

Detecção do RNA HGV/GBV-C em Indivíduos Saudáveis não Portadores de HBV, HIV-1/2 e HCV

Detection of HGV/GBV-C RNA in Healthy Individuals non Carrier of HBV, HIV-1/2 and HCV

Marla Karine Amarante¹; Helen Cristina Miranda¹; Carlos Eduardo Coral de Oliveira¹; Karen Brajão de Oliveira¹; Maria Angelica Ehara Watanabe²

Resumo

O vírus da hepatite G (HGV ou GBV-C) é um membro da família *Flaviviridae*. Baseado no perfil clínico e epidemiológico, este vírus pode ser adquirido principalmente por transmissão parenteral, por meio de sangue contaminado. Nós investigamos a presença do RNA do GBV-C/HGV em amostras de sangue periférico de doadores normais na ausência de marcadores como antígenos de superfície do HBV (HBsAg), anticorpos anti-HBc (anti-HBc), anticorpos anti-HCV e anticorpos anti-HIV-1/HIV-2. O RNA GBV-C foi detectado por reação de transcriptase reversa e reação em cadeia catalisada pela polimerase (RT-PCR). Foram analisadas 50 amostras de plasma e identificados 6 (12%) amostras positivas para o RNA do GBV-C. A presença de RNA GBV-C na ausência de hepatite B e C em doadores saudáveis pode indicar que este vírus é capaz de transmissão independente e não contribui para doença hepática.

Palavras-chaves: GBV-C. Doadores de sangue. PCR.

Abstract

The GB virus C (GBV-C)/hepatitis G virus (HGV) is a member of the *Flaviviridae* family. Based on the clinical and epidemiological profiles, this virus can be acquired mainly by parenteral transmission through contaminated blood. It was therefore investigated the presence of GBV-C/HGV RNA in the peripheral blood from healthy blood donors in the absence of virus markers including HBV surface antigen (HBsAg), HBV core antibody (anti-HBc) and HCV antibody. HIV-1, HIV-2, were also investigated. GBV-C RNA was detected by reverse transcriptase and polymerase chain reactions (RT-PCR). It was detected GBV-C RNA in 6/50 (12 %) blood donors. The presence of GBV-C RNA in the absence of hepatitis B and C infection in young patients and healthy donors could indicate that this virus is capable of independent transmission and does not contribute to liver disease.

Key words: GBV-C/HGV. Blood donors. RT/PCR.

¹ Alunos do programa de Pós-graduação em Patologia Experimental (Área de Concentração: Imunologia; Nível: Mestrado), Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina (UEL).

² Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR; Campus Universitário – Londrina, PR, Brasil. E-mail: maewat@sercomtel.com.br

Introdução

As hepatites infecciosas podem ser causadas por vírus denominados A, B, C, D e E. Apesar de existirem testes diagnósticos sensíveis e específicos para todos estes vírus, permanece desconhecida a etiologia de 10 a 20% de todas as hepatites de origem comunitária ou transfusional. Isso sugere a implicação de outros vírus, ainda não identificados, na etiologia das hepatites (ALTER, 1996).

Existem hepatites de origem transfusional ainda não elucidadas, e há também a possibilidade do envolvimento de outras viroses (ALTER, 1996; CASTELING et al., 1998).

Nesta última década, dois novos vírus relacionados às hepatites infecciosas foram isolados e denominados GB vírus C (SIMONS et al., 1995) e HGV ou vírus da hepatite G (LINNEN et al., 1996). Ambos são vírus de RNA de fita simples, pertencem a família *Flaviviridae*, e apresentam 85% de similaridade nas suas seqüências de nucleotídeos, sendo, portanto, isolados diferentes do mesmo vírus, denominados vírus da hepatite G (HGV) (ZUCKERMAN, 1996).

Apesar do GBV-C/HGV e do vírus da hepatite C (HCV) pertencerem à família *Flaviviridae*, diferem entre si na estrutura genômica (KATO et al., 1998), pois possuem somente 29% de homologia na seqüência de aminoácidos (LEARY et al., 1996). Diferentemente do HCV, que pode causar hepatite crônica, cirrose e câncer de fígado (SAITO et al., 1990), o significado clínico da infecção pelo GBV-C/HGV e o seu papel nas hepatites ou em outras doenças permanece desconhecido (OSHITA et al., 1998).

Tem sido demonstrada elevada ocorrência do GBV-C em pacientes submetidos ao transplante renal na Índia (ABRAHAM et al., 2003). Determinadas populações de pacientes têm alta prevalência do GBV-C, a saber, portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise (ZHU et al., 2003;

MASUKO et al., 1996; DE LAMBALLERIE; CHARREL; DUSSOL, 1996), hemofílicos (KINOSHITA et al., 1997) e usuários de drogas injetáveis (STARK; BIENZLE; HESS, 1996). O presente estudo investiga a presença do RNA GBV-C no plasma de doadores de sangue saudáveis.

Material e métodos

Amostra Biológica

As amostras de sangue de doadores normais foram colhidas com a aprovação do Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina e, autorização do termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram coletadas 50 amostras de plasma de doadores de sangue com idade entre 18 a 60 anos. Efetuou-se a pesquisa de marcadores como o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpo anti-core do vírus B (anti-HBc), anticorpo contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) e anticorpo contra os vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (anti-HIV 1/2).

Testes sorológicos

HBsAg e anti-HBc foram detectados através do *Kit Heparostika HBsAg e Heparostika anti-HBc*, (*Uni-Form-Microelisa System* - Organon-Teknika-Holanda). HCV foi determinado por *HCV-3.0 Elisa Test System* (Ortho). Anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 foram determinados pelo *Ab-Capture Elisa test system* (Ortho) e *Uni-Form II plus O - Viranostika* (Organon-Teknika-Holanda).

Extração do RNA - Obtenção de RNA GBV-C

RNA total foi extraído a partir de 250ml de plasma ou soro, utilizando reagente TRIzol-LS (Gibco-BRL, Grand Island, NY, U.S.A.) de acordo com as instruções do fabricante.

Síntese do DNA complementar (DNAc)

A reação de transcriptase reversa foi realizada com 8ml de RNA e com 50pmoles de *primer* anti-sense (*outer*) seguindo as condições do *GeneAmp RNA PCR (Perkin Elmer Part number N808-0017)*, para um ciclo de 42°C durante 60 min.

Condições da reação em cadeia da polimerase

Os *primers* do GBV-C utilizados para a amplificação do DNAc foram desenhados baseados na seqüência *GenBank* U44402 e foram direcionados para amplificar uma região conservada na extremidade 5' (5'UTR) do genoma (*outer sense* 5' GGTAGGTCGTAAATCCCGGT 3'; *outer antisense* 5' CCCACTGGTCCTTGTCAACT 3'; *inner sense* 5' TGGTAGCCACTATAGGTGG 3'; *inner antisense* 5' GCCTATTGGTCAAGAG 3'). Para cada reação foi utilizado um controle positivo de amplificação o qual consistiu de DNAc proveniente da reação de transcriptase reversa do plasma de paciente positivo para RNA GBV-C, cedido gentilmente pelo Prof. Hsin-Fu Liu da Unidade de Virologia - Universidade Católica de Louvain - Bélgica. No controle negativo, não foi adicionado DNA, portanto não foi detectado produto de PCR nesta reação.

As condições das duas reações de amplificação foram as mesmas: 20mM de Tris HCl pH 8.4, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 200mM de dNTP e 1.25 unidades da Taq polymerase e consistiram de ciclos de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de um minuto respectivamente a 94°C, a 45°C e a 72°C com extensão final de 10 minutos a 72°C.

Detecção dos produtos de PCR

O produto de PCR, fragmento de 217 pb, foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5mg/ml) e visualizado com luz fluorescente UV. A especificidade da detecção foi demonstrada por seqüenciamento direto dos produtos de PCR utilizando o seqüenciador de DNA 373 ABI PRISM™ – Perkin Elmer.

Resultados e Discussão

A alta prevalência do RNA GBV-C em doadores de sangue no mundo todo permanece inexplicada (ALTER, 1996). Várias publicações assinalam prevalências muito variadas, de 0,9% no Japão (MASUKO et al., 1996) a 12,9% em doadores nos USA (DAWSON et al., 1996).

Nossos resultados referem-se a doadores de sangue dos mais diversos grupos étnicos presentes na população. Todas as amostras foram negativas para HBsAg, anticorpos anti-HBc, anti HIV-1/2 e anti HCV, portanto nossas amostras são de indivíduos saudáveis isentos para estas infecções.

Neste trabalho nós detectamos RNA GBV-C em 12% das amostras analisadas de doadores saudáveis. O produto de PCR de 217 pb foi seqüenciado e compatível com a seqüência do *GenBank* U44402.

A razão para a elevada prevalência do RNA GBV-C na população de doadores saudáveis no mundo inteiro permanece ainda a ser elucidado (WANG et al., 1998; ALTER, 1996).

Uma relação causal entre a presença do RNA GBV-C e a doença não foi, até o momento, encontrada. Relatos conflitantes sobre o seu papel na doença hepática têm sido publicados. Há pouca informação acerca da epidemiologia, vias de transmissão e patologias associadas, e existem, também, fortes indícios da presença de outros vírus hepatotrópicos não identificados causando as hepatites não A-E (ALTER et al., 1997). O contato sexual pode representar uma via importante de disseminação do vírus (IBÁÑEZ et al., 1998).

A forma de transmissão do GBV-C melhor documentada é via parenteral, especialmente por transfusões sanguíneas (ZUCKERMAN, 1996; KATO et al., 1998; WANG et al., 1998; ALTER et al., 1997; JARVIS et al., 1996; NUBLING; LOWER, 1996; SCHIMIDT; KORN; FLECKENSTEIN, 1996). A associação da transmissão sanguínea com a infecção pelo GBV-C foi especialmente bem relatada, pois o vírus se tornou detectável somente

após a recepção da transfusão (KATO et al., 1998). A análise da seqüência dos vírus encontrados tanto no doador quanto no receptor confirmou esta associação. Dessa forma, o vírus possui alta prevalência entre usuários de drogas endovenosas (AIKAWA; SUGAI; OKAMOTO, 1996), politransfundidos (KATO et al., 1998), hemofílicos (KINOSHITA et al., 1997) e hemodialisados (ZHU et al., 2003; MASUKO et al., 1996; DE LAMBALLERIE; CHARREL; DUSSOL, 1996). Também foi relatada elevada prevalência em *pools* de plasma utilizados para a produção de hemoderivados (SCHIMIDT; KORN; FLECKENSTEIN, 1996). Outra forma de transmissão observada foi a via vertical, de mãe para filho (FEUCHT et al., 1996). Também se sugere transmissão horizontal em comunidades fechadas (PINHO et al., 1999) e a via sexual (FEUCHT et al., 1996).

Tem sido relatado que indivíduos infectados com HIV-1 e GBV-C apresentam progressão lenta devido à manutenção do perfil de citocinas Th1 pelo GBV-C. Este vírus é capaz de se replicar nos linfócitos e de inibir a replicação do vírus HIV *in vitro*, o qual pode estar associado com a diminuição do risco de mortalidade em indivíduos HIV positivos (NUNNARI et al., 2003).

A prevalência do RNA GBV-C, em pacientes com câncer, tem sido baixa, sendo insignificante a patogênese extra-hepática (WILLIAMS et al., 2004; BUYUKBERBER et al., 2003). O GBV-C foi descoberto em 1995 como um agente pós-transfusional, hepatite não A-E, sendo a sua infecção assintomática (BUYUKBERBER et al., 2003). É conhecido que pacientes de hemodiálise com GBV-C, na ausência de outras infecções virais, não desenvolvem alterações funcionais no fígado (DESAI; PAL; BANKER, 2004; ZHU et al., 2003).

A associação do GBV-C com doenças hepáticas ainda não está bem estabelecida, uma vez que o vírus pode ser encontrado em indivíduos sadios e, principalmente, porque ainda não há nenhuma

evidência de doença hepática na maior parte dos pacientes infectados pelo GBV-C.

Referências

- ABRAHAM, P.; JOHN, G.T.; RAGHURAMAN, S.; RADHAKRISHNAN, S.; THOMAS, P. P.; JACOB, C. K.; SRIDHARAN, G. GB vírus C/hepatitis G vírus and TTV vírus infections among high risk renal transplant recipients in India. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.28, n.1, p.59-69, 2003.
- AIKAWA, T.; SUGAI, Y.; OKAMOTO, H. Hepatitis G infection in drug abusers with chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v.334, p.195-6, 1996.
- ALTER, H. J.; NAKATSUJI, Y.; MELPOLDER, J.; WAGES, J.; WESLEY, R.; SHIH, J. W.; KIM, J. P. The incidence of transfusion associated hepatitis G virus infection and its relation to liver disease. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v.336, p.747-54, 1997.
- ALTER, H. J. The cloning and clinical implications of HGV and HGBV-C. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v.334, p.1536-1537, 1996.
- BUYUKBERBER, N.; BUYUKBERBER, S.; KADAYIFCI, A.; GUNAY, C.; CAMCI, C.; BALKAN, A.; KUBAR, A.; TURK, H. M.; SEVINC, A. The prevalence of hepatitis G virus in cancer patients. *Microbiology*, New York, v.26, n.3, p.243-8, 2003.
- CASTELING, A.; SONG, E.; SIM, J.; BLAAUW, D.; HEYNS, A.; SCHWEIZER, R.; MARGOLIUS, L.; KUUN, E.; FIELD, S.; SCHOUB, B.; VARDAS, E. GB virus C prevalence in blood donors and high risk groups for parenterally transmitted agents from Gauteng, South Africa. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.55, p.103-108, 1998.
- DAWSON, G. J.; SCHLAUDER, G. G.; PILOT-MATIAS, T. J.; THIELE, D.; LAERY, T. P.; MURPHY, P.; ROSENBLATT, J. E.; SIMONS, J. N.; MARTINSON, F. E. A.; GUTIERREZ, R. A.; LENTINO, J. R.; PACHUCKI, C.; MUERHOFF, A. S.; WIDELL, A.; TEGTMEIER, G.; DESIA, S.; MUSHAHWAR, I. K. Prevalence studies of GB virus-C infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.50, p.97-103, 1996.
- DE LAMBALLERIE, X.; CHARREL, R. N.; DUSSOL, B. Hepatitis GB virus C in patients on hemodialysis. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v.334, p.1549, 1996.
- DESAI, M. M.; PAL, R. B.; BANKER, D. D. GB virus/hepatitis virus infection in Indian blood donors and high-risk groups. *Transfusion and Apheresis Science*, Kidlington, v.30, n.2, p.111-7, 2004.

- FEUCHT, H. H.; ZOLLNER, B.; POLIWKA, S.; LAUFS, R. Vertical transmission of hepatitis G. *Lancet*, Barcelona, v.347, p.615, 1996.
- IBÁÑEZ, A.; GIMÉNEZ-BARCONS, M.; TAJAHUERCE, A.; TURAL, C.; SIRERA, G.; CLOTET, B.; SÁNCHEZ-TAPIAS, J. M.; RODÉS, J.; MARTINEZ, M. A.; SAIZ, J. C. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus (GBV-C/HGV) and hepatitis C virus among patients infected with human immunodeficiency virus: evidence of GBV-C/HGV sexual transmission. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.55, p.293-299, 1998.
- JARVIS, L. M.; DAVIDSON, F.; HANLEY, J. P.; YAP, P. L.; LUDLAM, C. A.; SIMMONDS, P. Infection with hepatitis G virus among recipients of plasma products. *Lancet*, Barcelona, v.348, p.1352-55, 1996.
- KATO, T.; MIZOKAMI, M.; NAKANO, T.; ORITO, E.; OHBA, K.; KONDO, Y.; TANAKA, Y.; UEDA, R.; MUKAIDE, M.; FUJITA, K.; YASUDA, K.; IINO, S. Heterogeneity in E2 region of GBV-C/hepatitis G virus and hepatitis C virus. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.55, p.109-117, 1998.
- KINOSHITA, T.; MIYAKE, K.; NAKAO, H.; TANAKA, T.; TSUDA, F.; OKAMOTO, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Molecular investigation of GB virus C infection in hemophiliacs in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v.175, p.454-457, 1997.
- LEARY, T. P.; MUERHOFF, A. S.; SIMONS, J. N.; PILOT-MATIAS, T. J.; ERKER, J. C.; CHALMERS, M. L.; SCHLAUDER, G. G.; DAWSON, G. J.; DESAI, S. M.; MUSHAHWAR, I. K. Sequence and genomic organization of GBV-C: A novel member of the Flaviridae associated with human non-A-E hepatitis. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.48, p.60-67, 1996.
- LINNEN, J.; WAGES, J.; ZHANG-KECK, Z. Y.; FRY, K. E.; KRAWCZYNSKI, K. Z.; ALTER, H.; KOONIN, E.; GALLAGHER, M.; ALTER, M.; HADZIYANNIS, S.; KARAYIANNIS, P.; FUNG, K.; NAKATSUJI, Y.; SHIH, J. W.-K.; YOUNG, L.; PIATAK, M.; HOOVER, C.; FERNANDEZ, J.; CHEN, S.; ZOU, J. C.; MORRIS, T.; HYAMS, K. C.; ISMAY, S.; LIFSON, J. D.; HESS, G.; FOUNG, S. K. H.; THOMAS, H.; BRADLEY, D.; MARGOLIS, H.; KIM, J. P. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion transmissible agent. *Science*, Washington, v.271, p.505-508, 1996.
- MASUKO, K.; MITSUI, T.; IWANO, K.; YAMAZAKI, C.; OKUDA, K.; MEGURO, T.; MURAYAMA, N.; INOUE, T.; TSUDA, F.; OKAMOTO, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v.334, p.1485-1490, 1996.
- NUBLING, C. M.; LOWER, J. GBV-C genomes in a high-risk group, in plasma pools and intravenous immunoglobulin. *Lancet*, Barcelona, v.347, p.68, 1996.
- NUNNARI, G.; NIGRO, L.; PALERMO, F.; ATTANASIO, M.; BERGER, A.; DOERR, H. W.; POMERANTZ, R. J.; CACOPARDO, B. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v.139, n.1, p.26-30, 2003.
- OSHITA, M.; HAYASHI, N.; MITA, E.; ITO, S.; HIRAMATSU, N.; HIJIOKA, T.; KATO, M.; MASUZAWA, M.; SASAKI, Y.; KASAHARA, A.; HORI, M. GBV-C/HGV infection in chronic hepatitis C patients: its effect on clinical features and interferon therapy. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.55, p.98-102, 1998.
- PINHO, J. R. R.; ZANOTTO, P. M. A.; FERREIRA, J. L. P.; SUMITA, L. M. High prevalence of GB virus C in Brazil and molecular evidence for intrafamilial transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.37, p.1634-37, 1999.
- SAITO, I.; MIYAMURA, T.; OHBAYASHI, A.; HARADA, H.; KATAYAMA, T.; KIKUCHI, S.; WATANABE, Y.; KOI, S.; ONJI, M.; OHTA, Y.; CHOO, Q. L.; HOUGHTON, M.; KUO, G. Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, Washington, v.87, p.6547-6549, 1990.
- SCHMIDT, B.; KORN, K.; FLECKENSTEIN, B. Molecular evidence for transmission of hepatitis G virus by blood transfusion. *Lancet*, Barcelona, v.347, p.909, 1996.
- SIMONS, J. N.; LEARY, T. P.; DAWSON, G. J.; PILOT-MATIAS, T. J.; MUERHOFF, A. S.; SCHLAUDER, G. G.; DESAI, S. M.; MUSHAHWAR, I. K. Isolation of a novel virus like sequences associated with human hepatitis. *Nature Medicine*, New York, v.1, p.564-569, 1995.
- STARK, K.; BIENZLE, U.; HESS, G. Detection of hepatitis G virus genome among injecting drug user, homosexual and bisexual men and blood donors. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v.174, p.1320-1323, 1996.
- WANG, J. T.; CHEN, P. J.; LIU, D. P.; SHEU, J. C.; WANG, T. H.; CHEN, D. S. Prevalence and infectivity of hepatitis G virus and its strain variant, the GB agent, in volunteer blood donors in Taiwan. *Transfusion*, Paris, v.38, p.290-295, 1998.
- WILLIAMS, C. F.; KLINZMAN, D.; YAMASHITA, T. E.; XIANG, J.; POLGREEN, P. M.; RINALDO, C.; LIU, C.; PHAIR, J.; MARGOLICK, J. B.; ZDUNEK, D.; HESS, G.; STAPLETON, J. T. N. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v.350, n.10, p.981-990, 2004.
- ZHU, W. F.; YIN, L. M.; LI, P.; HUANG, J.; ZHUANG, H. Pathogenicity of GB virus C on virus hepatitis and hemodialysis patients. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v.9, n.8, p.1739-1742, 2003.
- ZUCKERMAN, A. J. Alphabet of hepatitis viruses. *Lancet*, Barcelona, v.347, p.558-559, 1996.

