÍNEZ-BAUER, E. et al. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 1, p. 20–27, 2008.

MEMON, M. I.; MEMON, M. A. Hepatitis C: an epidemiological review. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 9, n. 2, p. 84–100, mar. 2002.

MINDIKOGLU, A. L.; MILLER, R. R. Hepatitis C in the Elderly: Epidemiology, Natural History, and Treatment. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 2, p. 128–134, fev. 2009.

PARDO, M. et al. Effect of anti-viral therapy for occult hepatitis C virus infection. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 23, n. 8, p. 1153–9, 15 abr. 2006.

PARK, C.-W. et al. Comparison of Quasispecies Diversity of HCV between Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma by Ultradeep Pyrosequencing. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

PERZ, J. F. et al. Case-control study of hepatitis B and hepatitis C in older adults: Do healthcare exposures contribute to burden of new infections? **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 917–924, mar. 2013.

QUIROGA, J. A et al. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. **Journal of virology**, v. 80, n. 22, p. 10972–9, nov. 2006.

ROQUE-CUÉLLAR, M. C. et al. Cellular immune responses and occult infection in seronegative heterosexual partners of chronic hepatitis C patients. **Journal of viral hepatitis**, v. 18, n. 10, p. e541-9, out. 2011.

ROTH, D. et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naïve and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4–5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. **The Lancet**, v. 386, n. 10003, p. 1537–1545, out. 2015.

SAAD, Y. Prevalence of occult hepatitis C in egyptian patients with non alcoholic fatty liver disease. **Open Journal of Internal Medicine**, v. 1, n. 2, p. 33–37, 2011.

SAUNE, K. et al. Decreased prevalence and incidence of HCV markers in haemodialysis units: a multicentric French survey. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 7, p. 2309–2316, 1 jul. 2011.

SETTE, L.; LOPES, E. Liver enzymes serum levels in patients with chronic kidney disease on hemodialysis: a comprehensive review. **Clinics**, v. 69, n. 4, p. 271–278, 2 abr. 2014.

SMITH, B. D. et al. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 61, n. RR-4, p. 1–32, 2012.

YOUSSEF, S. S. et al. Prevalence of occult hepatitis C virus in egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. **Hepatitis research and treatment**, v. 2012, p. 429784, jan. 2012.

6 RESULTADOS

6.2 ARTIGO 2

ARTIGO FORMATADO SEGUNDO AS ESPECIFICAÇÕES DO PERIÓDICO: *JOURNAL OF HEPATOLOGY* (ISSN 0168-8278)

Ocorrência de infecção Oculta pelo Vírus da Hepatite C em pacientes com Glomerulopatias

Autores: Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette¹, Edmundo Pessoa de Almeida² Lopes, Nathália Campello Guedes dos Anjos¹, Sávio Augusto Vieira de Oliveira³, Norma Lucena-Silva³

¹Disciplina de Nefrologia- Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco

²Disciplina de Gastroenterologia-Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal de Pernambuco

³Laboratório de Imunogenética do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz Pernambuco

RESUMO

INTRODUÇÃO: A infecção oculta pelo HCV (IOHCV) é caracterizada pela presença do genoma viral em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ou em amostras de soro submetidos a ultracentrifugação em pacientes com sorologia e PCR negativos na corrente sanguínea. A prevalência de IOHCV em pacientes com glomerulopatias não hereditárias foi demonstrado em apenas um estudo com ocorrência elevada, sugerindo associação etiopatológica entre o vírus e a doença renal. Porém, este estudo foi o único até então que teve como objetivo avaliar a ocorrência da IOHCV em pacientes com glomerulopatias e tem-se advogado que novos estudos sejam feitos com outras populações para que haja melhor entendimento entre a relação da IOHCV com as Glomerulopatias. **OBJETIVOS:** avaliar a ocorrência de IOHCV em pacientes com Glomerulopatias. **METODOLOGIA:** Foi realizado estudo transversal entre 2015-17 em adultos com Glomerulopatia não hereditária, tempo de acompanhamento > 3 meses e com biópsia renal com microscopia óptica e imunofluorescência com diagnóstico de Glomerulopatia. Foram excluídos gestantes, puérperas, pacientes com infecção pelo HBV (HBsAg positivo), HCV (anti-HCV positivo) e HIV (anti-HIV positivo). Foram considerados pacientes com IOHCV aqueles que apresentaram anti-HCV negativo, com pesquisa por PCR do HCV-RNA no plasma negativa, mas positiva no ultracentrifugado plasmático ou em células mononucleares periféricas (PBMC). **RESULTADOS:** Foram avaliados 91 pacientes e a prevalência de IOHCV foi de 13,2% (12/91) sendo 6 identificados em PBMC's e 6 no ultracentrifugado plasmático. A IOHCV apresentou associação com a idade, uma vez que pacientes mais jovens apresentaram maior probabilidade de apresentar a infecção quando comparado aos mais velhos ($33 \pm 8,8$ vs. $41,4 \pm 13,6$; $p=0,043$) e com o sexo masculino ($p=0,008$). Os pacientes com Nefropatia por IgA apresentaram a maior frequência de IOHCV (33,3%; 2/6), seguida pela GNMP (25%; 1/4); GESF/DLM (16,7%; 5/30) e de Nefrite lúpica com prevalência de 11,8% (4/34). **CONCLUSÃO:** a IOHCV apresentou elevada frequência em pacientes com glomerulopatias, sendo mais frequente nos casos do sexo masculino, em jovens e com Nefropatia por IgA. **PALAVRAS CHAVE:** Hepatite C; Glomerulopatias ; células polimorfonucleares; reação em cadeia da polimerase; hepatites virais.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Occult HCV infection (OCI) is characterized by the presence of the viral genome in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or in serum samples submitted to ultracentrifugation in patients with negative serology and PCR in the bloodstream. The prevalence of OCI in patients with non-hereditary glomerulopathies was demonstrated in only one study with high occurrence, suggesting an etiopathological association between the virus and renal disease. However, this study was the only study that aimed to evaluate the occurrence of OCI in patients with glomerulopathies and it has been suggested that new studies be done with other populations so that there is a better understanding between the relationship between OCI and glomerulopathies. **OBJECTIVES:** To evaluate the occurrence of OCI in patients with glomerulopathies. **METHODS:** A cross-sectional study was conducted between 2015-17 in adults with non-hereditary glomerulopathy, time of follow-up > 3 months and with renal biopsy with optical microscopy and immunofluorescence with a diagnosis of glomerulopathy. Pregnant women, postpartum women, patients with hereditary glomerulopathies and those with HBV infection (HBsAg positive), HCV (anti-HCV positive) and HIV (anti-HIV positive) were excluded. Patients with OCI were those with anti-HCV negative, with negative HCV-RNA PCR, but positive in plasma ultracentrifugation or in peripheral mononuclear cells (PBMC). **RESULTS:** Ninety-one patients were evaluated and the prevalence of OCI was 13.2% (12/91), six of which were identified in PBMC and six in plasma ultra-centrifugation. OCI was associated with age, since younger patients were more likely to present with infection when compared to older ones (33 ± 8.8 vs. 41.4 ± 13.6 , $p = 0.043$) and with the male gender ($p = 0.008$). Patients with IgA nephropathy presented the highest frequency of OCI (33.3%, 2/6), followed by Membranoproliferative glomerulonephritis (25%, 1/4); FSGS and / MCG (16.7%, 5/30) and lupus nephritis with a prevalence of 11.8% (4/34). **CONCLUSION:** OCI showed a high frequency in patients with glomerulopathies, being also more frequent in males, those with IgA Nephropathy and younger patients. **KEYWORDS:** Hepatitis C; Glomerulopathies ; polymorphic nuclear cells; polymerase chain reaction; viral hepatitis

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da infecção pela hepatite C (HCV) é realizado por meio da detecção de anticorpos contra proteínas virais e confirmado pela detecção do seu do ácido nucléico no soro (GHANY et al., 2009). No entanto, o uso de novas técnicas utilizando PCR altamente sensível em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e em amostras de soro submetidos a ultracentrifugação, tem revelado que pacientes com sorologia e PCR negativos podem apresentar o genoma viral na corrente sanguínea (BARTOLOME et al., 2007). Esta forma de infecção é denominada infecção oculta pelo HCV (IOHCV).

A IOHCV tem sido descrita tanto em pacientes com enfermidades hepáticas (doença hepática crônica criptogênica e doença hepática gordurosa não alcoólica)(GAD et al., 2012)(GRANIERI et al., 2011)(SAAD, 2011) quanto com doenças extra hepáticas (glomerulopatias, doenças linfoproliferativas e doença renal crônica dialítica) (CASTILLO et al., 2014)(YOUSSEF et al., 2012)(BARRIL et al., 2008).

Foi demonstrado, recentemente, elevada prevalência de IOHCV em pacientes com glomerulopatias não hereditárias, sugerindo associação etiopatológica entre o vírus e a doença renal (CASTILLO et al., 2014). Estes autores, ao analisarem 87 pacientes com diagnóstico de glomerulopatia, identificaram IOHCV em 39% dos pacientes com glomerulopatias não hereditárias quando comparados a 3,8% dos pacientes com glomerulopatias hereditárias. Neste estudo, o diagnóstico da infecção foi realizado por meio da identificação do genoma em PBMC ou por ultracentrifugação do soro. Adicionalmente, os níveis séricos de creatinina foram mais elevados e o *clearance* de creatinina reduzidos nos pacientes com IOHCV em relação aos pacientes não infectados.

Porém, este estudo foi o único ate então que teve como objetivo avaliar a ocorrência da IOHCV em pacientes com glomerulopatias e tem-se advogado que novos estudos sejam feitos com outras populações para que haja melhor entendimento entre a relação da IOHCV com as Glomerulopatias (KDIGO, 2017).

Cabe ressaltar que diversos estudos já demonstraram a relação etiopatológica entre a infecção clássica pelo HCV e a glomerulonefrite membranoproliferativa (YAMABE et al., 1995)(JOHNSON et al., 1993)(LOPES et al., 1999)

A elucidação desta associação se torna importante do ponto de vista prático devido a diversos fatores, entre eles: o fato de não se conhecer os mecanismos fisiopatológicos de várias Glomerulopatias, denominando-as idiopáticas; de muitas das glomerulopatias carecerem de terapia específica e que, frequentemente, evoluem para DRC terminal e, finalmente, que há tratamentos com poucos efeitos colaterais para pacientes com infecção clássica pelo HCV, até mesmo em pacientes com DRC avançada (ROTH et al., 2015).

Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar a ocorrência da IOHCV em pacientes com Glomerulopatias.

PACIENTES E METODOS

Foi realizado estudo de corte transversal de outubro de 2015 a abril de 2017 onde foram avaliados pacientes com Glomerulopatias acompanhados no Ambulatório de Glomerulonefrites do Serviço de Nefrologia da Universidade Federal de Pernambuco. Foram incluídos pacientes adultos, com tempo de acompanhamento maior do que 3 meses e com biópsia renal com microscopia óptica e imunofluorescência com diagnóstico de Glomerulopatia. Foram excluídos gestante, puérperas, pacientes com glomerulopatias hereditárias e aqueles com infecção pelo HBV (HBsAg positivo), HCV (anti-HCV positivo) e HIV (anti-HIV positivo).

Após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, os pacientes foram submetidos a questionário que continha dados demográficos (sexo, idade, cor de pele), clínicos (estágio e etiologia da doença renal crônica), fatores de risco para aquisição das hepatites virais (hemotransusão, tatuagem, piercing, uso de droga injetáveis). Em seguida foram coletados 20 mL de sangue para exames laboratoriais bioquímicos, sorológicos e virológicos.

Toda a análise bioquímica foi realizada através dos métodos cinéticos automatizados conforme descritos: para aminotransferases, aspartato amino-transferase (AST) e alanino amino-transferase (ALT) (UV Diasys-Architect c8000); para creatinina, método de *Jaffé* modificado (Architect Abbott). O *clearence* de creatinina foi avaliado pela fórmula de CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (LEVEY et al., 2009).

Também foram realizadas as pesquisas do anti-HCV por ELISA 3 geração (ADVIA Centaur[®]) ; teste imunocromatográfico rápido para determinação qualitativa de antígeno superfície Hepatite B (HBsAg) em amostras de soro (ADVIA Centaur[®]); imunoensaio para

Anti-HBs por quimioluminometria direta (ADVIA Centaur®); Anti-HBc qualitativo total utilizando o imunoensaio enzimático por quimiluminescência IMMULITE 2000® (Siemens Healthcare Diagnósticos S.A, Brasil). Os pacientes anti-HCV e HBsAg negativos foram submetidos a pesquisa da IOHCV.

Deteção do HCV

Sangue periférico colhido em tubo seco foi inicialmente centrifugado à 3000 xg por 7 min em temperatura ambiente para obtenção do soro. Em seguida 2 mL do soro foi adicionado sob um tampão de sacarose 10%, numa proporção de 1:1 e ultracentrifugado à 100.000 x g por 17h à 4° C. O precipitado obtido através da ultracentrifugação foi eluído em 200 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) RNase-free (Invitrogen, California - USA). Adicionalmente, o sangue periférico colhido com anticoagulante foi submetido ao gradiente de densidade pelo ficoll-paque (GE Healthcare, Little Chalfont - UK) para obtenção de PBMC. Amostras de soro ultracentrifugado e de PBMC foram submetidas à extração de RNA total com o reagente *TRIzol* (Invitrogen), e síntese de cDNA utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante.

A detecção do HCV em amostra de soro ultracentrifugado e do PBMC foi realizada através da reação em cadeia polimerase (PCR) preparada com 100 ng de cDNA, 5 µM dos primers específicos para amplificação do genoma de HCV, UTRLC1 (5'-CAAGCACCTATCAGGCAGT-3') e UTRLC2 (5'-CTTCACGCAGAAAGCGTCTA-3'), tampão 1x PCR Rxn (Invitrogen Life Technologies, California - USA), 5 mM de MgCl₂ e 10 pmol de dNTPs. As condições de reação foram consistiram em um ciclo inicial de 10 min a 95°C seguidos por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e ao final uma extensão de 5 min a 72°C realizadas em um termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA). Os controles positivo e negativo consistiram de uma amostra de paciente sabidamente positivo para hepatite C clássica e o mix de PCR sem adição de DNA, respectivamente. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%, e visualizado no gel corado com o SYBR safe através do transiluminador L-PIX (Loccus, São Paulo - Brasil). A presença de fragmento de cerca de 230 pares de base na ausência de bandas inespecíficas foi considerada positivo. O resultado positivo foi confirmado por nova PCR a partir de outra amostra do paciente processada separadamente.

Foram considerados pacientes com IOHCV aqueles que apresentaram a pesquisa por PCR do HCV-RNA positiva no soro ultracentrifugado ou nos PBMC. Caso o HCV-RNA

fosse positivo no ultracentrifugado, o paciente era submetido a pesquisa no soro não ultracentrifugado para confirmar o diagnóstico de IOHCV.

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco inscrita sob o número de CAAE: 50121315.3.0000.5208.

RESULTADOS

Foram avaliados 171 pacientes, dos quais 73 não foram elegíveis, 61 por terem biópsias inadequadas, 8 por serem menores de 18 anos e 4 com por recusa. Dos 98 restantes incluídos no estudo, 7 foram excluídos, sendo 3 gestantes, 1 com sorologia positiva para HCV e 3 por apresentarem impossibilidade de coleta dos exames por dificuldade de punção venosa.

As características demográficas, clínicas e laboratoriais estão descritas na **Tabela 1**. Entre os 91 pacientes incluídos, a prevalência de IOHCV foi de 13,2% (12/91) sendo 6 identificados em PBMC's e 6 no ultracentrifugado plasmático. Nenhum paciente apresentou positividade em ambos os testes. Todos os pacientes avaliados apresentavam anti-HCV e HBsAg negativos, um paciente apresentava o anti-HBc positivo, 2 indeterminados e em 02 pacientes não houve amostra suficiente para o teste. O anti-HBs foi positivo em 29 (32,6%) pacientes e os pacientes indeterminados foram anti-HBs negativos.

Tabela 1 - Distribuição dos parâmetros clínicos de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes Glomerulopatias - HC-UFPE – março 2016 a abril de 2017

	Total (%) (n=91)		Infecção Oculta pelo HCV				P
			Sim (%) (n=12)		Não (%) (n=79)		
Idade (anos) (média ±DP)	40,3 ± 13,3		33 ±8,8		41,4 ± 13,6		0,043*
Sexo							0,008***
Masculino	34	(37,4)	9	(75)	25	(31,6)	0,501**
Feminino	57	(62,6)	3	(25)	54	(68,4)	
Raça							0,501**
Pardo	54	(59,3)	8	(66,7)	46	(58,2)	
Branco	32	(35,2)	3	(25,0)	29	(36,7)	

Negro	5	(5,5)	1	(8,3)	4	(5,1)	
IMC (média ±DP)	25,3±5,1		23,4±3,9		25,5±5,2		0,213*
TFG (mL/min/1.73m²)(média ±DP)	79,0±34,9		87,5±30,7		77,7±35,5		0,367*
AST mediana (p25-p75)	20,6 (73,7 ; 10,5)		21(28,1 ; 11,7)		26,1(73,7 ; 10,5)		0,713 ^a
ALT mediana (p25-p75)	17,0(164 ; 6,0)		16,9 (53 ; 6)		20,8(164,9 ; 6,8)		0,859 ^a
Etiologia da Glomerulopatia							0,448**
Nefrite Lúpica	34	(37,4)	4	(33,3)	30	(38,0)	
Doença de Lesões Mínimas/GESF	30	(33,0)	5	(41,7)	25	(31,6)	
IGA	6	(6,6)	2	(16,7)	4	(5,1)	
Membranosa	11	(12,2)	0	(0)	11	(13,9)	
Membranoproliferativa	4	(4,4)	1	(8,3)	3	(3,8)	
Vasculites	4	(4,4)	0	(0)	4	(5,1)	
Outras	2	(2,2)	0	(0)	2	(2,5)	

IMC: Índice de massa corpórea; **TFG:** taxa de filtração Glomerular; *Teste T de Student ** Teste exato de Fischer; *** Teste Qui-quadrado de Pearson, ^a Teste Mann-Whitney

A IOHCV apresentou associação com a idade, uma vez que pacientes mais jovens apresentaram maior probabilidade de apresentar a infecção quando comparado aos mais velhos ($33 \pm 8,8$ vs. $41,4 \pm 13,6$; $p=0,043$) e com o sexo masculino ($p=0,008$). Não houve diferença entre a raça, IMC, taxa de filtração glomerular ou entre os níveis séricos de aminotransferases entre os grupos.

Os pacientes com Nefropatia por IgA apresentaram a maior frequência de IOHCV (33,3%; 2/6), seguida pela GNMP (25%; 1/4); GESF/DLM (16,7%; 5/30) e de Nefrite lúpica com prevalência de 11,8% (4/34), mas sem diferença estatística entre elas ($p=0,448$). Os pacientes com glomerulonefrite membranosa, vasculites ou GP de outras etiologias não apresentaram IOHCV.

Os fatores de risco associados a infecção por hepatites virais estão descritos na **Tabela 2**, de acordo com a ocorrência de IOHVC. Não houve diferença entre os fatores de risco entre

os grupos com e sem IOHCV. Também não houve diferença entre a ocorrência de IOHCV entre pacientes com glomerulopatias primárias e secundárias conforme **Tabela 3**, nem associação entre a presença de crescentes (11,5% vs 10,5%; $p=1.0$).

Tabela 2 - Distribuição dos fatores de risco para infecção por hepatites Virais de acordo com a ocorrência de Infecção oculta pelo HCV em 91 pacientes com Glomerulopatias - HC-UFPE - março 2016 a abril de 2017

	Total (%) (n=91)		Infecção Oculta pelo HCV				P
			Sim (%) (n=12)		Não (%) (n=79)		
Hemodiálise Prévia							
Sim	18	(19,8)	1	(8,3)	17	(21,5)	0,448*
Não	73	(80,2)	11	(91,7)	62	(78,5)	
Drogas injetáveis							
Sim	1	(1,0)	0	(0)	1	(1,3)	1,000*
Não	90	(98,9)	12	(100)	78	(98,7)	
Exposição ocupacional							
Sim	3	(3,3)	1	(8,3)	2	(2,5)	0,349*
Não	88	(96,7)	11	(91,7)	77	(97,5)	
Familiar contaminado							
Sim	7	(7,7)	2	(16,7)	5	(6,3)	0,230*
Não	84	(92,3)	10	(83,3)	74	(93,7)	
Cirurgia Prévia							
Sim	58	(63,7)	7	(58,3)	51	(64,6)	0,751*
Não	33	(36,3)	5	(41,7)	28	(35,4)	
Hemotransfusão							
Sim	28	(30,8)	1	(8,3)	27	(34,2)	0,096*
Não	63	(69,2)	11	(91,7)	52	(65,8)	
Piercing							
Sim	9	(9,9)	3	(25)	6	(7,6)	0,094*
Não	82	(90,1)	9	(75)	73	(92,4)	
Tatuagem							
Sim	10	(11)	3	(25)	7	(8,9)	0,124*
Não	81	(89)	9	(75)	72	(91,1)	
Acupuntura							
Sim	5	(5,5)	1	(8,3)	4	(5,1)	0,515*
Não	86	(94,5)	11	(91,7)	75	(94,9)	
Infecções Sexualmente Transmissível							
Sim	13	(14,3)	2	(16,7)	11	(13,9)	0,697*
Não	78	(85,7)	10	(83,3)	68	(86,1)	
Uso de preservativo							
Regular	19	(20,9)	4	(33,3)	15	(19,0)	0,266*

Irregular/nunca

72 (79,1) 8 (66,7) 64 (81,0)

* Teste exato de Fischer

Tabela 3 - Prevalência de Infecção Oculta pelo HCV entre Pacientes com Glomerulopatias Primárias e Secundárias HC-UFPE - março 2016 a abril de 2017

	Total (%) (n=91)		Hepatite C oculta		p	
			Sim (%) (n=12)	Não (%) (n=79)		
Glomerulopatia						0,426*
Primária	51	(56,0)	8	(66,7)	43	(54,4)
Secundária	40	(44,0)	4	(33,3)	36	(45,6)

Primárias: GESF, Lesões mínimas, membranosa, nefropatia por IgA e membranoproliferativa; **Secundárias:** Nefrite Lúpica, Vasculites e síndrome hemolítico urêmica; * Teste exato de Fischer

DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada ocorrência de IOHCV em 12 dos 91 dos pacientes (13,2%) portadores de Glomerulopatias, sendo o maior estudo realizado até então em pacientes com glomerulopatias não hereditárias. A metade dos pacientes com IOHCV apresentavam a pesquisa do HCV-RNA por PCR positiva no soro ultracentrifugado e a outra metade em PBMC.

Em estudo semelhante, Castillo e cols. evidenciaram a IOHCV em 39% de 89 pacientes com glomerulopatias não hereditárias e de 3,8% em pacientes com glomerulopatias hereditárias e sugeriu papel etiopatológico entre a IOHCV e as glomerulopatias, esta frequência foi maior do que a encontrada em nosso estudo, talvez por diferença de prevalência local da infecção pelo HCV ou por superestimação da ocorrência por Castillo e cols (CASTILLO et al, 2014).

Em nosso estudo, houve maior ocorrência de IOHCV em pacientes mais jovens. Estes achados podem ser justificados pela alta frequência de pacientes com nefrite lúpica e GESF/DLM, sabidamente mais frequentes em jovens, enquanto que não houve pacientes com

IOHCV portador de Glomerulonefrite Membranosa, que por sua vez ocorre habitualmente em pacientes acima de 50 anos (MCGROGAN; FRANSSEN; DE VRIES, 2011). Também foi encontrado maior ocorrência de IOHCV em pacientes do sexo masculino. Sabe-se que pacientes do sexo masculino apresentam prevalência de infecção clássica pelo HCV cerca de duas vezes maior do que do sexo feminino, como demonstrado por Armstrong and cols. em estudo populacional norte americano (ARMSTRONG et al., 2006). Postula-se também que o sexo feminino apresente capacidade de clareamento do vírus mais eficiente após a primo-infecção e portanto menor chance de cronicidade quando comparados a pacientes do sexo masculino (WANG et al., 2007).

Quanto a distribuição das glomerulopatias de acordo com a etiologia, a IOHCV apresentou maior frequência nos pacientes com nefropatia por IgA (33,3%). Este resultado corroborou o achado por Castillo e cols. que evidenciou que cerca de 50% dos pacientes com IgA apresentavam IOHCV.

De certo, estes achados são reforçados por McGuire e cols. que descreveram a ocorrência de nefropatia por IgA em 7 de 30 pacientes (23%) com cirrose por HCV clássica que foram submetidos a transplante hepático e realizaram biópsia renal durante o procedimento, mesmo sem apresentarem alterações renais (MCGUIRE et al., 2006).

Não houve associação entre os fatores de risco tradicionais para contaminação pelos vírus das hepatites virais e a ocorrência de IOHCV. Também não houve diferenças entre os grupos quando foram avaliadas as sorologias para o vírus B o que minimiza a possível relação etiopatológica entre o contato com o HBV e a presença de glomerulopatia.

Este estudo apresentou algumas limitações, dentre elas destacam-se: a não quantificação da carga viral e a genotipagem que poderiam avaliar fatores epidemiológicos e de transmissibilidade desta infecção, além de não ter sido realizada a pesquisa de HCV-RNA no plasma não ultracentrifugado de todos os pacientes.

Além de ter utilizado duas técnicas para detecção da IOHCV, este estudo também apresenta-se relevante por evidenciar em outra região demográfica além da europeia a alta ocorrência de IOHVC em pacientes com glomerulopatias, adicionando respaldo científico à possibilidade de associação etiopatológica entre as duas entidades.

CONCLUSÃO

Neste estudo, a IOHCV apresentou elevada frequência em pacientes com glomerulopatias não hereditárias, sendo mais frequente nos casos do sexo masculino. Novos estudos, entretanto, serão necessários para esclarecer a fisiopatologia da agressão renal provocada pelo HCV e as repercussões do tratamento antiviral sobre a glomerulopatia.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não seria possível sem a colaboração e gentileza dos nossos pacientes.

Agradecemos ao Laboratório Aggeu Magalhães pela disponibilização do material e dos funcionários. Este estudo e ao

CONFLITO DE INTERESSES

Nenhum dos pesquisadores apresentam conflito de interesses.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) sob o número de protocolo 429736-2016/9.

REFERENCIAS

- ARMSTRONG, G. L. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. **Annals of internal medicine**, v. 144, n. 10, p. 705–14, 16 maio 2006.
- BARRIL, G. et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, n. 12, p. 2288–92, dez. 2008.
- BARTOLOME, J. et al. Ultracentrifugation of Serum Samples Allows Detection of Hepatitis C Virus RNA in Patients with Occult Hepatitis C. **Journal of Virology**, v. 81, n. 14, p. 7710–7715, 15 jul. 2007.
- CASTILLO, I. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. **Kidney International**, v. 86, n. 3, p. 619–624, 19 set. 2014.
- GAD, Y. Z. et al. Distinct immunoregulatory cytokine pattern in Egyptian patients with occult Hepatitis C infection and unexplained persistently elevated liver transaminases. **Asian journal of transfusion science**, v. 6, n. 1, p. 24–8, jan. 2012.
- GHANY, M. G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 49, n. 4, p. 1335–74, abr. 2009.
- GRANIERI, C. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in non alcoholic steatohepatitis and cryptogenetic liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, p. S91–S92, fev. 2011.
- JOHNSON, R. J. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 7, p. 465–70, 18 fev. 1993.
- KDIGO. KDIGO 2017 clinical practice guideline on the prevention, diagnosis, evaluation and treatment of hepatitis C in CKD (final draft). **Kdigo**, n. February, 2017.
- LEVEY, A. S. et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604, 5 maio 2009.
- LOPES, L. M. V. et al. Glomerulonefrite associada à infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 1–6, fev. 1999.
- MCGROGAN, A.; FRANSSEN, C. F. M.; DE VRIES, C. S. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: A systematic review of the literature. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 2, p. 414–430, 2011.
- MCGUIRE, B. M. et al. Brief Communication: Glomerulonephritis in Patients with Hepatitis C Cirrhosis Undergoing Liver Transplantation. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 735, 16 maio 2006.
- ROTH, D. et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naïve and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4–5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. **The Lancet**, v. 386, n. 10003, p. 1537–1545, out. 2015.
- SAAD, Y. Prevalence of occult hepatitis C in egyptian patients with non alcoholic fatty liver disease.

Open Journal of Internal Medicine, v. 1, n. 2, p. 33–37, 2011.

WANG, C. C. et al. Acute Hepatitis C in a Contemporary US Cohort: Modes of Acquisition and Factors Influencing Viral Clearance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 10, p. 1474–1482, 2007.

YAMABE, H. et al. Hepatitis C virus infection and membranoproliferative glomerulonephritis in Japan. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 6, n. 2, p. 220–3, ago. 1995.

YOUSSEF, S. S. et al. Prevalence of occult hepatitis C virus in egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. **Hepatitis research and treatment**, v. 2012, p. 429784, jan. 2012.

6 RESULTADOS HBV-DNA

6.3 INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS E DOENÇA RENAL CRÔNICA PRÉ-DIÁLISE

Dos 91 pacientes avaliados no grupo de pacientes com DRCPD apenas 67 foram avaliados para a presença de IOHBV, uma vez que 24 pacientes apresentaram material insuficiente a realização da pesquisa do HBV-DNA por PCR. Dentre os indivíduos testados nenhum deles apresentou IOHBV.

Dentre os 91 pacientes com Glomerulopatias 82 foram avaliados para a presença de IOHBV, já que em 9 pacientes houve amostra insuficiente para realização da pesquisa do HBV-DNA por PCR. Dentre os indivíduos testados nenhum deles apresentou IOHBV.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foram avaliados dois grupos de pacientes com doença renal, um com doença renal crônica com taxa de filtração glomerular menor do que 30mL/min/1.73m² e com glomerulopatias. Em ambos os grupos foi evidenciada elevada ocorrência de IOHCV. Não foi encontrada IOHBV em ambos os grupos estudados.

No grupo de pacientes com DRCPD foi observada maior ocorrência de IOHCV em pacientes mais velhos, com DRC de etiologia multifatorial, submetidos a procedimento cirúrgico previamente e aqueles com contato prévio com o HBV. Já no grupo de pacientes com GP, foi observado maior ocorrência em pacientes mais jovens, do sexo masculino e em pacientes com nefropatia por IgA.

No entanto, novos estudos serão necessários para esclarecer a fisiopatologia da agressão renal provocada pelo HCV, as repercussões do tratamento antiviral sobre a glomerulopatia e para avaliar a influência deste tipo de infecção na transmissibilidade desta virose e o papel do tratamento dos pacientes com IOHCV e doença renal crônica.

APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO PADRONIZADO

NOME _____

PRONTUÁRIO _____ DN ____/____/____ IDADE _____

ENDEREÇO _____ BAIRRO _____

TELEFONE _____ CIDADE _____ DATA _____

CINTURA ABDOMINAL _____ cm PESO _____ Kg ALTURA _____ IMC _____

RAÇA ☐ NEGRO ☐ BRANCO ☐ PARDO ☐ AMARELA

ESCOLARIDADE ☐ Analfabeto ☐ Fundamental incompleto ☐ Fundamental completo ☐ Médio inc.
☐ Médio completo ☐ Superior

Diabetes		IAM	
Hipertensão		Obesidade	
Dislipidemia			
AVC			

SOROLOGIAS

☐ HCV ☐ HIV
☐ AgHbS ☐ Anti HBS
☐ Anti HBC

DADOS CLINICOS

GLOMERULOPATIA _____ NÚMERO DA BIÓPSIA _____

MO: crescentes S N Proliferação _____ esclerose _____

AT/FI _____ DATA BIÓPSIA _____

IF: _____

ETIOLOGIA DOENÇA RENAL CRÔNICA _____

IMUNOSUPRESSÃO ATUAL: _____

ANTECEDENTES

HEMODIÁLISE PRÉVIA		CIRURGIA		Tipo/data			
DROGAS ENDOVENOSAS		HEMOTRANSFUSÃO		Data	ACUMPUNTURA		
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL		PIERCING		Data	HISTÓRIA DST		
FAMILIAR CONTAMINADO		TATUAGEM		Data	PRESERVATIVO	Regular	Irregular/nunca

CLEARENCE DE CREATININA

CKD-EPI _____

ESTAGIO:

III



IV



V



APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) _____ para participar como **voluntário (a)** da pesquisa clínica **PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO OCULTA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS** que está sob a responsabilidade do pesquisador Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette, **Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, S/N- Cidade Universitária CEP 50670-420. Ambulatório de Nefrologia do Hospital das Clínicas – UFPE - 3º andar do prédio dos ambulatórios. Telefones para contato: **Celular** (81) 99747-7777; **Ambulatório:** (81) 2126.3733. e-mail: setteluis@hotmail.com e que está sob a orientação do **Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto;** **Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, S/N- Cidade Universitária CEP 50670-420. Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas – UFPE - 4º andar do prédio dos ambulatórios **Ambulatório:** (81) 2126.3633. e-mail: epalopes@uol.com.br

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento,

também sem nenhuma penalidade

Esta pesquisa que tem como **objetivo** determinar a presença de infecção oculta (escondidas) dos vírus das hepatites B e C, assim como suas características genéticas e como o meu sistema de defesa reage a presença ou não destes vírus. Este vírus pode estar presente no seu sangue mesmo sem o Sr.(a) não sentir nada ou se os testes feitos anteriormente tenham sido negativos. Todos estes exames serão realizados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e no Laboratório Central de Pernambuco (LACEN) **sem nenhuma despesa ou pagamento.**

Participar deste estudo não atrapalhará o seu atendimento normal no ambulatório, que continuará com a marcação como já é feita,. Todos os resultados dos exames que o Sr(a) vai fazer ficarão com o Sr(a) e também serão copiados no seu prontuário para que o médico que lhe acompanha no ambulatório saiba destes resultados. As informações desta pesquisa e os resultados dos exames que o Sr(a) fizer não serão publicados com o seu nome, sendo respeitada a sua privacidade.

Neste estudo o **Sr.(a) será convidado** a ser entrevistado(a), examinado(a) pelo médico pesquisador e também convidado(a) a doar uma amostra de sangue equivalente a 20 ml (uma colher das de sopa) de sangue do braço, que será utilizada nesse estudo e armazenadas para futuros estudos. **Os riscos** a que o Sr (a) estará exposto são aqueles relacionados com a coleta de sangue, ou seja, dor, infecção, sangramento e manchas arroxeadas no local da coleta, que serão minimizados com cuidados de higiene na coleta, realizado com material descartável e por profissional capacitado, e a pressão local após a coleta do sangue. Estes testes poderão **beneficiar** o Sr.(a) já que não são realizados de rotina e se for encontrado alguns destes vírus no seu sangue o Sr.(a) poderá ter acompanhamento especializado no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

O acompanhamento da sua doença não será alterado, caso desista de participar deste estudo. Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências de saúde da UFPE e qualquer dúvida o Sr. (a) poderá entrar em contato com o pesquisador responsável. Os pesquisadores estão cientes que o Sr. (a) estará livre em qualquer momento da pesquisa para suspender essa autorização de participação suspender **sem que haja nenhum constrangimento ou prejuízo no tratamento dele**. Fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Sendo assim, concordo em participar como voluntário não remunerado dessa pesquisa, estando ciente dos riscos e benefícios desses procedimentos para minha pessoa, conforme exposto acima..Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento em duas vias (uma ficará comigo).Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre

a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em pastas de arquivo sob a responsabilidade do pesquisador no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa

Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária,

Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

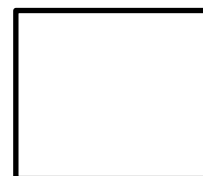
(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO OCULTA PELOS VÍRUS DAS HEPATITES B E C EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS** como voluntário (a).

Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Impressão digital

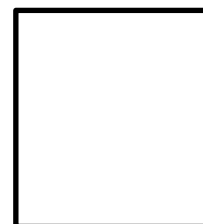


Recife, / /

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa

e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):



1º testemunha

Assinatura

2º testemunha

Assinatura

Pesquisador responsável

Recife, _____, _____,

APÊNDICE C- ARTIGO 1- VERSÃO EM INGLÊS

Title: High Prevalence of Occult Hepatitis C Infection in Pre-dialysis Patients

Authors: Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette¹, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes², Nathália Campello Guedes dos Anjos¹, Lucila Maria Valente¹, Sávio Augusto Vieira de Oliveira³, Norma Lucena-Silva³

1 Nephrology- Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco

2 Gastroenterology-Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco

3 Laboratory of Immunogenetics of the Aggeu Magalhães Institute - Fiocruz Pernambuco

ABSTRACT

BACKGROUND: It is known that patients with chronic kidney disease (CKD) on hemodialysis (HD) have a higher prevalence of HCV infection, both its classical form and the occult (OCI) form. However, there are no studies that have evaluated the occurrence of OCI in pre-dialysis patients.

METHODS: a cross-sectional study was conducted between 2015-17 in pre-dialysis patients. Adults with creatinine clearance <60 mL / min / 1.73m^2 were included. Pregnant and postpartum women, patients with glomerulopathies and with serological markers of HBV, HCV or HIV infection were excluded. Patients with OCI were those with anti-HCV negative, with HCV-RNA by PCR positive in plasma or in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), but negative in the serum.

RESULTS: Ninety-one patients were evaluated and the prevalence OCI was 16.5% (15/91), 14 of whom were identified in PBMC and one in ultracentrifuged plasma. OCI presented higher frequency in older patients ($p = 0.002$); in patients with CKD of mixed etiology ($p = 0.019$); and HBV markers of previous infection (anti-HBc and anti-HBs combined) ($p = 0.001$).

CONCLUSION: The occurrence of OCI in pre-dialysis patients was elevated and more common in the elderly and in patients with markers of HBV previous infection.

KEYWORDS: Occult Hepatitis Infection; Chronic Hepatitis C; Chronic Kidney Disease; Hemodialysis; HCV-RNA; peripheral blood mononuclear cells.

INTRODUCTION

Occult hepatitis C virus infection (OCI) is characterized by the presence of the genetic material of hepatitis C virus (HCV-RNA) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), ultra-centrifuged plasma or hepatic tissue and the absence of its antibodies (anti-HCV) and HCV-RNA in the serum [1] . This form of viral hepatitis may be associated with tissue damage in both the liver (chronic cryptogenic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease) [2–4], and extrahepatic diseases (glomerulopathies, lymphoproliferative diseases and chronic dialytic kidney disease) [5–7].

It is suggested that the specific cellular immune response in patients with OCI is present, however, with less effectiveness in relation to the control group without infection, and more effective than in those with the classic form of the disease (HCV-RNA positive in the serum) [8].

It is known that patients with chronic kidney disease (CKD) on hemodialysis (HD) present a higher prevalence of HCV infection than the general population, both in its classical form [9] and in occult form, reaching up to 45% of patients with OCI [7,10].

Nowadays, due to universal precautions in HD units and the reduced need for blood transfusion, some authors suggest that HCV infection may occur in the pre-dialytic period [11]. Indeed, patients with pre-dialysis chronic kidney disease (PDCKD) have a higher prevalence of hepatitis B and C viral infection when compared to the general population [12–14]. However, there are no data in the literature that assess the presence of OCI in patients prior to the initiation of renal replacement therapy.

The study of the epidemiology of OCI in patients with PDCKD is relevant due to: (i) a higher prevalence of classic HCV infection in HD patients [9,15]; (ii) outlook for the use of diagnostic OCI techniques in these patients before the onset of HD [1]; (iii) greater difficulty in identifying hepatic aggression in patients with CKD due to reduced serum aminotransferase levels due to hemodilution [16] and, finally, (iv) the possibility of HCV treatment with new direct-acting antivirals agents with few side effects and high efficacy [17].

Therefore, this study aims to evaluate the occurrence and epidemiological aspects of OCI in patients with PDCKD.

PATIENTS AND METHODS

A cross-sectional study was carried out from October 2015 to April 2017, where patients with PDCKD were evaluated in the CKD outpatient clinic of the Nephrology Service of the Federal University of Pernambuco. Adult patients with a follow-up time of more than 3 months and with an estimated creatinine clearance of less than 60 mL/min/1.73m² were included. Pregnant and postpartum women, those with glomerulopathies and serological markers of HBV infection (HBsAg positive), HCV (anti-HCV positive) and HIV (anti-HIV positive) were excluded.

This study was approved by the ethical of the Federal University of Pernambuco and registered it under number 50121315.3.0000.5208.

After signing an informed consent form, patients filled out a questionnaire containing demographic data (sex, age, skin color), clinical data (stage and etiology of CKD), risk factors for viral hepatitis acquisition (transfusion, tattooing, piercing and intravenous drug use). Then, 20 mL of blood of peripheral vein was collected on vacutainer tube for biochemical, serological and virological laboratory tests.

Serum levels of aminotransferases, aspartate aminotransferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) and creatinine were determined by automated method (UV Diasys-Architect c8000, Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA). The creatinine clearance was evaluated by the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) formula [18].

The evaluation of viral infection included serum screening of anti-HCV by third generation ELISA, rapid immuno-chromatographic assay for the qualitative determination of hepatitis B surface antigen (HBsAg), immunoassay for anti-HBs by direct chemiluminescence using the ADVIA Centaur automated system ® and total qualitative anti-HBc using the IMMUNITE 2000® Immunoassay (Siemens Healthcare Diagnostics S.A., Brazil). Patients with negative results on anti-HCV and HBsAg screening were included and evaluated for OCI.

Patients with OCI were those who presented positive HCV-RNA screening by PCR in ultracentrifuged serum or PBMC. If the HCV-RNA was positive in the ultra-centrifuged, the patient underwent a non-ultra-centrifuged serum screening using the same procedure to confirm the diagnosis of OCI.

Detection of HCV-RNA

Peripheral blood was collected and initially centrifuged at 3000 x g for 7 minutes at room temperature to obtain serum. Then 2 mL of the serum was added under a 10% sucrose buffer in a ratio of 1: 1 and ultra-centrifuged at 100,000 x g for 17 hours at 4 °C. The precipitate obtained by ultracentrifugation was eluted in 200 µL of DEPC (diethylpyrocarbonate) RNase-free (Invitrogen, California, USA). In addition, blood collected with anticoagulant was subjected to the density gradient by ficoll-paque (GE Healthcare, Little Chalfont - UK) to obtain PBMC. Ultra-centrifuged serum and PBMC samples were

extracted with total TRIzol reagent (Invitrogen), and cDNA synthesis using the enzyme Superscript III (Invitrogen) following the manufacturer's protocol.

Detection of HCV-RNA in ultra-centrifuged serum and PBMC was performed by polymerase chain reaction (PCR) prepared with 100 ng of cDNA, 5 μ M of the primers specific for amplification of the HCV genome, UTRLC1 (5'-CAAGCACCTATCAGGCAGT-3') and UTRLC2 (5'-CTTCACGCAGAAAGCGTCTA-3'), 1x PCR Rxn buffer (Invitrogen Life Technologies, California-USA), 5 mM MgCl₂ and 10 pmol dNTPs. The reaction conditions consisted of an initial cycle of ten minutes at 95 °C followed by 30 cycles of 95 °C for 30 seconds, 55 °C for 30 seconds and 72 °C for 30 seconds, and at the end a five-minute extension at 72 °C performed in a thermocycler (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA). Positive and negative controls consisted of a sample of patients known to be positive for classic hepatitis C and the PCR mix without DNA addition, respectively. The amplified product was subjected to 2% agarose gel electrophoresis and visualized on the SYBR-safe gel through the L-PIX Trans illuminator (Loccus, São Paulo, Brazil). The presence of a fragment of about 230 base pairs in the absence of nonspecific bands was considered positive. The positive result was confirmed by a new PCR from another aliquot of the patient sample using the same procedure.

RESULTS

We evaluated 154 patients with creatinine clearance $< 60\text{mL} / \text{min} / 1.73\text{m}^2$ and included 130 (24 patients had follow-up times of less than 3 months). Of these, 39 were excluded, 23 patients with glomerulopathies, 7 who refusal to participate, 3 with positive HIV serology, 3 with positive anti-HCV, 2 with positive HBsAg and 1 due to impossibility of venipuncture.

The demographic, clinical and laboratory characteristics of the 91 patients are described in **Table 1**. The prevalence of OCI was 16.5% (15/91), 14 of which the HCV-RNA were identified in PBMC and one of them in the ultra-centrifuged serum.

OCI showed an age relationship, since older patients presented a higher risk of infection when compared to younger patients (69.4 ± 7.9 vs. 60.9 ± 13.5 , $p = 0.002$). CKD of mixed etiology was observed in 9 of the 14 cases (73.3%) of patients with OCI and was much more frequent than in cases without the occult infection ($p = 0.019$). No relationship was found between the occurrence of OCI and sex, skin color or stage of CKD. There was no difference between serum levels of aminotransferases between the groups with and without OCI.

Risk factors associated with viral hepatitis transmission were evaluated and described in **Table 2**, according to the occurrence of OCI. Having surgery prior to the collection of the exams was the single most prevalent risk factor in patients without OCI than in those infected. There was also no relationship between OCI and risk factors such as transfusion, tattoos, piercing and intravenous drug use.

Of the 91 patients evaluated, 2 presented an insufficient sample for the assessment of HBV antibodies. Of the 89 patients analyzed, 75 (84.2%) had anti-HBc negative, 9 (9.8%) positive and 5 (5.5%) undetermined. A total of 4 out of 5 patients with undetermined anti-HBc had positive anti-HBs and were considered as if he had had previous contact with HBV. A total of 31 patients were anti-HBs positive isolated and this antibody was not more frequent in OCI patients ($p = 0.59$), however, the presence of total anti-HBc and anti-HBs in combination (previous HBV infection) was more frequent in patients with OCI when compared to uninfected patients ($p = 0.001$), as shown in **Table 3**.

DISCUSSION

This was the first study to describe the occurrence of OCI in patients with PDCKD. We know that patients with PDCKD present a higher occurrence of HCV infection in the classic form than the general population with a prevalence varies from 3.9% to 7.3%, that is, up to seven times higher than in the control population studies [12–14].

One of the possibilities for the high prevalence of OCI (16.5%) in our study could be due to the low sensitivity of the ELISA tests, that is, of false negative anti-HCV results. However, in this study, patients underwent at least two anti-HCV screenings. The first one in the diagnosis of CKD and the second test as an inclusion criterion in this study, both with negative results and employing a third generation immunoenzymatic assay that shows close to 100% accuracy [19]. The other possibility would be due to the immunological deficiency of patients with PDCKD who would not be able to produce anti-HCV antibodies in detectable titers.

We could still consider the possibility of a false positive result in the PCR reaction to detect the HCV-RNA in the PBMC or ultracentrifuged serum; however, it would be unlikely, since the different steps in the procedure were performed in different environments in laminar flow with quality reagents. In addition, positive results were confirmed by a new PCR from another aliquot of the patient's blood sample using the same detection of HCV-RNA technique.

In this study we did not perform HCV-RNA screening by PCR in the serum (non-ultracentrifuged) of all patients since our objective was not to identify patients with serum anti-HCV-negative and positive HCV-RNA. However, HCV-RNA screening was performed in all patients with non-ultracentrifuged serum when HCV-RNA was positive in PBMC or in ultracentrifuged serum. Moreover, it would be unlikely to find patients with anti-HCV negative, HCV-RNA negative in both PBMC and in ultracentrifuged serum, but positive in

non-ultracentrifuged serum. According to these parameters we question the need to perform the HCV-RNA screening by PCR in the serum before RNA screening in the PBMC and ultracentrifuged plasma for diagnostic confirmation of OCI.

The practical relevance of these findings is uncertain. However, the high frequency of OCI in this group may play a significant role in the transmissibility of the disease within the HD units once the patients do not have detectable antibodies and circulating virions, so they could potentially be infectious [20]. In this study, the vast majority of patients (14/15) with OCI had the viral genome in PBMC, making them potential transmitters of the infection [21]. Additionally, about 50% of infected patients do not have identifiable risk factors for HCV infection [22].

Epidemiologically, a phylogenetic study conducted by Castillo et al., found that patients with OCI have high intra-familial transmissibility, similar to patients with chronic HCV infection [23]. Moreover, Roque Cuellar et al. evaluated the immunological response and the presence of OCI in heterosexual partners of patients with the classic form of infection and found a specific CD4 + and CD8 + immune response and a higher prevalence of OCI in the partners when compared to uninfected heterosexual partners [24]. This findings were corroborated by Shazly et al. who evaluated 50 partners of patients with positive anti-HCV in the serum and found a prevalence of OCI in about 4%, higher than expected in general polulation [25].

In addition to the exclusion of patients with glomerulopathies, since these may present a prevalence of up to 39% of OCI, our results are strengthened by the fact that two techniques were used to identify OCI, both the ultracentrifugation and the identification of the viral genome in PBMC, which increases the chance of detection of OCI. In fact, Castillo et al. demonstrated that positivity for HCV by PCR in PBMC corresponded to 82% of positive

cases for OCI and, when using ultra-centrifugation, there was an increase in the number of positive patients and in none of the cases the examination of OCI was positive in both techniques [5].

The OCI was associated with age, absence of previous surgery, mixed CKD etiology, and positivity for antibodies to HBV (anti-HBc and anti-HBs), suggesting previous infection.

Certainly, older patients are more exposed to contamination during life and have more comorbidities as described in a meta-analysis published in 2016 by Alvarez et al. [26]. Some authors have found that age is an independent risk factor for acquisition of HCV infection [27]. In addition, a North American study found that about 75% of HCV-infected patients were born from 1945 to 1965, the so-called Baby Boomers [28]. However, having undergone a surgical procedure was a protective factor for OCI, which is inconsistent with the literature [29–31], but no justification was found for such a paradoxical finding.

Furthermore, patients with CKD of mixed etiology were those with more comorbidities and, therefore, those more exposed to living together in hospital settings and to diagnostic and therapeutic procedures, known risk factors for HCV infection [30]. In fact, a case control study conducted by Perez et al. in the United States with acute and symptomatic cases of HCV infection, performed on individuals over 55 years of age, found that exposure in the health environment with intravenous drug infusion was related to a 2.7-fold higher risk of HCV infection than in the controls, with risk attributable to exposure of 37% (OR 2.7; 95% CI: 1.3 - 5.8) [32].

Additionally, patients with OCI showed a higher positivity for anti-HBc and anti-HBs when compared to those not infected. It is also known that patients with HCV infection present a higher chance of HBV contamination, since the risk factors for transmission of these infections are similar [33].

This study had some limitations, such as the non-quantification of the viral load and the genotyping that could evaluate epidemiological and transmissibility factors of these patients with OCI.

The reasons that lead to the emergence of the occult form of HCV infection are not known. We can speculate that virus-related factors may be involved in this form of infection, as described in genomic studies where genetic variations between different viral strains of HCV constitute a mechanism of viral survival, contributing to their pathogenicity and resistance to the host's immune system [34,35]. We can also speculate that host-related factors may be involved in the occult form of HCV infection. Of course, the specific cellular immune response (CD4 + and CD8 +) in patients with OCI would be less effective in relation to the control group without infection, nevertheless, more intense than in those with the classic form of disease with HCV-RNA positive in the serum [8].

In addition, although most infected patients show a specific cellular immune response to HCV, only 20% of infected individuals are able to achieve viral clearance in the acute phase of the disease [36][37]. Indeed, Burke et al. observed that patients unable to achieve viral clearance had lower cell responses and found a decrease in the number of CD4 + and CD8 + T lymphocytes in these individuals [38]. In addition, existing differences between Human Leukocyte Antigen (HLA) molecules can target poorly effective immune responses, as some HLA super types affect the recognition and binding affinity of T lymphocytes to antigenic epitopes [39].

However, treatment of OCI can be performed with antiviral therapy as reported by Pardo et al. These authors treated with pegylated interferon and ribavirin for 6 months 10 patients with OCI who had abnormalities in aminotransferases serum levels associated with chronic hepatitis in the biopsy. At the end of the treatment, 6 patients presented normalization

of serum ALT levels and in 7 cases the HCV-RNA was no longer identified in PBMC, suggesting behavior similar to that of classic HCV infection [40].

CONCLUSION

The occurrence of OCI in patients with PDCKD in this study was high and was more common in the elderly, in patients with mixed etiology of CKD and when serological markers of HBV previous infection were present. Further studies will be needed to evaluate the influence of this form of infection on the transmissibility of the HCV in hemodialysis setting and the role of the treatment of these patients with OCI.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work would not be possible without the cooperation and kindness of our patients.

We thank Aggeu Magalhães Laboratory for the availability of material and staff.

CONFLICT OF INTEREST

None of the researchers has a conflict of interest. All the results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract format.

FUNDING

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under protocol number 429736-2016 / 9.

REFERENCES

- [1] Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, de Lucas S, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis* 2004;189:7–14. doi:10.1086/380202.
- [2] Gad YZ, Mouas N, Abdel-Aziz A, Abousmra N, Elhadidy M. Distinct immunoregulatory cytokine pattern in Egyptian patients with occult Hepatitis C infection and unexplained persistently elevated liver transaminases. *Asian J Transfus Sci* 2012;6:24–8. doi:10.4103/0973-6247.95046.
- [3] Granieri C, Bagaglio S, Loggi E, Porrino L, Cursaro C, Micco L, et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in non alcoholic steatohepatitis and cryptogenetic liver diseases. *Dig Liver Dis* 2011;43:S91–2. doi:10.1016/S1590-8658(11)60083-2.
- [4] Saad Y. Prevalence of occult hepatitis C in egyptian patients with non alcoholic fatty liver disease. *Open J Intern Med* 2011;1:33–7. doi:10.4236/ojim.2011.12009.
- [5] Castillo I, Martinez-Ara J, Olea T, Bartolomé J, Madero R, Hernández E, et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. *Kidney Int* 2014;1–6. doi:10.1038/ki.2014.68.
- [6] Youssef SS, Nasr AS, El Zanaty T, El Rawi RS, Mattar MM. Prevalence of occult hepatitis C virus in egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. *Hepat Res Treat* 2012;2012:429784. doi:10.1155/2012/429784.
- [7] Barril G, Castillo I, Arenas MD, Espinosa M, Garcia-Valdecasas J, Garcia-Fernández N, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:2288–92. doi:10.1681/ASN.2008030293.
- [8] Quiroga J a, Llorente S, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Pardo M, Carreño V. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. *J Virol* 2006;80:10972–9. doi:10.1128/JVI.00852-06.
- [9] Fissell RB, Bragg-Gresham JL, Woods JD, Jadoul M, Gillespie B, Hedderwick S a, et al. Patterns of hepatitis C prevalence and seroconversion in hemodialysis units from three continents: the DOPPS. *Kidney Int* 2004;65:2335–42. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00649.x.
- [10] El-shishtawy S, Sherif N, Abdallh E, Kamel L, Abbas M, Ali Saleem AA, et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Hemodialysis Patients; Single Center Study. *Electron Physician* 2015;7:1619–25. doi:10.19082/1619.
- [11] Bergman S, Accortt N, Turner A, Glaze J. Hepatitis C infection is acquired pre-ESRD. *Am J Kidney Dis* 2005;45:684–9. doi:10.1053/j.ajkd.2004.12.014.
- [12] Lemos LB, Perez RM, Lemos MM, Draibe SA, Silva IS, Silva AEB, et al. Hepatitis C among predialysis patients: prevalence and characteristics in a large cohort of patients.

- Nephron Clin Pract 2008;108:c135-40. doi:10.1159/000114452.
- [13] Li Cavoli G, Ferrantelli A, Bono L, Tortorici C, Giammarresi C, Zagarrigo C, et al. Incidence of hepatitis C virus infection in patients with chronic kidney disease on conservative therapy. *Int J Infect Dis* 2011;15:e514-6. doi:10.1016/j.ijid.2011.04.001.
 - [14] Iwasa Y, Otsubo S, Sugi O, Sato K, Asamiya Y, Eguchi A, et al. Patterns in the prevalence of hepatitis C virus infection at the start of hemodialysis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 2008;12:53–7. doi:10.1007/s10157-007-0005-6.
 - [15] Saune K, Kamar N, Miedouge M, Weclawiak H, Dubois M, Izopet J, et al. Decreased prevalence and incidence of HCV markers in haemodialysis units: a multicentric French survey. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2309–16. doi:10.1093/ndt/gfq696.
 - [16] Sette L, Lopes E. Liver enzymes serum levels in patients with chronic kidney disease on hemodialysis: a comprehensive review. *Clinics* 2014;69:271–8. doi:10.6061/clinics/2014(04)09.
 - [17] Roth D, Nelson DR, Bruchfeld A, Liapakis A, Silva M, Monsour H, et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naïve and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4–5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. *Lancet* 2015;386:1537–45. doi:10.1016/S0140-6736(15)00349-9.
 - [18] Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604. doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
 - [19] Kumar TM. Immunoassay systems 2014.
 - [20] Dzekova Vidimliski P, Nikolov I, Matevska Geshkovska N, Dimovski A, Rostaing L, Sikole A. Review: Occult hepatitis C virus infection: Still remains a controversy. *J Med Virol* 2014;86:1491–8. doi:10.1002/jmv.23979.
 - [21] Castillo I. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut* 2005;54:682–5. doi:10.1136/gut.2004.057281.
 - [22] Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat* 2002;9:84–100. doi:10.1046/j.1365-2893.2002.00329.x.
 - [23] Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Barril G, Carreño V. Hepatitis C virus infection in the family setting of patients with occult hepatitis C. *J Med Virol* 2009;81:1198–203. doi:10.1002/jmv.21483.
 - [24] Roque-Cuellar MC, Sánchez B, García-Lozano JR, Praena-Fernández JM, Núñez-Roldán A, Aguilar-Reina J. Cellular immune responses and occult infection in seronegative heterosexual partners of chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepat* 2011;18:e541-9. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01464.x.

- [25] Shazly Y El, Hemida K, Rafik M, Swaff R Al, Ali-Eldin ZA, GadAllah S. Detection of occult hepatitis C virus among healthy spouses of patients with HCV infection. *J Med Virol* 2014. doi:10.1002/jmv.24074.
- [26] Alvarez KJ, Smaldone A, Larson EL. Burden of Hepatitis C Virus Infection Among Older Adults in Long-Term Care Settings: a Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Curr Infect Dis Rep* 2016;18:13. doi:10.1007/s11908-016-0518-9.
- [27] Mindikoglu AL, Miller RR. Hepatitis C in the Elderly: Epidemiology, Natural History, and Treatment. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:128–34.
- [28] Smith BD, Morgan RL, Beckett G a, Falck-Ytter Y, Holtzman D, Teo C-G, et al. Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945-1965. *Morb Mortal Wkly Rep* 2012;61:1–32. doi:rr6104a1 [pii].
- [29] Karaca Ç, Çakaloğlu Y, Demir K, Özdil S, Kaymakoglu S, Badur S, et al. Risk factors for the transmission of hepatitis C virus infection in the Turkish population. *Dig Dis Sci* 2006;51:365–9. doi:10.1007/s10620-006-3139-6.
- [30] Martínez-Bauer E, Forns X, Armelles M, Planas R, Solà R, Vergara M, et al. Hospital admission is a relevant source of hepatitis C virus acquisition in Spain. *J Hepatol* 2008;48:20–7. doi:10.1016/j.jhep.2007.07.031.
- [31] Gaeta GB, Stroffolini T, Taliani G, Ippolito FM, Giusti G, De Bac C. Surgical procedures as a major risk factor for chronic hepatitis C virus infection in Italy: evidence from a case-control study. *Int J Infect Dis* 1999;3:207–10.
- [32] Perz JF, Grytdal S, Beck S, Fireteanu AM, Poissant T, Rizzo E, et al. Case-control study of hepatitis B and hepatitis C in older adults: Do healthcare exposures contribute to burden of new infections? *Hepatology* 2013;57:917–24. doi:10.1002/hep.25688.
- [33] Cooper C, Kilby D. Clinical Significance of Hepatitis B Core Antibody Positivity in HCV-Infected and HCV/HIV Coinfected Individuals. *Clin Infect Dis* 2004;38:1335–7. doi:10.1086/383155.
- [34] Park CW, Cho MC, Hwang K, Ko SY, Oh HB, Lee HC. Comparison of quasispecies diversity of HCV between chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma by ultradeep pyrosequencing. *Biomed Res Int* 2014;2014. doi:10.1155/2014/853076.
- [35] Humphreys IS, von Delft A, Brown A, Hibbert L, Collier JD, Foster GR, et al. HCV genotype-3a T cell immunity: specificity, function and impact of therapy. *Gut* 2012;61:1589–99. doi:10.1136/gutjnl-2011-300650.
- [36] Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499–512. doi:10.1084/jem.191.9.1499.
- [37] Cox AL, Mosbrugger T, Mao Q, Liu Z, Wang X-H, Yang H-C, et al. Cellular immune

- selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med* 2005;201:1741–52. doi:10.1084/jem.20050121.
- [38] Burke KP, Cox AL. Hepatitis C virus evasion of adaptive immune responses: a model for viral persistence. *Immunol Res* 2010;47:216–27. doi:10.1007/s12026-009-8152-3.
- [39] Kuniholm MH, Kovacs A, Gao X, Xue X, Marti D, Thio CL, et al. Specific human leukocyte antigen class I and II alleles associated with hepatitis C virus viremia. *Hepatology* 2010;51:1514–22. doi:10.1002/hep.23515.
- [40] Pardo M, López-Alcorocho JM, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Perez-Mota a, Carreño V. Effect of anti-viral therapy for occult hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1153–9. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02886.x.

Table 1 - Distribution of clinical parameters according to the occurrence of occult HCV infection in 91 patients with chronic kidney disease - 2015 to 2017

	Occult Hepatitis C Infection						p
	Total (%)						
			Yes (%)		No (%)		
	(n=91)		(n=15)		(n=76)		
Age	62.4 ± 13.1		69.4 ±7.9		60.9 ± 13.5		0.002*
Age ≥ 60 years							0.001*
Yes	59	(64.8)	15	(100)	44	(57.9)	
No	32	(35,2)	0	(0)	32	(42,1)	
Sex							0.323***
Male	44	(48.4)	9	(60)	35	(46.1)	
Female	47	(51.6)	6	(40)	41	(53.9)	
Breed							0.719**
Brown	50	(54.9)	7	(46.7)	43	(56.6)	
White	30	(33.0)	6	(40.0)	24	(31.6)	
Black	11	(12.1)	2	(13.3)	9	(11.8)	
BMI	27.1±4.4		27.4±4.7		27.0±4.3		0.750*
GFR (mL / min / 1.73m2)	21.6±10.3		24.6±10.6		21.0±10.2		0.231*
CKD stage							0.580**
IIIa	2	(2.2)	0	(0)	2	(2.7)	
IIIb	22	(24.4)	6	(40.0)	16	(21.3)	
IV	38	(42.2)	5	(33.3)	33	(44.0)	
V	28	(31.1)	4	(26.7)	24	(32.0)	

Etiology of CKD						0.019**	
Mixed	31	(34.1)	11	(73.3)	20	(26.3)	
DM	26	(28.6)	1	(6.70)	25	(32.9)	
HA	19	(20.9)	3	(20.0)	16	(21.1)	
ADPKD	7	(7.70)	0	(0)	7	(9.20)	
Others	1	(1.1)	0	(0)	1	(1.3)	
ALT [#]	18.1 (14.2; 23.2)		17.9 (15.2; 20.9)		18.1 (14.2; 24.7)		p=0.859
AST [#]	19,5 (16.6; 24.8)		18.1 (17; 22.6)		19,5 (16.6; 25.3)		p=0.713

BMI: Body mass index; **GFR:** glomerular filtration rate **CKD:** Chronic kidney disease; **DM:** Diabetes Mellitus; **HA:** hypertension; **ADPKD:** autosomal dominant polycystic kidney disease; **ALT:** alanine aminotransferase **AST:** aspartate aminotransferase * T de Student test ** Fischer exact test; *** Pearson Qui square test.

Table 2 - Distribution of risk factors for viral hepatitis infection according to the occurrence of occult HCV infection in 91 patients with chronic kidney disease – 2015 to 2017

	Occult Hepatitis C Infection						p
	Total (%)						
			Yes (%)		No (%)		
	(n=91)		(n=15)		(n=76)		
Previous Hemodialysis							0.639*
Yes	9	(9.9)	2	(13.3)	7	(9.2)	
No	82	(90.1)	13	(86.7)	69	(90.8)	
Injectable drugs							1.000*
Yes	1	(1.0)	0	(0)	1	(1.3)	
No	90	(98.9)	15	(100)	75	(98.7)	
Occupational exposure							1.000*
Yes	1	(1.0)	0	(0)	1	(1.3)	
No	90	(98.9)	15	(100)	75	(98.7)	
Contaminated Family							0.310*
Yes	2	(2.2)	1	(6.6)	1	(1.3)	
No	89	(97.8)	14	(93.4)	75	(98.7)	
Previous Surgery							0.050** ^a
Yes	77	(84.6)	10	(66.7)	67	(84.6)	
No	14	(15.4)	5	(33.3)	9	(11.8)	
Hemotransfusion							1.000*
Yes	24	(26.4)	4	(26.7)	20	(26.3)	
No	67	(73.6)	11	(73.3)	56	(73.7)	

Piercing						
Yes	0	0	0	0	0	0
No	91	(100)	15	(100)	76	(100)
Tattoo						
						1.000*
Yes	3	(3.3)	0	(0)	3	(3.9)
No	88	(96.7)	15	(100)	73	(96.1)
Acupuncture						
						1.000*
Yes	1	(1.1)	0	(0)	1	(1.3)
No	90	(98.9)	0	(0)	7	(98.7)
Sexually Transmitted Infection						
						0.509*
Yes	22	(24.2)	5	(33.3)	17	(22.4)
No	69	(75.8)	10	(66.7)	59	(77.6)
Condom use						
						1.000*
Regular	4	(4.4)	0	(0)	4	(5.3)
Irregular	15	(16.5)	2	(13.3)	13	(17.1)
Never	72	(79.1)	13	(86.7)	59	(77.6)

* Fischer exact test ; ^a p < 0,05

Table 3 - Distribution of antibodies against hepatitis B virus infection according to the occurrence of HCV occult infection in 89 patients with chronic kidney disease - 2015 to 2017

	Occult Hepatitis C Infection						
	Total (%)						p
			Yes (%)		No (%)		
	(n=89)		(n=14)		(n=75)		
Anti-HBs +Anti-HBc total							
Positive	13	(14.6)	7	(50)	6	(8)	0.001*
Anti-HBs (anti HBc negative)							
Positive	31	(34.8)	4	(28.6)	27	(36)	0.590
Anti-HBs +Anti-HBc total							
Negative	45	(50.6)	3	(21.4)	42	(56)	0.018

APÊNDICE D- ARTIGO 2- VERSÃO EM INGLÊS

Title: Occurrence of Occult Infection of Hepatitis B and C Viruses in Patients with Glomerulopathies

Authors: Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette¹, Edmundo Pessoa de Almeida² Lopes, Nathália: Campello Guedes dos Anjos¹, Sávio Augusto Vieira de Oliveira³, Norma Lucena-Silva³

¹ Nephrology Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco

² Gastroenterology Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco

³ Laboratory of Immunogenetics of the Aggeu Magalhães Institute – Fiocruz, Pernambuco

ABSTRACT

INTRODUCTION: Occult HCV infection (IOHCV) is characterized by the presence of the viral genome in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or in serum samples submitted to ultracentrifugation in patients with negative serology and PCR in the bloodstream. The prevalence of IOHCV in patients with non-hereditary glomerulopathies was demonstrated in only one study with high occurrence, suggesting an etiopathological association between the virus and renal disease. However, this study was the only study that aimed to evaluate the occurrence of IOHCV in patients with glomerulopathies and it has been suggested that new studies be done with other populations so that there is a better understanding between the relationship between IOHCV and glomerulopathies.

OBJECTIVES: To evaluate the occurrence of IOHCV in patients with glomerulopathies.

METHODS: A cross-sectional study was conducted between 2016-17 in adults with non-hereditary glomerulopathy, time of follow-up > 3 months and with renal biopsy with optical microscopy and immunofluorescence with a diagnosis of glomerulopathy. Pregnant women, postpartum women, patients with hereditary glomerulopathies and those with HBV infection (HBsAg positive), HCV (anti-HCV positive) and HIV (anti-HIV positive) were excluded. Patients with IOHCV were those with anti-HCV negative, with negative HCV-RNA PCR, but positive in plasma ultracentrifugation or in peripheral mononuclear cells (PBMC).

RESULTS: Ninety-one patients were evaluated and the prevalence of IOHCV was 13.2% (12/91), six of which were identified in PBMCs and six in plasma ultra-centrifugation. IOHCV was associated with age, since younger patients were more likely to present with infection when compared to older ones (33 ± 8.8 vs. 41.4 ± 13.6 , $p = 0.043$) and with the male gender ($p = 0.008$). Patients with IgA nephropathy presented the highest frequency of IOHCV

(33.3%, 2/6), followed by GNMP (25%, 1/4); GESF / DLM (16.7%, 5/30) and lupus nephritis with a prevalence of 11.8% (4/34).

CONCLUSION: IOHCV showed a high frequency in patients with non - hereditary glomerulopathies, being also more frequent in males.

INTRODUCTION

The diagnosis of hepatitis C infection (HCV) is performed by detecting antibodies against viral proteins and confirmed by the detection of its nucleic acid in serum (GHANY et al., 2009). However, the use of novel techniques using highly sensitive PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and in serum samples subjected to ultra-centrifugation has revealed that patients with negative serology and PCR can present the viral genome in the bloodstream (BARTOLOME et al. al., 2007). This form of infection is termed HCV occult infection (IOHCV).

IOHCV has been described both in patients with hepatic diseases (chronic cryptogenic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease) (GAD et al., 2012) (GRADERI et al., 2011) (SAAD, 2011) and with extrahepatic diseases, glomerulopathies, lymphoproliferative diseases and chronic dialytic kidney disease) (CASTILLO et al., 2014) (YOUSSEF et al., 2012) (BARRIL et al., 2008).

Recently, a high prevalence of IOHCV has been demonstrated in patients with non-hereditary glomerulopathies, suggesting an etiopathological association between the virus and kidney disease (CASTILLO et al., 2014). These authors, when analyzing 87 patients diagnosed with glomerulopathy, identified IOHCV in 39% of patients with non-hereditary glomerulopathies when compared to 3.8% of patients with hereditary glomerulopathies. In this study, infection was diagnosed by identifying the genome in PBMC or by ultra-centrifugation of the serum. In addition, serum creatinine levels were higher and creatinine clearance decreased in patients with IOHCV compared to uninfected patients.

However, this study was the only one to evaluate the occurrence of IOHCV in patients with glomerulopathies and it has been suggested that new studies be done with other populations to better understand the relationship between IOHCV and glomerulopathies (KDIGO, 2017).

It is worth mentioning that several studies have already demonstrated the etiopathological relationship between classic HCV infection and membranoproliferative glomerulonephritis (Yamabe et al., 1995) (Johnson et al., 1993) (Lopes et al., 1999).

The elucidation of this association becomes important from the practical point of view due to several factors, among them that not knowing the pathophysiological mechanisms of several glomerulopathies, we call them idiopathic. Many of the glomerulopathies lack specific

therapy and often progress to terminal CKD and, finally, that there are treatments with few side effects for patients with classic HCV infection, even in patients with advanced CKD (ROTH et al., 2015).

Thus, this study aims to evaluate the occurrence of IOHCV in patients with glomerulopathies.

PATIENTS AND METHODS

A cross-sectional study was carried out from March 2016 to April 2017, in which patients with glomerulopathies accompanied at the Glomerulonephritis Outpatient Clinic of the Nephrology Service of the Federal University of Pernambuco were evaluated. Adult patients were included, with follow-up times greater than three months and with renal biopsy with optical microscopy and immunofluorescence with diagnosis of glomerulopathy. Pregnant women, postpartum women, patients with hereditary glomerulopathies and those with HBV infection (HBsAg positive), HCV (anti-HCV positive) and HIV (anti-HIV positive) were excluded.

After signing an informed consent form, the patients filled out a questionnaire containing demographic data (sex, age, skin color), clinical (stage and etiology of chronic kidney disease), risk factors for viral hepatitis acquisition (transfusion, tattooing, piercing, intravenous drug use). Then, 20 mL of blood was collected for biochemical, serological and virological laboratory tests.

All biochemical analysis was performed using the following methods: for aminotransferases, aspartate aminotransferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) UV Diasys-Architect c8000; for creatinine, Architect Abbott. The creatinine clearance was evaluated by the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) formula (LEVEY et al., 2009).

Anti-HCV studies were also carried out by the ELISA 3 generation (ADVIA Centaur®); rapid immunochromatographic test for qualitative determination of Hepatitis B surface antigen (HBsAg) in serum samples (ADVIA Centaur®); immunoassay for Anti-HBs by direct chemilumometry (ADVIA Centaur®); Total qualitative anti-HBc (IMUNOISSAI IMUNOLITE 2000®). Patients negative for HCV and HBsAg underwent IOHCV screening.

Detection of HCV

Peripheral blood collected at all dry was initially centrifuged at 3000 xg for seven minutes at room temperature to obtain serum. Then 2 ml of the serum was added under a 10% sucrose buffer in a ratio of 1: 1 and ultra-centrifuged at 100,000 xg for 17 h at 4 ° C. The precipitate obtained by ultracentrifugation was eluted in 200 µl of DEPC (diethylpyrocarbonate) RNase-free (Invitrogen, California, USA). In addition, peripheral blood collected with anticoagulant was subjected to the density gradient by ficoll-paque (GE Healthcare, Little Chalfont - UK) to obtain PBMC. Ultra-centrifuged serum and PBMC samples were extracted with a total *TRIzol* reagent (Invitrogen), and cDNA synthesis using the enzyme Superscript III (Invitrogen) following the manufacturer's protocol.

Detection of HCV in ultra-centrifuged serum and PBMC was performed by polymerase chain reaction (PCR) prepared with 100 ng of cDNA, 5 µM of the primers specific for amplification of the HCV genome, UTRLC1 (5'-CAAGCACCTATCAGGCAGT-3') and UTRLC2 (5'-CTTCACGCAGAAAGCGTCTA-3'), 1x PCR Rxn buffer (Invitrogen Life Technologies, California-USA), 5 mM MgCl₂ and 10 pmol dNTPs. The reaction conditions consisted of an initial cycle of ten minutes at 95°C followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, and at the end a five-minute extension at 72°C performed in a thermocycler (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA). Positive and negative controls consisted of a sample of patients known to be positive for classic hepatitis C and the PCR mix without DNA addition, respectively. The amplified product was subjected to 2% agarose gel electrophoresis and visualized on the SYBR-safe gel through the L-PIX Trans illuminator (Loccus, São Paulo, Brazil). The presence of a fragment of about 230 base pairs in the absence of nonspecific bands was considered positive. The positive result was confirmed by new PCR from another patient sample processed separately.

Patients with IOHCV presented positive in the PCR screening of HCV-RNA in ultra-centrifuged serum or PBMC. If the HCV-RNA was positive in the ultra-centrifuged, the patient underwent a non-ultra-centrifuged serum test to confirm the diagnosis of IOHCV.

The research was approved by the research ethics committee of the Federal University of Pernambuco registered under the number of CAAE: 50121315.3.0000.5208.

RESULTS

One hundred seventy-three patients were evaluated, of which 69 were not eligible, 61 due to inadequate biopsies and eight being under 18 years old. Of the remaining 102 included in the study, 11 were excluded, three of whom were pregnant, four refused, and one had a positive HCV serology and three because difficulty in venipuncture made it impossible to collect the exams.

Demographic, clinical and laboratory characteristics are described in Table 1. Of the 91 patients included, the prevalence of IOHCV was 13.2% (12/91), six of which were identified in PBMC's and six in the plasma ultra-centrifugation. No patient was positive in both tests. All patients evaluated had anti-HCV negative, one patient had anti-HBc positive, two were undetermined and in two, there was not enough sample for the test. Anti-HBs were positive in 29 (32.6%) patients and the indeterminate patients were Anti-HB negative.

IOHCV had an association with age, since younger patients were more likely to present the infection when compared to the older ones (33 ± 8.8 vs. 41.4 ± 13.6 , $p = 0.043$) and with male patients ($p = 0.008$). There were no differences regarding race, BMI, glomerular filtration rate or between serum aminotransferase levels among the groups.

Patients with IgA nephropathy presented the highest frequency of IOHCV (33.3%, 2/6), followed by GNMP (25%, 1/4); (16.7%, 5/30), and of lupus nephritis with a prevalence of 11.8% (4/34), there was no positivity in patients with membranous glomerulonephritis, vasculitis or other etiologies), but with no statistical difference among them.

Risk factors associated with viral hepatitis infection are described in Table 2, according to the occurrence of IOHVC. There were no differences among the risk factors between the groups with and without IOHCV. There was also no differences between the occurrence of IOHCV among patients with primary and secondary glomerulopathies according to Table 3, nor any association with the presence of crescentic, immunofluorescent pattern or interstitial fibrosis or tubular atrophy.

DISCUSSION

In this study, the occurrence of IOHCV was observed in 12 of 91 patients (13.2%) with glomerulopathies, being the largest study to date in patients with non-hereditary

glomerulopathies. Half of the patients with IOHCV had HCV-RNA screening by positive PCR in ultra-centrifuged serum and the other half in PBMC.

In a similar study, Castillo et al. observed IOHCV in 39% of 89 patients with non-hereditary glomerulopathies and 3.8% in patients with hereditary glomerulopathies and suggested an etiopathological role between IOHCV and glomerulopathies. This frequency was higher than that found in our study, perhaps because of a different local prevalence of HCV infection.

In our study, there was a higher occurrence of IOHCV in younger patients. These findings may be justified by the high frequency of patients with lupus nephritis and GESF / DLM, which are known to be more frequent in young people, whereas there were no patients with IOHCV with membranous glomerulonephritis, which usually occurs in patients over 50 years old (MCGROGAN). A higher occurrence of IOHCV has also been found in male patients. It is known that male patients have a prevalence about twice as high as female patients, as demonstrated by Armstrong et al. in a North American population study (ARMSTRONG et al., 2006). We suggest that the female sex presents a more efficient virus whitening capacity after the first infection and therefore less chance of becoming chronic when compared to male patients (WANG et al., 2007).

Regarding the distribution of glomerulopathies according to the etiology, IOHCV presented a higher frequency in patients with IgA nephropathy (33.3%). This result corroborated the finding by Castillo et al. that showed that about 50% of patients with IgA had IOHCV.

Of course, these findings are reinforced by McGuire et al. who described the occurrence of IgA nephropathy in 7 of 30 patients (23%) with classic HCV cirrhosis who underwent liver transplantation and had a renal biopsy performed during the procedure, even without renal alterations (McGuire et al., 2006).

There was no association between the traditional risk factors for viral hepatitis virus contamination and the occurrence of IOHCV. There were also no differences among the groups when the serologies for B virus were evaluated, which minimizes the possible etiopathological relation between the contact with HBV and the presence of glomerulopathy.

This study had some limitations, such as the non-quantification of viral load and the genotyping that could evaluate epidemiological factors and the transmissibility of this

infection, besides the fact that HCV-RNA was not investigated in the non-ultra-centrifuged plasma of all the patients.

In addition to using two techniques to detect IOHCV, this study is also relevant because it shows in another demographic region the high occurrence of IOHVC in patients with non-hereditary glomerulopathies, adding scientific support to the possibility of an association between the two entities.

CONCLUSION

In this study, IOHCV showed a high frequency in patients with non-hereditary glomerulopathies, being more frequent in male cases. Further studies, however, will be needed to clarify the pathophysiology of HCV-induced kidney injury and the repercussions of antiviral treatment on glomerulopathy.

Table 1 - Distribution of clinical parameters according to the occurrence of occult HCV infection in 91 patients with Glomerulopathies - HC-UFPE - March 2016 to April 2017

	HCV Occult Infection						p
	Total (%)						
			Yes (%)		No (%)		
	(n=91)		(n=12)		(n=79)		
Age	40,3 ± 13,3		33 ±8,8		41,4 ± 13,6		0,043*
Sex							0,008***
Male	34	(37,4)	9	(75)	25	(31,6)	
Female	57	(62,6)	3	(25)	54	(68,4)	
Breed							0,501**
Brown	54	(59,3)	8	(66,7)	46	(58,2)	
White	32	(35,2)	3	(25,0)	29	(36,7)	
Black	5	(5,5)	1	(8,3)	4	(5,1)	
BMI	25,3±5,1		23,4±3,9		25,5±5,2		0,213*
TFG (mL / min / 1.73m2)	79,0±34,9		87,5±30,7		77,7±35,5		0,367*
AST	20,6 (73,7 ; 10,5)		21(28,1 ; 11,7)		26,1(73,7 ; 10,5)		0,713
ALT	17,0(164 ; 6,0)		16,9 (53 ; 6)		20,8(164,9 ; 6,8)		0,859
Etiology of Glomerulopathy							0,448**
Lupus Nephritis	34	(37,4)	4	(33,3)	30	(38,0)	
Minimal Injury Disease / FSGS	30	(33,0)	5	(41,7)	25	(31,6)	
IGA	6	(6,6)	2	(16,7)	4	(5,1)	
Membranous	11	(12,2)	0	(0)	11	(13,9)	
Membranoproliferative	4	(4,4)	1	(8,3)	3	(3,8)	
Vasculitis	4	(4,4)	0	(0)	4	(5,1)	

Others 2 (2,2) 0 (0) 2 (2,5)

BMI: Body mass index; GFR: Glomerular filtration rate; * Student's T-test ** Fischer's exact test; * Pearson's Chi-square test.**

Table 2 - Distribution of risk factors for viral hepatitis infection according to the occurrence of occult HCV infection in 91 patients with glomerulopathies - HC-UFPE - March 2016 to April 2017

	HCV Occult Infection						p
	Total (%)						
			Yes (%)		No (%)		
	(n=91)	(n=12)	(n=79)				
Previous Hemodialysis							0,448**
Yes	18	(19,8)	1	(8,3)	17	(21,5)	
No	73	(80,2)	11	(91,7)	62	(78,5)	
Intravenous drugs							1,000*
Yes	1	(1,0)	0	(0)	1	(1,3)	
No	90	(98,9)	12	(100)	78	(98,7)	
Occupational exposure							0,349**
Yes	3	(3,3)	1	(8,3)	2	(2,5)	
No	88	(96,7)	11	(91,7)	77	(97,5)	
Contaminated Family							0,230*
Yes	7	(7,7)	2	(16,7)	5	(6,3)	
No	84	(92,3)	10	(83,3)	74	(93,7)	

Previous Surgery						0,751*
Yes	58	(63,7)	7	(58,3)	51	(64,6)
No	33	(36,3)	5	(41,7)	28	(35,4)
Blood transfusion						0,096*
Yes	28	(30,8)	1	(8,3)	27	(34,2)
No	63	(69,2)	11	(91,7)	52	(65,8)
Piercing						0,094
Yes	9	(9,9)	3	(25)	6	(7,6)
No	82	(90,1)	9	(75)	73	(92,4)
Tattoo						0,124*
Yes	10	(11)	3	(25)	7	(8,9)
No	81	(89)	9	(75)	72	(91,1)
Acupuncture						0,515*
Yes	5	(5,5)	1	(8,3)	4	(5,1)
No	86	(94,5)	11	(91,7)	75	(94,9)
Sexually Transmitted Infections						0,697*
Yes	13	(14,3)	2	(16,7)	11	(13,9)
No	78	(85,7)	10	(83,3)	68	(86,1)
Condom use						0,266*
Regular	19	(20,9)	4	(33,3)	15	(19,0)
Irregular / never	72	(79,1)	8	(66,7)	64	(81,0)

Table 3 - Prevalence of HCV Occult Infection among Patients with Primary and Secondary Glomerulopathies HC-UFPE - March 2016 to April 2017

		Occult Hepatitis C					
	Total (%)						p
			Yes (%)		No (%)		
	(n=91)		(n=12)		(n=79)		
Glomerulopathy							0,426*
Primary	51	(56,0)	8	(66,7)	43	(54,4)	
Secondary	40	(44,0)	4	(33,3)	36	(45,6)	

Primary: GESF, Minimal, membranous and membranoproliferative lesions; disorders: Lupus nephritis, vasculitis and hemolytic uremic syndrome

REFERENCES

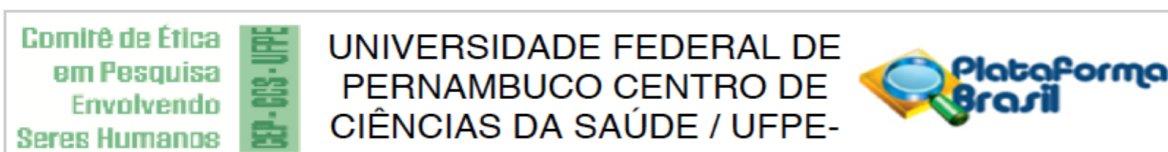
- ARMSTRONG, G. L. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. **Annals of internal medicine**, v. 144, n. 10, p. 705–14, 16 maio 2006.
- BARRIL, G. et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, n. 12, p. 2288–92, dez. 2008.
- BARTOLOME, J. et al. Ultracentrifugation of Serum Samples Allows Detection of Hepatitis C Virus RNA in Patients with Occult Hepatitis C. **Journal of Virology**, v. 81, n. 14, p. 7710–7715, 15 jul. 2007.
- CASTILLO, I. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in patients with primary and secondary glomerular nephropathies. **Kidney international**, p. 1–6, 19 mar. 2014.
- GAD, Y. Z. et al. Distinct immunoregulatory cytokine pattern in Egyptian patients with occult Hepatitis C infection and unexplained persistently elevated liver transaminases. **Asian journal of transfusion science**, v. 6, n. 1, p. 24–8, jan. 2012.
- GHANY, M. G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 49, n. 4, p. 1335–74, abr. 2009.
- GRANIERI, C. et al. High prevalence of occult hepatitis C virus infection in non alcoholic steatohepatitis and cryptogenetic liver diseases. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, p. S91–S92, fev. 2011.
- JOHNSON, R. J. et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 7, p. 465–70, 18 fev. 1993.
- KDIGO. KDIGO 2017 clinical practice guideline on the prevention, diagnosis, evaluation and treatment of hepatitis C in CKD (final draft). **Kdigo**, n. February, 2017.
- LEVEY, A. S. et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604, 5 maio 2009.
- LOPES, L. M. V. et al. Glomerulonefrite associada à infecção pelo vírus da hepatite C
Glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. v. 32, n. 1, p. 1–6, 1999.
- MCGROGAN, A.; FRANSSEN, C. F. M.; DE VRIES, C. S. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: A systematic review of the literature. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 2, p. 414–430, 2011.
- MCGUIRE, B. M. et al. Brief Communication: Glomerulonephritis in Patients with Hepatitis C Cirrhosis Undergoing Liver Transplantation. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 735, 16 maio 2006.
- ROTH, D. et al. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naïve and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4–5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. **The Lancet**, v. 386, n. 10003, p. 1537–1545, out. 2015.
- SAAD, Y. Prevalence of occult hepatitis C in egyptian patients with non alcoholic fatty liver disease. **Open Journal of Internal Medicine**, v. 1, n. 2, p. 33–37, 2011.

WANG, C. C. et al. Acute Hepatitis C in a Contemporary US Cohort: Modes of Acquisition and Factors Influencing Viral Clearance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 10, p. 1474–1482, 2007.

YAMABE, H. et al. Hepatitis C virus infection and membranoproliferative glomerulonephritis in Japan. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 6, n. 2, p. 220–3, ago. 1995.

YOUSSEF, S. S. et al. Prevalence of occult hepatitis C virus in egyptian patients with chronic lymphoproliferative disorders. **Hepatitis research and treatment**, v. 2012, p. 429784, jan. 2012.

ANEXO A- APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Continuação do Parecer: 1.327.013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São referidos os riscos de desconforto com a coleta de sangue e do exame físico e de constrangimento no momento de responder ao questionário e a forma de minimizá-los. O pesquisador garantirá a confidencialidade das informações e o anonimato dos participantes. Os benefícios estão apresentados de acordo com exigido e a garantia de atendimento especializado no ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE é referida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

é um projeto extenso que aborda uma questão de relevância clínica e epidemiológica. Desenho de um estudo exploratório de corte transversal analítico para conhecer as formas ocultas das hepatites B e C (prevalência de IOHCV e IOHBV) comparando a ocorrência entre dois grupos de pacientes com glomerulopatias e com doença renal crônica. Apresenta Pergunta condutora, hipótese e modelo teórico na estrutura da pesquisa. A pesquisa será desenvolvida nos ambulatórios de Glomerulopatias e de DRC do Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE onde serão avaliados pacientes pré-diálise. Será realizada a análise de prontuários, entrevistas, exame físico e coleta de amostra de sangue para análises virológicas e sorológicas e análise laboratorial de função hepática e renal. Estão descritos os critérios de inclusão e exclusão dos participantes, variáveis dependentes e independentes, o estudo piloto e as demais etapas do estudo. A Hipótese do estudo é de que as infecções ocultas pelos vírus das hepatites B e C são mais frequentes nos pacientes com glomerulopatias, quando comparados aos pacientes com doença renal crônica de outras etiologias e que tropismo renal pelo HCV é determinado por características genéticas virais e pela qualidade da resposta imunológica do paciente frente a infecção.

É apresentado um extenso e atualizado referencial teórico. Cronograma detalhado apresentado.

Em relação ao orçamento o pesquisador refere ser da responsabilidade do HC e CPqAM, no valor de R\$ 60.720 (sessenta mil e setecentos e vinte reais).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de Rosto, Carta de anuência do Hospital das Clínicas, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Projetos de Pesquisa, Termo de Confidencialidade, Curriculum Lattes de quatro pesquisadores foram apresentados de acordo com o exigido.

Recomendações:

sem recomendações

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.327.013

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_538511.pdf	11/11/2015 11:49:15		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CONFIDENCIALIDADE.pdf	11/11/2015 11:48:57	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI SETTE	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.327.013

Recurso Anexado pelo Pesquisador	RESPOSTAASPENDENCIAS.docx	11/11/2015 11:48:32	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECEP.docx	11/11/2015 11:48:08	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI SETTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEPCOMPLETO.docx	11/11/2015 11:47:17	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaanuenciaAggeu.pdf	06/10/2015 15:15:54	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Outros	Savio.pdf	28/09/2015 18:02:23	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Outros	Norma.pdf	28/09/2015 18:02:06	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Outros	Edmundo.pdf	28/09/2015 18:01:51	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Outros	Luis.pdf	28/09/2015 18:01:34	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	23/09/2015 11:03:04	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia.pdf	23/09/2015 10:42:41	LUIS HENRIQUE BEZERRA CAVALCANTI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 18 de Novembro de 2015

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br