

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA HEPATITE
CRÔNICA B AgHBe NEGATIVO NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA**

FLAMIR DA SILVA VICTORIA

MANAUS

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

FLAMIR DA SILVA VICTORIA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA HEPATITE
CRÔNICA B AgHBe NEGATIVO NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal (do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferrelra
Prof. Dr. Spartaco Alstolfi Filho**

Manaus
2007

FLAMIR DA SILVA VICTORIA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA HEPATITE
CRÔNICA B AgHBe NEGATIVO NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL BRASILEIRA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal (do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 30 de maio de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira - Presidente
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

Prof. Dr. Antonio de Matos Tavares - Membro
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

Prof. Dr. Fernando Luiz Westphal - Membro
Universidade Estadual do Amazonas (UEA)

Prof. Dr. Ricardo Augusto Chaves de Carvalho - Membro
Universidade Estadual do Amazonas (UEA)

Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira – Membro
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia (INPA)

À minha esposa Marilu, companheira
de todos os momentos.

Às minhas filhas, Cristian e Lucienne,
pela paciência e horas de ausência.

Aos meus pais Alfredo Britto Victoria
(*in memoriam*) e Loyde da Silva
Victoria, toda gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Aos Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira e Prof. Dr. Spartaco Alstolfi Filho, pela orientação dedicada, sugestões e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia e aos idealizadores deste curso, na pessoa do Professor Spartaco, pela oportunidade e concretização deste trabalho.

À Gerência de Virologia pelo processamento dos exames sorológicos e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Amazonas pelos insumos dispensados ao projeto.

Ao Prof. Dr. Wornei da Silva Braga pelas valiosas sugestões e à colega Cíntia Mara Oliveira pela colaboração e auxílio no processamento das amostras biológicas.

À Profa. Marilu Barbieri Victoria pela colaboração dispensada durante o decorrer deste trabalho

À acadêmica bolsista da FAPEAM Cristian Barbieri Victoria pelo levantamento de dados dos prontuários dos pacientes.

Ao estatístico do HEMOAM Edson Lira pela contribuição na análise dos resultados.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Nada na biologia faz sentido,
exceto quando se tem em mente a evolução.”*

Theodosius Dobz Hansky

RESUMO

A infecção pelo VHB é uma das infecções mais freqüentes do mundo, estima-se em 350 milhões o número de pacientes cronicamente infectados, sendo a Amazônia Ocidental Brasileira considerada uma das regiões de maior endemicidade do VHB. As hepatopatias crônicas pelo VHB apresentam-se sob duas formas: AgHBe positivo e AgHBe negativo. As formas AgHBe negativas são representadas por dois grupos de pacientes: os portadores inativos do AgHBs e os pacientes com hepatite crônica B (HCB). Foram selecionados na FMTAM 55 pacientes AgHBs reagentes há mais de seis meses, naturais da Amazônia Ocidental Brasileira, após soroconversão do AgHBe, com a finalidade de determinar o VHB DNA pela PCR, identificar os genótipos do VHB das amostras VHB DNA reagentes e caracterizar os pacientes com HCB AgHBe negativo, através da análise clínica e molecular. O estudo foi do tipo descritivo de caso, com os pacientes separados em dois grupos: com hepatite e sem hepatite no exame histopatológico. A prevalência da hepatite no estudo foi 63,64%, predominando o gênero masculino, com uma proporção de 1,9:1 em relação às mulheres, com idade média de 42,5 anos, sendo mais freqüentemente naturais da Sub-região Sudoeste (32,73%). No estudo foi observado que o tempo foi uma variável proporcional à evolução da doença e nestes pacientes os sintomas mais freqüentes foram: dispepsia, astenia e perda da libido, com a maioria dos pacientes apresentando história pregressa e familiar de contato prévio com o VHB, sendo a esplenomegalia o sinal mais freqüente (40%). Entre os exames a contagem plaquetária, albumina sérica e atividade da protrombina foram significativas para o diagnóstico da hepatite. A alfa-fetoproteína foi mais elevada nos pacientes com hepatite e o carcinoma hepatocelular foi detectado em 3,63%. Foram diagnosticados três tipos de genótipos do VHB: A, D e F, em amostras amplificadas do gene S. O genótipo A sub-genótipo Afro-asiático (AA) foi o mais prevalente nos pacientes com hepatite (54,54%). Observaram-se mutações nestes pacientes em 36,36%, com predomínio das mutações *core promoter* (31,81%), decorrentes da maior prevalência neste estudo do genótipo A (AA). No presente estudo nos pacientes com hepatite encontramos sinais de atividade fibrogênica ao ultrassom hepático, demonstrando elevada sensibilidade do exame em avaliar a fibrose hepática (90,2%). Em relação aos sinais ultrassonográficos de patologias associadas à hepatite, observou-se colecistopatias (18,18%) e lesões focais (5,45%). Nos pacientes com hepatite foram observados ao ultrassom sinais maiores

menores de hipertensão portal, respectivamente 38,18% e 40%. A aplicação do índice de NIEC nestes pacientes revelou elevado risco de hemorragia varicosa durante o período de um ano (37,8%). Este estudo mostrou uma elevada prevalência do genótipo A (AA) em pacientes com HCB AgHBe negativo na Amazônia Ocidental Brasileira, contrariando outros estudos sobre a predominância do genótipo F, reflexo provável das influências migratórias de outras regiões brasileiras, há várias décadas, o que poderia estar contribuindo para a mudança do perfil genotípico do VHB na região.

Palavras-chaves:

Hepatite crônica B AgHBe negativo, Amazônia Ocidental Brasileira, mutações.

ABSTRACT

The infection for the HBV is one of the infections most frequent of the world, esteem in 350 million the number of chronic infections patients, being of Amazon Ocidental Brazilian person considered one of the regions of bigger prevalence of the HBV. The chronic hepatitis for the HBV are presented under two forms: Positive and negative AgHBe. The negative AgHBe forms are represented by two groups of patients: the inactive carriers of the AgHBs and the patients with chronic hepatitis B, 55 reacting AgHBs patients had been selected in the FMTAM have six months, natural of the Amazon Ocidental Brazilian person, after soroconversion of the AgHBe, with the purpose to determine HBV DNA for the PCR, to identify the genotypes of the VHB of reacting samples HBV DNA and to characterize the patients with chronic hepatitis B negative AgHBe, through the clinical and molecular analysis. The study he was of the descriptive type of case, with the separate patients in two groups: with hepatitis and without hepatitis in the histological examination. The prevalence of the hepatitis in the study was 63.64%, predominating the males sort, with a ratio of 1,9:1 in relation to the female, with average age of 42,5 years, being more frequently natural of the Southwestern Sub-region (32,73%). In the study it was observed that the time was a proportional variable to the evolution of the illness and in these patients the symptoms most frequent had been: dyspeptic symptom, asthenia and loss of the libido, with the majority of the patients presenting former and familiar history of previous contact with the HBV, being the esplenomegalia the signal most frequent (40%). The platelet counting enters the examinations, sérica albumin and activity of the protrombin had been significant for the diagnosis of the hepatitis. The alpha-fetoprotein more was raised in the patients with hepatitis and the hepatocelular carcinoma was detected in 3,63%. Three types of genotypes of the VHB had been

diagnosed, A, D and F in amplified samples of gene S. The genotype A, sub-genotype Afro-asiatic (AA) was most prevalent in the patients with hepatitis (54,54%). Mutations in these patients in 36,36% had been observed, with predominance of the mutations Core promoter (31,81%), to biggest prevalence in this study of the A genotype (AA). In the present study in the patients with hepatitis we find signals of fibrogenesis activity to ultrasound hepatic, demonstrating raised sensitivity of the examination in evaluating fibrosis hepatic (90,2%). In relation to the ultrasound signals of pathology associations to the hepatitis, one observed lithiasis (18,18%) and focal injuries (5,45%). In the patients with hepatitis bigger and lesser signals of portal hipertension had been observed to ultrasound, respectively 38.18% and 40%. The application of the index of NIEC in these patients disclosed high risk of varices hemorrhage during the period of one year (37,8%). This study it showed to one high prevalence of the A genotype (AA) in patients with chronic hepatitis B negative AgHBe in the Amazon Ocidental Brazilian, opposing other studies on the predominance of the genotype F, probable consequence of the migratory influences of other Brazilian regions, has some decades, what she could be contributing for the change of the genotypic profile of the HBV in the region.

Key Words:

Chronic hepatitis B negative AgHBe, Amazon Ocidental Brazilian, mutations

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa de localização geográfica da Amazônia Ocidental Brasileira	46
Figura 2	Porcentagem de pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo e portadores inativos do AgHBs no exame histológico de biópsia Hepática (N=55)	56
Figura 3	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao gênero dos pacientes (N=55)	57
Figura 4	Diagrama de dispersão da idade em pacientes com hepatite (N=55)	59
Figura 5	Diagrama de dispersão da idade em pacientes portadores (N=55)	59
Figura 6	Mapa das sub-regiões da Amazônia Ocidental Brasileira, demonstrando a distribuição das cidades de naturalidade e procedência da população com hepatite e portadores (N=55)	62
Figura 7	Distribuição da população com hepatite e portador quanto às curvas de tendência da evolução da infecção pelo VHB nos pacientes (N=55)	64
Figura 8	Distribuição da população do com hepatite e portador quanto ao motivo da consulta e o tempo de evolução da infecção nos pacientes (N=55)	65
Figura 9	Distribuição da população com hepatite e portador quanto aos sintomas apresentados pelos pacientes (N=55)	66
Figura 10	Distribuição da população com hepatite e portador quanto aos antecedentes clínico-epidemiológicos dos pacientes (N=55)	67
Figura 11	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao do exame físico dos pacientes (N=55)	68
Figura 12	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo dos pacientes (N=22/55)	69
Figura 13	Distribuição da população com hepatite e portador quanto aos genótipos e o grau de lesão hepática dos pacientes (N=22/55)	71
Figura 14	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à presença de mutações no gene C nos pacientes(N=22/55)	72

Figura 15	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo e a presença da mutação pré- <i>core</i> nos pacientes (N=22/55)	73
Figura 16	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo e a presença da mutação <i>core promoter</i> nos pacientes (N=22/55)	73
Figura 17	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à presença de mutações na região do pré- <i>core</i> nos pacientes (N=1/22)	74
Figura 18	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à presença de mutações na região do <i>core promoter</i> nos pacientes (N=7/22)	75
Figura 19	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da contagem plaquetária dos pacientes (N=55)	77
Figura 20	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de bilirrubina total dos pacientes (N=55)	77
Figura 21	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da atividade da protrombina dos pacientes (N=55)	78
Figura 22	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de albumina dos pacientes (N=55)	79
Figura 23	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da aminotransferase do aspartato dos pacientes (N=55)	79
Figura 24	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da aminotransferase da alanina dos pacientes (N=55)	80
Figura 25	<i>Blox plots</i> utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de alfa-fetoproteína dos pacientes (N=55)	81
Figura 26	Distribuição dos resultados da biópsia hepática coletados da população do estudo quanto ao sistema de Metavir (N=55)	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios clínicos e laboratoriais utilizados para a realização da biópsia hepática nos pacientes portadores crônicos do AgHBs com AgHBe negativo e anti-Hbe positivo	53
Tabela 2	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à faixa etária dos pacientes (N=55)	58
Tabela 3	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à profissão dos pacientes (N=55)	60
Tabela 4	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à naturalidade dos pacientes (N=55)	61
Tabela 5	Distribuição da população com hepatite e portador quanto à procedência dos pacientes (N=55)	62
Tabela 6	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao tempo de evolução da infecção pelo VHB nos pacientes (N=55)	63
Tabela 7	Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo/subgenótipo e origem geográfica na Amazônia Ocidental Brasileira	70
Tabela 8	Distribuição das médias, desvios padrão e medianas dos exames hematológicos e bioquímicos dos pacientes com hepatite e portador (N=55)	76
Tabela 9	Distribuição dos resultados das análises bioquímicas de <i>flares</i> de ALT das amostras coletadas da população do estudo com hepatite e portador (N=55)	81
Tabela 10	Distribuição das alterações ultrassonográficas de fibrose na população (N=55)	83
Tabela 11	Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas de patologias associadas nos pacientes (N=55)	84
Tabela 12	Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas de sinais maiores de hipertensão portal nos pacientes (N=55)	84
Tabela 13	Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas de sinais menores de hipertensão portal nos pacientes (N=55)	85

Tabela 14	Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações endoscópicas do trato gastrointestinal sugestivas de hipertensão portal (N=55)	86
Tabela 15	Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações endoscópicas do trato gastrointestinal preditivas de sangramento varicoso (N=55)	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
AgHBs	Antígeno de Superfície
AgHBe	Antígeno HBe
AgHBc	Antígeno HBc
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Liked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
HAI	<i>Knodell Histological Ativity Indices</i>
HCA	Hepatite Crônica Ativa
HCB	Hepatite Crônica B
HCP	Hepatite Crônica Persistente
IHC	Insuficiência Hepática Crônica
IH	Intra Hepático
LN	<i>Lobular Necrosis</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase</i>
PMN	<i>Peace Meal Necrosis</i>
PHSA	Albumina Humana Sérica Polimerizada
RNA	Ácido Ribonucléico
RNI	Razão Normalizada Internacional
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TAP	Tempo de Atividade da Protrombina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	Trato Gastrointestinal
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VHD	Vírus da Hepatite D

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 A BIOLOGIA DO VHB	19
2.2 PRODUTOS DE TRANSCRIÇÃO	20
2.3 REPLICAÇÃO VIRAL	22
2.4 VARIABILIDADE DO GENOMA DO VHB	24
2.5 MUTAÇÕES DO VHB	25
2.6 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHB	31
2.7 IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO VHB	35
2.8 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VHB	38
OBJETIVOS	44
MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	45
4.2 MODELO DO ESTUDO	46
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO	47
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO	47
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO NO ESTUDO	47
4.6 PROCEDIMENTOS	48
4.6.1 Exame Clínico	48
4.6.2 Exames Hematológicos, Bioquímicos e Sorológicos	49
4.6.3 Exames Biomoleculares	50
4.6.4 Exame de Biópsia Hepática	52
4.6.5 Exame Ultrassonográfico do Abdome Superior	53
4.6.6 Exame Endoscópico do Trato Gastrointestinal Superior	54
4.7 Análise Estatística	55
RESULTADOS	56
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	56
5.1.1 Gênero e Faixa Etária	57
5.1.2 Atividade Ocupacional	60
5.1.3 Naturalidade e Procedência	60
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS	63
5.2.1 Tempo de Evolução da Doença	63
5.2.2 Motivo da Consulta	64

5.2.3	Manifestações Clínicas e Antecedentes Clínico-Epidemiológico	65
5.3	CARACTERÍSTICAS BIOMOLECULARES	68
5.3.1	Determinação do VHB DNA	68
5.3.2	Amplificação do Gene S	68
5.3.3	Genotipagem do VHB	69
5.3.4	Distribuição Geográfica dos Genótipos	70
5.3.5	Lesão Hepatocelular e Genótipos	70
5.3.6	Amplificação e Seqüenciamento da Região Pré-Core/Core Promoter	71
5.3.7	Mutações Pré-Core/Core Promoter e Genótipos	72
5.3.8	Mutações Pré-Core/Core Promoter e Lesão Hepatocelular	74
5.4	CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	75
5.5	CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	82
5.6	CARACTERÍSTICAS ULTRASSONOGRÁFICAS	82
5.7	CARACTERÍSTICAS ENDOSCÓPICAS	85
DISCUSSÃO		87
6.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	87
6.1.1	Gênero e Faixa Etária	88
6.1.2	Atividade Ocupacional	90
6.1.3	Naturalidade e Procedência	91
6.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS	92
6.2.1	Tempo de Evolução da Doença	92
6.2.2	Motivo da Consulta	92
6.2.3	Manifestações Clínicas e Antecedentes Clínico-Epidemiológicos	93
6.3	CARACTERÍSTICAS BIOMOLECULARES	95
6.3.1	Determinação do VHB DNA e Amplificação do Gene S	95
6.3.2	Genotipagem do VHB	95
6.3.3	Distribuição Geográfica dos Genótipos do VHB	96
6.3.4	Lesão Hepatocelular e Genótipos do VHB	97
6.3.5	Amplificação e Seqüenciamento da Região Pré-core/Core promoter	98
6.3.6	Mutações Pré-core/Core Promoter e Genótipos do VHB	100
6.3.7	Mutações Pré-core/Core Promoter e Lesão Hepatocelular	100
6.4	CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	101
6.4.1	Marcadores da Fibrose Hepática	101
6.4.2	Marcadores do Metabolismo Hepatocelular	103
6.4.3	Marcadores da Síntese Hepatocelular	103
6.4.4	Marcadores da Necrose Hepática	104
6.4.5	Marcador do Carcinoma Hepatocelular	107
6.5	CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	108
6.6	CARACTERÍSTICAS ULTRASSONOGRÁFICAS	111
6.6.1	Marcadores ultrassonográficos de fibrose hepática	112
6.6.2	Marcadores ultrassonográficos de doenças associadas	112
6.6.3	Marcadores ultrassonográficos de hipertensão portal	113
6.7	CARACTERÍSTICAS ENDOSCÓPICAS	114
CONCLUSÕES		116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		118
ANEXOS		136

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Victoria, Flamir da Silva

V645c Caracterização clínica e molecular da hepatite crônica B AgHBe negativo na Amazônia Ocidental Brasileira / Flamir da Silva Victoria. - Manaus: UFAM, 2007. 150 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Alstolfi Filho

1. Hepatite crônica 2. Doenças do fígado 3. Epidemiologia I. Ferreira, Luiz Carlos de Lima II. Alstolfi Filho, Spartaco III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.36-002(811)(043.2)

INTRODUÇÃO

A Amazônia Ocidental Brasileira é considerada uma região de alta endemicidade do vírus da hepatite B (VHB), onde grande parte da população infecta-se no período perinatal e durante a infância. A prevalência de portadores do AgHBs varia entre 5% e 15% e aproximadamente 50% a 95% da população apresenta evidência sorológica de infecção passada (FERREIRA, 2000; SILVEIRA & FONSECA, 1999; TANAKA, 2000).

Vários fatores estão implicados no desenvolvimento desta infecção, entre eles estão à época de aquisição da infecção, genótipo viral e aspectos relativos à etnia e gênero do hospedeiro, além destes fatores a progressão para a cronicidade é maior nos indivíduos infectados por transmissão vertical ou horizontal durante o período perinatal (LEE, 1997).

As hepatopatias crônicas pelo VHB apresentam-se sob duas formas: uma com expressão sorológica do antígeno HBe (AgHBe positivo) e outra com expressão sorológica do anticorpo HBe (AgHBe negativo). As formas AgHBe negativo são representadas por dois grupos de pacientes: os portadores crônicos inativos do AgHBs (sem hepatite) e aqueles com hepatite crônica B (portadores crônicos ativos do AgHBs). A distinção entre estas duas formas é difícil, particularmente nos pacientes com atividade bioquímica e virológica intermitente, após longos períodos de remissão. Estes pacientes apresentam flutuações nos níveis das aminotransferases, devido a replicação viral residual do VHB selvagem ou devido a presença de replicação de formas virais mutantes do VHB que não expressam o AgHBe. Estes pacientes progridem para cirrose de maneira insidiosa e subclínica

com elevado risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (RIZZETO & VOLPES, 2000).

A determinação seqüencial da enzima aminotransferase da alanina (ALT) têm demonstrado ser um exame de baixo custo e eficiente para diferenciar os pacientes portadores ativos do AgHBs, AgHBe negativo com hepatite crônica dos portadores inativos do AgHBs, entretanto nestes pacientes, outras causas de elevação das aminotransferases necessitam ser excluídas, como superinfecção com outros vírus, abuso de álcool, uso de drogas hepatóxicas, e doenças de natureza auto-imune ou metabólica (PAPATHEORIDIS & HADZIYANNIS, 2001).

A detecção do VHB-DNA no soro ou tecido hepático pela PCR é a forma mais sensível de detectar a replicação viral. Os níveis quantitativos de VHB DNA acima de 10^5 cópias por mL pela PCR, representam o nível de *cut-off* mais aceito para a detectabilidade do método, contudo vários estudos de *follow-up* têm mostrado que 20% a 30% destes pacientes podem ter valores de VHB DNA menores na vigência de hepatite crônica B AgHBe negativo (CHAN & LEUNG, 2000).

Hsu et al. (2002) observaram uma incidência acumulada de 25% de hepatite crônica B AgHBe negativo, variações freqüentes nos níveis da viremia, ALT e uma baixa resposta viral sustentada após o tratamento com *interferon* com um clareamento anual do AgHBs menor que 0,5% nestes pacientes.

As variações no genoma do vírus da hepatite B, no decorrer dos anos, resultaram na emergência de pelo menos oito genótipos. Os genótipos são classificados de A a H, baseados na divergência de mais de 8% na seqüência de nucleotídeos do genoma. Enquanto a relevância destes genótipos continua a ser investigada, evidências sugerem que os mesmos podem afetar a história natural da doença hepática e provavelmente possam ter um papel no manejo clínico desta infecção (GONÇALVES & GONÇALVES, 2006).

Estas observações e o fato de no Brasil existirem poucos trabalhos científicos em escala nacional ou regional estimando a ocorrência e a variabilidade genética, da hepatite crônica B AgHBe negativo, justificaram a realização deste estudo.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) representa um sério problema para a saúde pública mundial, aproximadamente 350 milhões de pessoas no mundo são portadoras do VHB, geralmente inativas, com baixa replicação viral e remissão histológica, entretanto uma proporção significativa destes pacientes desenvolverá hepatite crônica ativa com replicação viral e necroinflamação hepática. Estima-se que 15% a 20% destes pacientes em cinco anos desenvolverão cirrose (DE JONGH & JANSSEN, 1992; FATTOVICH et al., 1991; LEE, 1997; MADDREY, 2000; REALDI et al., 1994).

Os pacientes com infecção crônica pelo VHB apresentam-se em risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepático, contudo a presença de cirrose aumenta este risco. Estima-se que no mundo morrem anualmente um milhão de pessoas de complicações da hepatite B (BEASLEY, 1988; HOOFNAGLE & SCHAFRITZ, 1987; LIAW & TAI, 1988; MAYNARD, 1990; MARGOLIS & ALTER, 1991; WEISSBERG et al., 1984).

Estes índices elevados de morbi-mortalidade têm motivado a Organização Mundial da Saúde (OMS) a deliberar ações preventivas e curativas para o controle da infecção nestes pacientes. A vacinação contra o VHB, as campanhas que combatem os riscos da atividade sexual sem proteção e o uso compartilhado de seringas e agulhas têm registrado quedas significativas de novos pacientes portadores do VHB, mas os reservatórios humanos existentes necessitam ser detectados, monitorados e possivelmente tratados (GROB, 1995).

2.1 A BIOLOGIA DO VHB

O VHB pertence à família *hepadnaviridae* que compreende um grupo de vírus que compartilham uma série de características, como o hepatotropismo, um genoma constituído por moléculas de DNA com fita parcialmente dupla que infectam outras espécies e compartilham características estruturais e funcionais, ao gênero *Orthohepadnavirus* (SUMMERS et al., 1978). O seu genoma possui aproximadamente 3.200 pb (pares de bases) constituindo-se em um dos menores genomas conhecidos que infectam o homem. A fita de DNA mais longa é complementar aos RNA virais e por convenção possui polaridade negativa. Na fita de polaridade positiva a posição da extremidade 5' terminal é fixa, enquanto que a posição da extremidade 3' terminal é variável. Desta forma o comprimento da fita positiva é variável, correspondendo 50% a 90% do comprimento da fita complementar. A fita negativa do DNA não é um círculo fechado, apresenta uma região aberta em um sítio localizado à aproximadamente 224 pb da extremidade 5' da fita positiva. A circularidade da molécula é mantida por extremidades coesivas de 224 pb situadas na porção 5' de ambas as fitas do DNA (GANEM, 1996; SATTLER & ROBINSON, 1979).

No genoma do VHB existe uma proteína covalentemente ligada à extremidade 5' da fita de polaridade negativa e um oligorribonucleotídeo ligado na extremidade 5' da fita de polaridade positiva. Proximal à extremidade 5' de ambas as fitas observa-se uma pequena seqüência de 11 nucleotídeos que são diretamente repetidas e por isso são chamadas de *direct repeats* (DR1 e DR2), importantes para a iniciação da replicação (GERLICH & ROBINSON, 1980; LIEN & PETEU, 1987).

O seu genoma apresenta quatro fases de leitura abertas ou ORFs (*open reading frames*) designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X. Todos estes genes são codificados pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro gene (GANEM & VARMUS, 1987).

A ORF-S ou *gene* de superfície pré-S/S do VHB inclui as regiões pré-S1, pré-S2 e S com três *codons* de iniciação na mesma fase de leitura: a maior proteína que compõe o AgHBs, *large (l) S* cujo *codon* de iniciação é localizado no início da região pré-S1 é codificada pelas regiões pré-S1, pré-S2 e S; a proteína de tamanho

intermediária designada de *middle* (m) S é codificada pelas regiões pré-S2 e S. A menor proteína, *small* (s) S é sintetizada a partir do *codon* de iniciação localizado no início da região S. Todas estas proteínas possuem o mesmo *codon* de terminação localizado no final da região S. As proteínas do invólucro viral são constituintes das espículas externas do envelope viral e estão envolvidas no processo de reconhecimento pelos receptores hepatocitários, provavelmente através de uma ligação com a albumina sérica humana (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

A ORF-C ou *gene* do *core* pré-C/C do VHB que inclui as regiões pré-C/C, possui dois *codons* de iniciação na mesma fase de leitura aberta. O AgHBe é traduzido a partir do único *codon* de iniciação da região pré-C. Inicialmente é produzido um polipeptídeo precursor de 214 aminoácidos compreendendo os 29 aminoácidos da região pré-C e os demais aminoácidos do gene C. O produto é translocado para o retículo endoplasmático onde é processado por clivagem nas duas extremidades, resultando na formação do AgHBe com 159 aminoácidos. O AgHBe é secretado para a circulação sanguínea, usualmente ligado as proteínas do soro. O *codon* de iniciação para o AgHBc está localizado a 87 nucleotídeos (nt) do sítio de iniciação da região pré-C. O polipeptídeo do *core* possui 185 monômeros desta proteína que espontaneamente se agrupam para formar uma partícula icosaédrica (NASSAL & SCHALLER, 1996). O promotor basal do *core* (BCP) do VHB, constitui uma seqüência nucleotídica com sítio de iniciação localizado na região do *overlapping* da ORF-X entre os nucleotídeos 1744-1804 que controla a tradução das proteínas da região pré-*core* e *core* (BRUSS & GERLICH, 1988).

O genoma do VHB apresenta ainda mais duas ORFs, a ORF-P ou *gene* P que cobre aproximadamente três quartos do genoma e codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e RNase-H e a ORF-X ou *gene* X, um *gene* regulador que pode ativar a transcrição de certos *genes* virais e celulares (GANEM & VARMUS, 1987; SUMMERS et al, 1978) (ANEXO G).

2.2 PRODUTOS DE TRANSCRIÇÃO

Os produtos de transcrição do VHB podem ser divididos em RNAs genômicos que possuem mais de uma unidade do genoma em torno de 3,5 Kb e RNAs sub-

genômicos de 0,9 Kb a 2,4 Kb. As quatro fases de leitura aberta do VHB, responsáveis pela síntese de sete produtos diferentes, são controladas por quatro promotores (pré-S1, pré-S2, pré-C/C e X) e dois elementos estimuladores, EnhI e EnhII (*enhancers*). O promotor pré-C/C controla a transcrição de diferentes RNAs de tamanho em torno de 3,5 Kb, que possuem heterogeneidade na extremidade 5'. Entre estes RNAs o chamado RNA pré-genômico (pgRNA) é o molde para a síntese do DNA genômico através de um complexo sistema de transcrição reversa. O pgRNA serve também de molde para a síntese da proteína do core e da DNA polimerase. Os RNAs de 3,5 Kb com extremidade 5' localizado acima do códon de iniciação da região pré-C, moldam a síntese do AgHBe (CHENG & SMITH, 1986).

Para as proteínas do envelope que compõem o AgHBs são conhecidos dois promotores, promotor pré-S1 e o promotor pré-S2/S. O promotor pré-S1 controla a transcrição de um único RNA sub-genômico de 2,4 Kb. O RNA de 2,4 Kb perfaz toda a região pré-S/S e é o único RNA mensageiro para a proteína *Large S*. O promotor pré-S2/S controla a transcrição de uma família de RNAs de 2,1 Kb, possuindo micro-heterogeneidade da extremidade 5' de modo que um destes transcritos se inicia imediatamente antes do AUG da região pré-S2 e os demais após este *codon* de iniciação. Desta forma um dos transcritos de 2,1 Kb origina a proteína *middle S*, enquanto os demais RNAs mensageiros de 2,1 Kb originam a proteína *small S*. O promotor pré-S2/S é mais forte do que o promotor pré-S1 resultando em uma maior síntese de proteínas *middle S* e *small S* comparada com a produção da proteína *large S*. A proteína *large S* possui papel regulatório para a secreção do AgHBs desta forma a super-expressão da proteína *large S* resulta em retenção das proteínas de superfície no retículo endoplasmático. O promotor X controla a transcrição de um RNA de 0,9 Kb que é traduzido em uma proteína com função de regulação e que não é encontrada nos vírus das aves (SCHALLER & FISCHER, 1991; XU & JENSEN, 1997).

O pgRNA referido como um RNA de 3,5 Kb possui um tamanho que excede ao do genoma devido a uma pequena redundância terminal, causada pela repetição da seqüência DR1 e do elemento €. Estas duas estruturas são encontradas próximas à extremidade 5' e existe uma outra cópia na extremidade 3' do pgRNA após a seqüência DR2. O elemento € é constituído por ribonucleotídeos que pareiam e formam uma estrutura de *stem-loop*. A cópia do elemento € da

extremidade 5' é crítica para encapsidação do pgRNA. Esta seqüência é suficiente para direcionar a encapsidação mesmo de seqüências de RNA heterólogas dentro da partícula do *core*. O elemento ϵ é altamente conservado entre os hepadnavirus e apenas a cópia da extremidade 5' e não a da extremidade 3' é funcional no processo de encapsidação. Devido a este fato apenas o pgRNA é encapsidado apesar de todos os outros transcritos de VHB possuírem a região codificante do *stem-loop* em suas extremidades 3'. Sabe-se que a interação entre a polimerase viral e o *stem-loop* iniciam o processo de encapsidação assim como o de transcrição do pgRNA (JUNKER-NIEPMANN & BARTENSCHLAGER, 1990; POLLACK & GANEM, 1993; POLLACK & GANEM, 1994).

2.3 REPLICAÇÃO VIRAL

Após a introdução no organismo o VHB migra até o fígado por hepatotropismo, sofre ligação e adsorção específica à superfície dos hepatócitos. A susceptibilidade da célula hepática está limitada à presença de receptores que envolvem a interação do AgHBs com receptores hepatocitários, possivelmente intermediado por uma pHSA (albumina humana sérica polimerizada). Estudos identificaram receptores para pHSA no *virion* completo do VHB, no AgHBs e também nos hepatócitos do hospedeiro (GRAEME & EDDESTON, 1985; THUNG & GERBER, 1984).

O processo de penetração é dependente de energia e ocorre logo após a adsorção viral por endocitose. Enquanto a vesícula endocítica é transportada da periferia para o centro celular verifica-se uma modificação do pH intracelular, durante esse processo ocorre fusão do envelope com a membrana do endossomo liberando o nucleocapsídeo (GRAEME & EDDESTON, 1985; THUNG & GERBER, 1984).

O desnudamento viral consiste em perda do revestimento protéico e seu transporte até o núcleo, onde os terminais 5' são removidos e reparados (ALBERTI et al., 1999). A multiplicação do genoma do VHB ocorre no núcleo da célula. Primeiramente o DNA viral é convertido na forma circular dupla fita, covalentemente ligada (*cccDNA*). Para isso, a fita positiva é complementada pela DNA polimerase e as estruturas das extremidades 5' de ambas as fitas são removidas. A RNA

polimerase II transcreve o genoma do VHB a partir da forma cccDNA em RNAs maiores do que uma unidade do genoma (3,5 Kb). Entre estes, alguns servirão de mensageiros e irão ao citoplasma onde serão traduzidos para gerar a DNA polimerase, o AgHBc e o AgHBe (THUNG & GERBER, 1984).

A encapsidação é desencadeada pela ligação da polimerase viral à estrutura de *stem-loop* da extremidade 5'. Acredita-se que interações entre o AgHBc e a polimerase viral também sejam necessárias para a encapsidação do pgRNA. Primeiramente a polimerase do VHB inicia a transcrição reversa a partir da estrutura de *stem-loop* da extremidade 5' até a formação de três ou quatro pares de bases. Neste ponto, a polimerase, juntamente com a cadeia nascente de DNA é transferida para a cópia homóloga da DR1 da extremidade 3'. A cadeia de DNA de polaridade negativa é então estendida pela polimerase viral enquanto que a atividade de RNaseH desta enzima degrada o molde de RNA. Quando a polimerase do VHB alcança a extremidade 5', uma pequena seqüência de RNA desta extremidade é deixada intacta pela RNaseH. Este oligômero de RNA compreende a seqüência de DR1, sendo translocado para anelar-se com a região DR2 da extremidade 5' do DNA de polaridade negativa. Este oligorribonucleotídeo é então utilizado como um iniciador da síntese da fita de DNA de polaridade positiva, que também é gerada pela polimerase viral. Conforme observado anteriormente a fita positiva não é completamente sintetizada, sendo menor do que a fita negativa. Uma vez que a síntese da fita positiva começa, as partículas do core que contém o genoma adquirem o envoltório (AgHBs). Estes processos ocorrem no reticulo endoplasmático e no complexo de Golgi onde finalmente os *virion* são secretados (BARTENSCHLAGER & SCHALLER, 1992; GANEM, 1996; NASSAL & CHALLER, 1996).

Os cccDNAs dos hepadnavirus não estão diretamente envolvidos na replicação do DNA viral, portanto não são afetados pela quimioterapia convencional com os análogos dos nucleosídeos. A persistência da infecção viral é explicada pelo fato desta não estar associada a um mecanismo citopático. Os cccDNAs têm uma vida média tão longa quanto a vida dos hepatócitos, desta forma a erradicação da infecção crônica pelo VHB pode somente ser atingida após a exaustão da reciclagem dos reservatórios do *pool* de cccDNAs ou pela eliminação das células que contenham reservatórios de cccDNA (CHEINQUER, 2003).

2.4 VARIABILIDADE DO GENOMA DO VHB

A primeira variabilidade conhecida do VHB foi a do AgHBs que possibilitou a classificação das variantes antigênicas do VHB em nove subtipos diferentes: aywl, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr_q- e adr_q+ (COUROUCE-PAUTY & LEMAIRE, 1978).

A divergência das seqüências do genoma completo em um mesmo subtipo é de aproximadamente 8%, semelhante à encontrada entre diferentes subtipos. Assim, a subtipagem não reflete uma verdadeira variação genotípica nas seqüências codificadoras da proteína S. Por essa razão foi proposto outro método de classificação dos subtipos do VHB baseado na seqüência de nucleotídeos do AgHBs (OKAMOTO et al., 1988).

Inicialmente, pela análise da seqüência do *gene S*, foram descritos quatro genótipos do VHB: A, B, C, e D aos quais posteriormente foram adicionados mais dois genótipos: E e F. Recentemente foram descritos mais dois genótipos: o genótipo G, encontrado em mais de 10% dos casos estudados na França e nos Estados Unidos e o genótipo H definido pelo subtipo adw4, muito freqüente em populações nativas das Américas e pode representar o primeiro *split* de um hepadnavirus ancestral, sendo descrito por Arauz-Ruiz (2002) em ameríndios da América Central (NAUMANN et al., 1993; NORDER et al., 1993; NORDER & COUROUCE, 1994).

O genótipo A inclui vírus dos subtipos adw2 e ayw1; o genótipo B inclui os subtipos adw e ayw1; o genótipo C inclui os subtipos adw, ayr e adr e o genótipo D inclui os subtipos adw, ayw2 e ayw3. O genótipo A raramente circula com uma mutação pré-*core*. Pacientes infectados com este genótipo e sem mutações na região pré-*core* respondem melhor ao tratamento com interferon e pacientes infectados com o genótipo D parecem evoluir com quadros mais graves, pela seleção de mutantes pré-*core*. O genótipo E é encontrado na África, sendo que na África do Sul predomina o genótipo A, formando um subgrupo distinto desse genótipo, mas também são encontrados os genótipos B, C e D. O genótipo F é o mais divergente de todos (14%) parece ser o vírus padrão do Novo Mundo, possui

uma serina (S 140) na alça imunodominante que pode diminuir a eficácia das vacinas feitas com outros genótipos. A associação do genótipo F com o genótipo III do vírus da hepatite Delta (VHD) na Amazônia Ocidental foi encontrado em surtos de hepatites agudas graves. O genótipo F prevalece na América Central e na Argentina onde também foram encontrados os genótipos A, B, e D. No Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, foram encontrados os genótipos A, D e F, muitas vezes com mutações na região pré-S. Entre pacientes com hepatite crônica B acompanhados em São Paulo, foram encontrados os genótipos A, B,C,D e F, com predomínio do genótipo A (47%). Em indígenas da região amazônica o genótipo F foi encontrado nas tribos que não tinham contato com os brancos, enquanto que o genótipo A foi encontrado nas tribos que mantinham contato com os brancos (KAO & WU, 2000).

2.5 MUTAÇÕES DO VHB

O VHB-2 foi inicialmente descrito em crianças vacinadas no Senegal, em uma série de casos com AgHBs, anti-HBs e VHB-DNA positivos, mas com AgHBe, anti-HBe e anti-HBc negativos (COURSAGET & YVONET, 1987), contudo estes achados não foram comprovados através de sequenciamento genômico, sugerindo que neste caso a ausência do anti-HBc não reflete uma mutação no VHB-DNA e sim uma resposta imune aberrante do hospedeiro (GOTOH et., 1995).

As mutações são descritas de acordo com o local de sua ocorrência, região pré-core, região do *gene S*, região do *gene C* e na região do *gene P* (BLUM et al., 2000). A ocorrência de mutações no *gene X* ainda não está esclarecida. São necessários mais estudos para definir o papel clínico e biológico do AgHBx, assim como o de suas mutações, incluindo a sua contribuição para o desenvolvimento da carcinogênese hepática primária (BLUM & BAUMERT, 2000). O tipo e o número de mutações acumuladas são importantes marcadores da evolução da doença hepática e da resposta imune no hospedeiro (CHISARI & FERRARI, 1995; GUNTHER et al., 1995).

A variante pré-core foi inicialmente descrita na Itália por Brunetto & Stenier (1990), envolve casos negativos para o AgHBe, mas soropositivos para AgHBs, anti-HBc, anti-HBe, e VHB-DNA e também apresentam o AgHBc detectável no fígado.

Estes casos são particularmente comuns na Região Mediterrânea e no Extremo Oriente e sua prevalência está relacionada com o tipo de genótipo circulante em cada região. O surgimento destas cepas mutantes pode alterar a história natural da hepatite B. Recentemente, mutação na região *core promoter* foram associadas com hepatite crônica ativa e hepatite fulminante (BLUM & BAUMERT, 2000; BRUNETTO & GIARIN, 1991; CHAN & LOK, 1999; GONÇALES, 1996; OGATA & ZANETTI, 1997; OKAMOTO et al., 1994; SHIH, 2002).

As mais freqüentes mutações no genoma do VHB incluem as mutações da região pré-*core* G1896A e as mutações no *core promoter* A1762T e G1764A. A G1896A foi a primeira mutação descrita e causa uma *stop codon* (seqüência TAG) que elimina a produção do AgHBe (BRUNETTO et al., 1989; CARMAN et al., 1989; SABLON, 2003)

O *core promoter* localiza-se na sobreposição da ORF-X, nos nucleotídeos 1744-1804. As variantes da região do *core promoter* mais comuns envolvem duas substituições nucleotídicas A1762T e G1764A. Estudos *in vitro*, demonstraram que as mutações TA diminuem a produção do AgHBe sem afetar a replicação viral ou a expressão do AgHBc, entretanto outros estudos revelaram aumento da replicação viral e da expressão do AgHBc. As variantes T1762 e A1764 foram descritas em pacientes, com hepatite crônica ativa, hepatite fulminante e em pacientes imunodeprimidos. Estas mutações, resultam em uma diminuição de 70% do AgHBe, e podem aumentar a replicação viral, principalmente quando associadas a variantes do *gene x* e a diminuição de um fator de transcrição fígado-específico (BAUMERT et al., 1996; KRAMVIS & KEW, 1999; LI et al., 1999; SCAGLIONE et al., 1997).

O VHB apresenta dez vezes mais capacidade de exibir mutações do que outros DNA, com média de substituições nucleotídicas variáveis e dependentes do estágio da infecção. A evolução natural média do genoma do VHB na hepatite B crônica é de aproximadamente $1,4 - 3,2 \times 10^{-5}$ substituições por ano, sendo estas, cem vezes maior nos pacientes transplantados (OKAMOTO et al., 1987; STERNECK et al., 1997).

Nos Estados Unidos as mutações pré-*core* foram isoladas em 10% dos pacientes com hepatite fulminante e em 12% a 27% dos pacientes com hepatite crônica, entretanto na Ásia, África, Sul da Europa e Oriente Médio, 47% a 60% dos pacientes com hepatite crônica B apresentavam este tipo de mutação. Esta é menos

freqüente no genótipo A quando comparado aos genótipos B, C, D e E, pelo fato de no genótipo A ocorrer um C1858, necessitando de dois eventos mutantes para expressar a *stop codon*, enquanto que os genótipos B, C, D e E apresentam normalmente T1858, necessitando apenas de um evento mutante para a expressão da *stop codon*. A virulência das cepas T1858 quando comparada com as C1858 em amostras do tecido hepático de pacientes VHB-DNA reagentes foram examinadas do ponto de vista histológico, através do HAI (*Knodell histological activity indices*), sendo observado que nos pacientes portadores da variante C1858, 44% exibiam um HAI maior que seis, enquanto apenas 15% dos pacientes com a variante T1858 apresentavam um HAI maior que seis. Estes dados sugerem que a variante C1858 contribui mais para inflamação e fibrose do que as cepas T1858 (LASKUS & SLUSARCZYK, 1989; LINDH et al., 1996).

As mutações na região do *core* tem sido associadas com alterações da resposta celular imune ao agente viral. O gene C atua como um antagonista do receptor antiviral T-citotóxico, resultando em escape imunológico da cepa selvagem. Contudo o impacto funcional das mutações nos epítomos das células T e sua consequência na imunopatogênese do VHB mutante ainda estão para ser definidos (BERTOLETTI et al., 1994; CHISARI & FERRARI, 1995; CHISARI, 1997; EHATA et al., 1993; WAKITA et al., 1991).

O genótipo A é predominante na Europa não mediterrânea e nos Estados Unidos, nestas regiões o aparecimento de mutantes é raro, uma vez que o genótipo A apresenta um seqüenciamento mais estável do DNA não favorecendo a mutação pré-*core* G1896A. Por outro lado, na Europa mediterrânea e no Japão, prevalecem os genótipos B, C, D, e E que apresentam seqüenciamento menos estável do DNA. Os mutantes do VHB têm sido correlacionados a casos de carcinoma hepatocelular e hepatite crônica ativa. O genótipo C apresenta maior freqüência de acometimento hepático grave, maior incidência de mutante da região do *core promoter* e uma maior resistência ao tratamento com interferon (GRANDJACQUES & PRADAT, 2000; KAO & WU, 2000).

A mutação do *gene S* tem apresentado importância nos locais com maior freqüência de utilização da imunização passiva anti-B. Esta mutação não expressa o AgHBs, por este motivo apresenta grande capacidade de escape imunológico. A mutação do sítio catalítico da polimerase (YMDD) é desencadeada pelo uso

prolongado da *lamivudina* sendo a sua incidência diretamente relacionada ao uso crônico deste análogo nucleosídeo. O aparecimento desta mutação pode ocorrer em 15% dos pacientes tratados após um ano, podendo chegar a 44% após dois anos de tratamento. Acredita-se que esta mutação esteja relacionada à resistência ao tratamento, porém estudos durante dois anos verificaram soroconversão do AgHBe e em alguns casos até desaparecimento da mutação (DIENTAG & SCHIFF, 1999; KAO & WU, 2000).

O diagnóstico da hepatite crônica B AgHBe negativo é baseado na presença do antígeno AgHBs por período maior do que seis meses, na ausência do AgHBe, e na presença do anti-HBe com o VHB-DNA, excedendo 10^5 a 10^6 cópias/mL no soro, aumento nos níveis da ALT (alanina aminotransferase) e biópsia hepática expressando atividade necroinflamatória. Entretanto outras causas de doenças hepáticas necessitam ser excluídas, como superinfecção com outros vírus, abuso de álcool, uso de drogas hepatóxicas, e doenças de natureza auto-imune ou metabólica (LOK et al., 2001; LOK & MCMAHON, 2001; PAPANICOLAOU et al., 2001).

Os pacientes portadores deste tipo de hepatite em geral são mais velhos que os pacientes com hepatite crônica AgHBe positivo, em média 40 anos de idade, predominantemente são do gênero masculino e portadores de doença hepática mais ativa e avançada em aproximadamente 50% dos casos. Em um estudo realizado na Região do Mediterrâneo 29% a 38% dos pacientes com hepatite crônica AgHBe negativo, no momento do diagnóstico já eram portadores de cirrose hepática. A idade e a doença hepática avançada são indícios de que nestes pacientes a doença hepática crônica AgHBe negativo represente uma fase tardia da infecção pelo VHB, mais que uma infecção “de novo” com variantes virais que não expressem o AgHBe (BURK et al., 1994; CACCIOLA et al., 2002; FATTOVICH et al., 1992; TASSOPOULOS et al., 1999).

As relações entre gravidade e variabilidade da região pré-core/core têm se tornado tênue, elas ocorrem tanto em pacientes com doença progressiva como naqueles que converteram para anti-HBe e normalizaram as aminotransferases. A explicação para a maior gravidade dos casos que selecionaram a mutante seria que o efeito imuno-modulatório do antígeno AgHBe estaria perdido, expondo os hepatócitos à agressão imune normal (TSAI & CHEN, 1992).

Hsu et al. (2002) após dezesseis anos de acompanhamento de pacientes com hepatite crônica AgHBe negativo observaram 25% de incidência acumulada de hepatite crônica, variações freqüentes nos níveis de viremia e da ALT e uma baixa resposta viral sustentada após tratamento com *interferon*. O clareamento anual do AgHBs foi menor que 0,5%.

Este tipo de hepatite crônica B é uma forma de doença hepática induzida pela infecção crônica pelo VHB, é potencialmente severa e progressiva, com remissão espontânea muito rara, sendo freqüente a progressão para cirrose e apresenta elevado índice de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (BONINO et al., 1986; LAI et al., 1994).

Tanaka & Yoshiba (1995) relataram casos de hepatite B fulminante induzido por infecção aguda primária pela mutante G1896A. Embora os mutantes pré-core estejam associados a formas graves de hepatite é difícil estabelecer uma causalidade entre estes eventos, provavelmente as mutações contribuam apenas para tornar o VHB mais tóxico para os hepatócitos (TRAUTWEIN & SCHREM, 1996).

Os pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo tem perfil sorológico idêntico aos pacientes portadores crônicos inativos do AgHBs sendo esta diferenciação difícil, particularmente nos pacientes com atividade bioquímica e virológica intermitente e após longos períodos de remissão. Estudos com determinações freqüentes dos níveis de ALT e VHB-DNA no soro observaram flutuações nos níveis sorológicos da ALT e do VHB-DNA em mais de 40% dos casos (BONINO et al., 1986; BRUNETTO et al., 2002).

Níveis acima de 10^5 cópias por mL tem sido sugerido como nível de *cut-off* do VHB-DNA para a diferenciação de pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo dos pacientes portadores crônicos inativos, entretanto vários estudos de *follow-up* tem mostrado que 20% a 30% dos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo podem ter níveis de VHB-DNA no soro menores que 10^5 cópias por mL (CHU et al., 2002; MANESIS et al., 2003; PAPANICOLAOU & HADZIYANNIS, 2004).

O alto custo dos testes moleculares e a falta de acurácia para estabelecer o nível de *cut-off* do VHB-DNA tem dificultado a sua utilização e recomendação na

prática clínica diária para o estabelecimento do diagnóstico diferencial entre estas duas formas clínicas de apresentação das hepatites crônicas B AgHBe negativo. A determinação seqüencial da ALT permanece como o exame básico, prático e eficiente para o diagnóstico e seguimento dos pacientes portadores do estado crônico inativo do AgHBs e para a diferenciação dos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo (PAPATHEORIDIS & HADZIYANNIS, 2001).

Rizzetto & Volves (2000) observaram que a prevalência desta mutação variava de 7% a 30% nos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo, sendo mais freqüente durante a soroconversão espontânea para anti-HBe ou após o tratamento com *interferon* (TAKEDA et al., 1990).

Lindh & Horal (2000) analisando valores quantitativos do VHB-DNA encontrou em média, pela técnica do *Amplicor Monitor* 33.000 cópias por mL do genoma do VHB.

Chu et al. (2002) observaram que esses pacientes apresentavam uma queda significativa da viremia após a perda do AgHBe, sem contudo conseguir determinar o valor significativo de *cut-off* do VHB-DNA para diferenciar com o estado de portador inativo do VHB da hepatite crônica B AgHBe negativo.

No Brasil, Rezende (2002) encontrou uma prevalência de 24% a 59% da mutação pré-*core* G1896A em pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo.

Silva (2003) estudando os padrões sorológicos do VHB observou VHB-DNA reagente em 81% dos pacientes que apresentavam AgHBs positivo e AgHBe negativo.

Os índices da hepatite crônica B AgHBe negativo têm aumentado nas últimas décadas (RIZZETTO & VOLVES, 2000), contudo os dados clínicos e experimentais demonstraram que uma infecção primária com mutante pré-*core* raramente produz cronicidade. Assim crianças nascidas de mães AgHBe negativo e adultos que adquiram o VHB de portadores do AgHBs e AgHBe negativos geralmente não evoluem para a forma crônica. A presença do VHB-DNA no soro é a melhor indicação da replicação viral ativa sendo detectada por métodos de hibridização ou pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sendo esta última técnica a mais sensível. A quantificação do VHB-DNA no soro é importante para o diagnóstico diferencial com o portador crônico inativo do AgHBs, além de apresentar fator

preditivo da resposta ao tratamento com *interferon* (HADZIYANNIS & VASSILOPOULOS, 2001).

2.6 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VHB

O VHB é transmitido principalmente através de exposição percutânea ou de mucosas aos fluidos corpóreos ou a sangue contaminado. As maiores concentrações de vírus são verificadas no sangue e secreções serosas, diminuindo consideravelmente no sêmen, fluido vaginal e saliva. As principais formas de contágio são: transmissão perinatal, relações sexuais, transfusão de sangue ou derivados, uso de drogas intravenosas, transplante de órgãos ou tecidos, lesões de pele ou acidentes com agulhas, principalmente entre profissionais da área de saúde. A saliva pode ser veículo de transmissão em caso de mordidas, porém não foram documentados casos de transmissão por beijo ou outros tipos de exposição à saliva. Outros fluidos corporais, incluindo lágrimas, suor, urina, fezes, leite materno, líquido e líquido sinovial, podem apresentar o AgHBs, porém não o *virion* intacto, razão pela qual não têm sido associados com transmissão (FOCACCIA et al., 1998).

A frequência do modo de transmissão varia de acordo com o padrão endêmico encontrado na região. Em regiões de alta prevalência a transmissão perinatal adquire grande importância, ao passo que em regiões de baixa prevalência a transmissão sexual e parenteral assume maior importância, já nos locais com padrão endêmico intermediário ocorre uma mistura de padrões evidenciando um comportamento epidemiológico variável (FERREIRA, 2000; FOCACCIA et al., 1998; LEE, 1997).

Os estudos sobre as formas de transmissão e a prevalência do AgHBs e do anti-HBs identificaram no mundo regiões de alta, intermediária e baixa endemicidade. As áreas de alta endemicidade são aquelas, onde grande parte da população infecta-se, principalmente no período perinatal e durante a infância. Considera-se que o limite inferior de prevalência de portadores do VHB nestas áreas seja de 5% a 10% e o limite superior chegue a cerca de 20%. A maior parte dos países nesta categoria apresenta uma prevalência de portadores entre 10% e 15% com cerca de 50% a 95% da população apresentando evidência sorológica de

infecção prévia pelo VHB. São áreas de alta endemicidade: África, Ásia a leste do subcontinente indiano, região do Pacífico, região amazônica, anel ártico, regiões do Oriente Médio, Ásia menor e Caribe. Algumas áreas do Leste da Europa como Bulgária, Romênia, Albânia e Moldávia apresentam uma prevalência de portadores do VHB entre 5% e 10% da população geral (FERREIRA, 2000; OKATH, 1990; SILVEIRA & FONSECA, 1999; TANAKA, 2000).

As áreas de endemicidade intermediária geralmente apresentam prevalência do VHB entre 2% e 5%, com cerca de 30% a 50% da população com evidência sorológica de infecção prévia pelo VHB. Algumas partes do Leste e do Sul da Europa, regiões do Oriente Médio, Ásia Ocidental incluindo o subcontinente indiano e partes da América Central e do Sul são consideradas de categoria intermediária. Nestas áreas, ocorre um misto de transmissão na infância e entre adultos. A Hepatite viral aguda com icterícia ocorre com freqüência nestas regiões, uma vez que a doença sintomática é mais comum entre adolescentes e adultos e que este grupo é particularmente acometido em áreas de endemicidade intermediária (FERREIRA, 2000; FOCACCIA et al., 1998; OKATH, 1990; SILVEIRA & FONSECA, 1999).

São consideradas áreas de baixa endemicidade: América do Norte, Europa Ocidental, Austrália e partes da América do Sul. Nestas regiões a transmissão perinatal e na infância é relativamente incomum. A maioria das infecções ocorre entre adultos por via de transmissão sexual, uso de drogas injetáveis ou exposição ocupacional a sangue e material contaminado. A Hepatite B aguda é uma causa freqüente de morbidade em alguns dos países citados desta categoria (FERREIRA, 2000; FOCACCIA et al., 1998; SILVEIRA & FONSECA, 1999; TASSOPOULOS, 1987).

A divisão das áreas de prevalência global deve ser interpretada como somatório aos achados regionais estes muito importantes na definição de estratégias de saúde (FERREIRA, 2000; MIRANDA et al., 2000).

No Brasil a endemicidade do AgHBs é heterogênea registrando-se índices intermediários na maioria das regiões variando entre 1% e 2%, contudo em indivíduos do Sudoeste do Paraná e em algumas populações indígenas da Região Norte do Brasil, foram encontrados índices que variavam entre 5% e 10%

(BENSABATH et al., 1984; BRAGA et al., 2001; FRANCO et al., 1985; GAYOTTO et al., 1984; MOREIRA et al., 1995).

No Amazonas, a infecção pelo VHB também apresenta distribuição heterogênea das taxas de prevalências do AgHBs. Enquanto em algumas áreas da Amazônia Ocidental como os vales dos rios Juruá, Purus e Madeira, registram-se índices de alta endemicidade (13,5%) em outras áreas localizadas na Amazônia Oriental estes índices variam de baixa a intermediária endemicidade.

Na cidade de Manaus Perdiz et al. (1994) observaram taxas de prevalência do AgHBs similares às encontradas na Amazônia Oriental (CLEMENTE & CARRILHO, 2003).

Em estudo de metanálise recente pôde-se concluir que em países como a República Dominicana, Brasil e Argentina há áreas de alta soroprevalência para o VHB na infância demonstrando risco elevado de transmissão vertical, além disso, existem diferentes padrões epidemiológicos entre os países e regiões caracterizado pelo possível baixo risco de transmissão vertical em São Paulo e pelo possível maior risco de transmissão vertical na Argentina. Adicionalmente todos os países apresentaram evidência de transmissão horizontal em adolescentes e adultos jovens, possivelmente por transmissão sexual. Apesar de diversos autores terem detectado alta prevalência de VHB em populações de menor nível socioeconômico, este achado não foi confirmado em estudo na cidade de São Paulo, devido a possíveis diferenças regionais (FOCACCIA et al., 1998; SILVEIRA & FONSECA, 1999; TANAKA, 2000).

Crianças mais jovens raramente desenvolvem infecção por VHB sintomática com icterícia, contudo 25% das crianças infectadas antes dos sete anos de idade tornar-se-ão portadoras crônicas do VHB. Quanto mais jovem a criança, maior a chance de tornar-se portadora. Muitos dos portadores que adquirem a infecção durante a infância poderão desenvolver cirrose e ou hepatocarcinoma, após um período de latência de 30 a 60 anos. Depois dos sete anos as crianças passam a exibir um padrão epidemiológico de adultos, com cerca de 5% a 10% tornando-se portadores crônicos (BEASLEY et al., 1982; FERREIRA, 2000; GONÇALES, 1996; LEE, 1997).

A transmissão perinatal é um dos modos mais eficientes de transmissão do VHB. Esta transmissão ocorre de mães positivas tanto do AgHBs quanto para o AgHBe do VHB. Mais de 90% destas mães são portadoras crônicas do VHB, embora também seja possível que mães agudamente infectadas durante a gravidez transmitam o vírus para os filhos. Mulheres portadoras do AgHBe apresentam uma chance de 70% a 90% de infectar seus recém-natos de modo perinatal, sendo que quase 100% destes tornar-se-ão cronicamente infectados, raramente desenvolvendo hepatite aguda, embora haja relatos de óbitos por hepatite fulminante nesta faixa etária. Estes portadores formaram posteriormente um grupo de indivíduos infectados com potencial perpetuador da infecção na comunidade e, até mesmo, eventualmente, para suas futuras proles. Recém-natos de mães AgHBe negativo tem menor chance de se tornarem portadores por via perinatal (GONÇALES, 1996; LEE, 1997; LOK et al., 1987; FERREIRA, 2000).

A transmissão horizontal de criança para criança é responsável por boa parte das infecções pelo VHB. Apesar de ainda não se saber com exatidão os mecanismos deste tipo de transmissão, acredita-se que as lesões de continuidade cutânea associada ao contato íntimo representem um papel fundamental neste modo de transmissão. Outros mecanismos como reuso de material médico ou dentário não esterilizado, tatuagens e outras escarificações, uso de objetos abrasivos domésticos, atividade sexual e a pré-mastigação dos alimentos, muito comum em algumas culturas, ainda permanecem sem comprovação científica (LEE, 1997; LOK et al., 1987).

A transmissão para adultos é a forma primária de transmissão em áreas de baixa endemicidade onde há grande quantidade de população suscetível. Cerca de um terço dos adultos recém-infectados desenvolve hepatite B clínica com icterícia. Destes, cerca de 6% a 10% se tornam portadores crônicos com subsequente risco de desenvolvimento de hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma. A transmissão sexual tanto hetero quanto homossexual é responsável pela maior parte das formas de contágio neste grupo. Em algumas regiões, o compartilhamento de agulhas por usuários de drogas também é considerado uma importante forma de transmissão do VHB. Além disso, em áreas de endemicidade baixa e intermediária, a hepatite B apresenta o maior risco ocupacional para trabalhadores da área da saúde. A transmissão por sangue e derivados ou por material médico-odontológico não

esterilizado também pode ocorrer, ganhando importância relativa em locais de baixas e médias endemicidade. (ALTER et al., 1972; ALTER et al., 1990).

No entanto, o risco de infecção da hepatite B por transfusão reduziu drasticamente após a inclusão de métodos sorológicos de pesquisa do VHB. Nos anos sessenta os riscos de contágio eram acima de 50% nos Estados Unidos da América (EUA). Em regiões que não apresentam condições sócio-econômicas favoráveis se observam ainda riscos de infectividade por transfusão. Em alguns países as condições de estoque do sangue não são as ideais. Em um estudo, foram detectados recipientes de coleta contaminados pelo VHB em 12 países da América Latina. Os relatos mais freqüentes de contágio pós-transplante se relacionam ao transplante renal ou cardíaco, sendo mais freqüente após o transplante. A hepatite aguda ou crônica é causada por reativação (transplante renal) ou reinfeção (transplante hepático). Existe a possibilidade de contágio por procedimentos invasivos no período pré-transplante. Em um estudo retrospectivo foi observada uma alta prevalência do VHB em transplantados cardíacos. Os órgãos doados são rotineiramente pesquisados para AgHBs porém os infectados podem advir de órgãos com resíduos de sangue no pedículo vascular. Adicionalmente todos os modos de transmissão horizontais citados para a população pediátrica também podem ocorrer entre adultos (ALTER et al., 1972; ALTER et al., 1990; FERREIRA, 2000; FOCACCIA et al., 1998; LEE, 1997; LUNEL et al., 2000; SCHUMUNIS et al., 1998).

2.7 IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO CRÔNICA PELO VHB

A patogênese da infecção crônica pelo VHB não é bem conhecida, havendo um consenso de que a lesão hepática é imunomediada. O VHB é preferencialmente hepatotrópico, mas não citopático e acredita-se que após o reconhecimento dos peptídeos virais pelas moléculas HLA classe I nos hepatócitos infectados, os linfócitos T citotóxicos (CTLs) ativados causam o dano hepático (CHISARI & FERRARI, 1995).

A causa dominante da persistência viral nos pacientes cronicamente infectados é que eles têm baixa reatividade das células T aos antígenos virais. Nos

pacientes com hepatite B crônica, vários graus de infiltrados de células mononucleares, predominantemente células T, são encontrados no fígado. Embora a resposta específica das células T ao VHB seja fraca para controlar eficientemente a replicação do VHB, elas podem destruir os hepatócitos e no decorrer dos anos esta atividade inflamatória pode levar à cirrose. As razões para esta natureza ineficiente, embora deletéria, da resposta imune celular na hepatite B crônica não são bem conhecidas. Os mecanismos para a persistência viral em geral podem envolver fatores virais e do hospedeiro. Na infecção pelo VHB é conhecido que o AgHBe tem um efeito imunomodulador, contudo outros fatores podem também produzir efeito imunomodulador como as citocinas imunoregulatórias. Estudos demonstram que as células dendríticas geradas de pacientes com hepatite B crônica produzem menor quantidade de interleucina-12 sendo possível que a fraca reatividade das células T na hepatite B crônica seja secundária ao déficit funcional das células dendríticas. Embora esteja claro que as mutações do VHB possam impedir o reconhecimento de antígenos virais pelos CTLs, este parece ser um evento pouco freqüente no estabelecimento da persistência do VHB (BERTOLETTI et al., 1994; CHISARI & FERRARI, 1995; MILICH et al., 1997; RECHERMANN et al., 1995).

Análises recentes da freqüência e função das células T CD8+ VHB-específicas, circulantes e intra-hepáticas, em pacientes com infecção crônica pelo VHB indicam que o número real destes CTLs vírus-específicos no fígado é similar para os dois grupos contrastantes de pacientes: portadores inativos do AgHBs com VHB DNA sérico indetectável e nenhuma atividade inflamatória hepática, e pacientes portadores do AgHBs mas com VHB DNA sérico elevado e significativa atividade inflamatória hepática. Nestes a freqüência das células T CD8+ vírus-específicas foram mais baixas, uma vez que, estavam diluídas em números maiores de células T aparentemente não-específicas, as quais são ou parecem ser a parte predominante dos linfócitos que infiltram o fígado nestes pacientes. Estes dados sugerem que o dano hepático progressivo na hepatite B crônica é o resultado da acumulação de células T não específicas. A morte das células hepáticas ocorre como resultado de apoptose ou necrose em que a perda da integridade da membrana plasmática e a liberação do conteúdo citoplasmático nas circunjacências da célula provocam a reação inflamatória.

Após o reconhecimento dos peptídeos virais expressados com moléculas HLA classe I nos hepatócitos infectados, os CTLs enviam um sinal apoptótico, mediado pelas vias ligante de Fas (FasL) e perforinas, destruindo os hepatócitos-alvo. O FasL é expressado em células T ativadas e demonstraram ter um papel essencial no desenvolvimento da hepatite crônica. Um outro mecanismo que poderia causar dano hepático crônico sem a necessidade de interação antígeno-específica entre células efetoras e células alvo, envolve uma interação cooperativa entre CD40 e Fas resultando em apoptose hepatocítica. A ligação de moléculas CD40 (CD40L), expressadas por linfócitos e macrófagos ativados que infiltram o fígado, desencadeiam apoptose amplificando a morte hepatocítica Fas-dependente (CHISARI, 1995; GUIDOTTI et al., 1996).

Nos últimos anos, uma série de estudos realizados pelo grupo de Chisari (1995) usando um modelo de infecção pelo VHB em ratos transgênicos, revelou que as células T citotóxicas vírus-específicas, podem abolir a replicação e a expressão genética do VHB no fígado sem a destruição de hepatócitos infectados. Este efeito é mediado pelo interferon gama e pelo fator de necrose tumoral alfa, que são secretados por células T citotóxicas após reconhecimento de antígenos nas células-alvo. Foi demonstrado que as duas citocinas eliminam os nucleocapsídeos do VHB e seu conteúdo de VHB DNA é replicativo do fígado de ratos dentro de 24 horas. Todos os produtos de genes do VHB, incluindo os RNAs virais, seus produtos de tradução e os intermediários de DNA replicativo são suscetíveis a esta inativação da replicação do VHB mediada por citocinas. A administração de interleucina-12 recombinante, o mais potente indutor de interferon gama, também aboliu a replicação do VHB sem evidência bioquímica ou histológica de hepatite no fígado de ratos transgênicos infectados pelo VHB.

Além disso, a capacidade do interferon gama e do fator de necrose tumoral alfa de suprimir a expressão genética do VHB indica que os hepatócitos infectados são participantes ativos deste processo e respondem aos sinais induzidos pelas citocinas ativando as vias intracelulares que interrompem o ciclo de vida viral. Em recentes experimentos *in vitro* demonstrou-se que o interferon gama recombinante reduz marcadamente, mas não elimina o VHB DNA e o VHB RNA também em hepatócitos humanos naturalmente infectados com o VHB. Ao mesmo tempo houve indução de genes celulares responsivos ao interferon, tais como o fator responsivo

ao interferon-1 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sugerindo que a produção intracelular de óxido nítrico possa representar um dos mecanismos intracelulares para a inativação do VHB, este conceito é apoiado pelos achados em ratos transgênicos infectados pelo VHB que mostram que ratos deficientes em iNOS são insensíveis aos efeitos antivirais não citopáticos do interferon gama (CAVANAUGH et al., 1997; GUIDOTTI et al., 2000).

Independente dos linfócitos T citotóxicos, as células T *helper* CD4+ são outra fonte rica de interferon gama no fígado. Além disso, interferon gama é um poderoso ativador de macrófagos e é provável que este efeito seja aumentado pela produção de fator de necrose tumoral alfa por macrófagos ativados. Dessa forma em pacientes infectados pelo VHB o interferon gama e o fator de necrose tumoral alfa produzidos por diferentes tipos celulares infiltrados no fígado exercem sua atividade antiviral sobre os hepatócitos infectados pelo VHB (GUIDOTTI et al., 2000).

2.8 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VHB

Após uma infecção aguda pelo VHB, diversas manifestações clínicas e diferentes evoluções podem ser observadas nos pacientes infectados. A recuperação da hepatite aguda é dependente da resposta das células B que produzem anticorpos contra os antígenos das regiões pré-S/S, bem como da resposta das células T. Assim pacientes com infecção aguda autolimitada pelo VHB exibem uma vigorosa resposta policlonal HLA classe I restrita dos linfócitos T citotóxicos (CTL) contra múltiplos epítomos presentes nas regiões do envelope do nucleocapsídeo e da polimerase do VHB. Esta resposta é mantida por décadas após a recuperação da infecção. A resposta dos CTLs é mantida por fragmentos residuais do VHB que podem ser detectados no fígado e nos linfócitos do sangue periférico, indicando que a completa eliminação deste vírus é raramente observada, mesmo nos pacientes considerados curados. Quando a resposta dos CTLs é fraca e limitada a poucos epítomos, a infecção pode se tornar crônica. Nestes pacientes a resposta das células T-*helper* CD4+ também se mostra fraca (LOK, 2000; PENNA et al., 1996).

Vários fatores estão implicados no desenvolvimento e na evolução da infecção crônica pelo VHB. Entre estes, estão a época de aquisição da infecção, aspectos relativos à raça, gênero do hospedeiro e genótipo do VHB. A progressão para o estado de portador crônico do VHB é percentualmente maior nos indivíduos infectados pela via vertical ou durante o período perinatal. Isto é freqüentemente encontrado nos países orientais, onde cerca de 90% a 95% destes recém-nascidos que estão com seu sistema imunológico ainda imaturo, se tornarão portadores crônicos do VHB, contrastando com os 5% a 10% de portadores crônicos comumente observados nos casos de pacientes que se infectam pelo VHB na idade adulta (países ocidentais). A infecção crônica pode produzir quadros de portador sadio do VHB, hepatite crônica persistente (HCP), hepatite crônica ativa (HCA), cirrose hepática e hepatocarcinoma, após vários anos de evolução. Nestes indivíduos cronicamente infectados com o VHB e que são AgHBs e AgHBe reagentes, podem em dado momento da evolução, surgir espontaneamente os anticorpos anti-HBe (soroconversão) significando que cessou a replicação viral. Esta negativação do AgHBe precede a remissão clínica da doença. Após um tempo variável poderá ocorrer negativação do AgHBs (REALDI et al., 1980; CHANG et al., 1989; MARGOLIS et al., 1991; ALTER, 1996; LEE, 1997; LOK, 2001).

Nos pacientes com infecção crônica pelo VHB existem diferentes fases evolutivas. Em pacientes com infecção adquirida no período perinatal, observa-se uma fase inicial replicativa subdividida em duas fases distintas e seqüenciais. Inicialmente existe uma fase de imunotolerância que se caracteriza por altos níveis de replicação viral, sem atividade hepática e com baixíssimas taxas de soroconversão espontânea do AgHBe. Nesta época o sistema imune é muito tolerante ao VHB e os pacientes são usualmente assintomáticos, com doença hepática leve, apesar do alto grau de atividade da doença. Esta fase dura cerca de 15 a 35 anos caracterizando-se por uma resposta imune mínima ou ausente das células T aos estímulos antigênicos (CHANG et al., 1989; LOK et al., 1988; LOK et al., 1993).

Os mecanismos de indução da imunotolerância são desconhecidos. É provável que a passagem do AgHBe através da placenta durante a gravidez, possa induzir tolerância no feto por deleção das células T, aptas a responder ao AgHBe, produzindo um estado de exaustão imune. As células T do recém-nascido infectado

também não exibirão reação cruzada contra o AgHBc. Durante esta fase o AgHBs, o AgHBe e o VHB-DNA estarão reagentes no soro e os níveis da ALT não sofrerão flutuações. A atividade histológica é mínima, conseqüente à pequena atividade imune contra os hepatócitos. Ainda na fase replicativa por razões desconhecidas a imunotolerância cessa e os pacientes entram em uma fase de imunoclearamento ou imunoeliminação, com taxas anuais de soroconversão do AgHBe de 15%. Durante esta soroconversão ocorrem exacerbações (*flar*) da doença hepática, produzidas pelo aumento da fagocitose pelo sistema imune, levando a maior lise dos hepatócitos infectados. Nesta fase de imunoclearamento a quantidade de DNA viral sérico declinará progressivamente e aumentarão os níveis de ALT (CHU et al., 1997; FARREL, 2000; LIAW et al., 1983).

A transição para a segunda fase, ou seja, não replicativa, pode ser rápida e silenciosa ou prolongada e com exacerbações recorrentes. Em alguns pacientes existe uma recrudescência dos sintomas da hepatite aguda. Raramente podem ser observados casos de falência hepática progressiva, havendo um aumento consecutivo da freqüência de pacientes positivos para o anti-HBe. Ao final da fase de imunoeliminação todos os pacientes terão soroconvertido para o anti-HBe, apresentarão aumento da concentração de ALT e importante atividade inflamatória no fígado, reflexo da resposta imunológica para tentar eliminar os hepatócitos infectados. Após alguns episódios de elevações da ALT, os níveis desta enzima se normalizarão e assumirão o padrão da infecção não replicativa. Enquanto não ocorrer a eliminação do VHB as tentativas de fagocitar os hepatócitos infectados, se sucederão com elevações intermitentes ou continuadas da ALT, progressão e persistência da hepatite crônica (FATTOVICH et al., 1995; LOK et al., 1988; LOK, 2001; MILICH et al., 1998).

Depois de uma fase de imunoclearamento bem sucedida, tem início a fase não replicativa que ocorre durante ou após a soroconversão do AgHBe. É usualmente precedida por marcante diminuição ou ausência do VHB-DNA, normalização da ALT e resolução da necroinflamação hepática. Alguns doentes, não replicantes, permanecem AgHBs reagentes porém a maioria não terá o VHB-DNA detectável no soro pela PCR. Estes pacientes com AgHBs reagentes, apresentam doença hepática inativa sem evidências clínica ou laboratorial de replicação ou hepatite. Este estado da infecção pelo VHB é denominado de estado de portador

crônico inativo do AgHBs. O prognóstico desta fase é usualmente benigno. Um estudo de seguimento destes pacientes, durante dezoito anos revelou que a grande maioria mantém o estado de remissão e representam baixo risco de desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma, contudo 20% a 30% revelaram reativação espontânea ou induzida da hepatite, com reaparecimento de altos níveis da ALT e do VHB-DNA, com ou sem soroconversão do AgHBe. Alguns doentes cronicamente infectados pelo VHB AgHBe negativos, apresentarão flutuações nos níveis da ALT devido à presença de cepas selvagens residuais de VHB (que ainda não soroconverteram para o anti-HBe) ou devido a presença de cepas do VHB com mutações na região do pré-*core* ou do *core-promoter* sem produção de AgHBe (HSU et al., 2002; LIAW et al., 1988; LOK et al., 2000; LOK & MC MAHON, 2001).

Nos indivíduos infectados na infância ou na idade adulta, observam-se somente duas fases: uma fase inicial de imunoclearamento com intensa replicação viral e doença hepática ativa (AgHBe positiva) e uma fase não replicante, com doença hepática inativa (AgHBe negativa). Durante a fase de replicação ocorrem vários episódios de necroinflamação e regeneração do fígado. Este processo é responsável pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose do fígado. Se houver remissões bioquímicas com parada da replicação viral (soroconversão do AgHBe e negativação do VHB-DNA), os pacientes apresentarão melhor evolução, mesmo em estágio avançado de lesão hepática (HOOFNAGLE et al., 1987; LOK, 1993; REALDI et al., 1980).

A infecção pelo VHB na idade adulta, geralmente leva a recuperação e ao desenvolvimento de imunidade específica na maioria dos pacientes (92%), tanto naqueles que apresentaram quadros de hepatite aguda quanto nos que tiveram doença subclínica (PAYNE et al., 1996).

Se após seis meses do quadro agudo o AgHBs ainda for detectado no soro a infecção será considerada crônica com tendência a manutenção sorológica do AgHBs e progressão no futuro. Nestes pacientes inicialmente além da persistência do AgHBs no soro se observa também a presença do VHB-DNA e o AgHBe, geralmente em altos títulos (FONG et al., 1994; HOOFNAGLE et al., 1987; PAYNE et al., 1996; THOMAS, 1990; WEBSTER et al., 2000).

A hepatite pelo VHB costuma no início do quadro crônico ser subclínica e geralmente leve, particularmente em crianças, quando as aminotransferases podem

se apresentar com valores normais. Apesar da infecção pelo VHB ser incomum em crianças ocidentais, existem certas situações onde a prevalência é maior, como se observa em crianças transfundidas, em crianças nascidas de mães AgHBs positivas que não receberam profilaxia ou que a mesma foi ineficaz, em crianças contactantes domiciliares de adultos AgHBs positivos ou em crianças oriundas de zonas de alta endemicidade. Nestes casos a hepatite costuma ser silenciosa, indolente e quase sempre assintomática. Inicialmente a maioria delas é AgHB_e positiva e muitas apresentam dosagens de ALT normais ou com valores muito próximos do normal. A soroconversão espontânea ocorre mais freqüentemente na adolescência. Doença grave pode ser encontrada em cerca de 30% destas, com ocorrências de falência hepática e hepatocarcinoma (BORTOLOTTI et al., 1998; FUGISAWA et al., 2000; LOK et al., 1988; LOK, 2000; LOK et al., 2001; SHAPIRO, 1993; TANG et al., 1998).

Um importante evento na história natural da infecção crônica pelo VHB é a perda do AgHB_e com a conseqüente soroconversão para o seu anticorpo. Esta soroconversão geralmente é precedida por uma queda acentuada dos níveis de VHB DNA, pela queda dos níveis séricos da ALT e pela persistência do AgHBs. A soroconversão geralmente representa a transição do estado de VHB crônico para um estado inativo de portador do VHB em que há poucas evidências de hepatite e níveis indetectáveis de VHB DNA no soro. Estima-se que 5% a 15% dos pacientes com infecção crônica pelo VHB soroconvertem espontaneamente a cada ano, persistindo então com ALT sérica normal e com mínimas alterações na biópsia hepática. Esta doença hepática geralmente não progredirá e o desenvolvimento de hepatocarcinoma será raramente observado (DE FRANCHIS et al., 1993; DE JONGH et al., 1992; DI BISCEGLIE et al., 1987; HOOFNAGLE, 1981; HOOFNAGLE et al., 1987; LOK et al., 2001).

Porém, nem todos os pacientes que soroconvertem manterão uma remissão sustentada da doença. Parte destes permanecerão AgHB_e negativos, porém apresentarão altos níveis séricos de VHB DNA acompanhados de aumentos persistentes ou intermitentes da ALT sérica. Estes indivíduos geralmente abrigam variantes do VHB, que apresentam mutações nas regiões do pré-*core* ou do *core promoter* e terão o quadro clínico de hepatite crônica AgHB_e negativo, que é uma forma grave e progressiva da infecção por este vírus. A mutação predominante ocorre na região pré-*core* com a troca de G (guanina) por A (adenina) no nucleotídeo

1896 que leva à terminação prematura da proteína pré-core no códon 28, impedindo assim a produção do AgHBe (BRUNETTO et al., 1990; CARMAN et al., 1989; OKAMOTO et al., 1994)

É importante considerar que nem todo o doente com hepatite B crônica AgHBe negativo e VHB DNA positivo alberga vírus mutante, pois sabe-se que alguns pacientes podem continuar a apresentar baixos níveis de VHB selvagem. Estes mutantes do VHB, dada sua replicação continuada levam à lesão hepática severa e progressiva. Na maioria dos pacientes a doença hepática progride para a cirrose após múltiplos episódios de exacerbações da ALT. Muitos pesquisadores acreditam que a hepatite crônica B AgHBe negativo é usualmente mais comum que a hepatite crônica B AgHBe positivo (vírus selvagem), porque a hepatite crônica B AgHBe negativo com mutante A₁₈₉₆ é mais prevalente que o vírus selvagem. Este tipo de infecção é muito comum na Europa e na Ásia, onde 30% a 80% dos pacientes com infecção crônica pelo VHB são AgHBe negativos, comparado com o norte da Europa e com os Estados Unidos, onde somente 10% a 40% dos pacientes cronicamente infectados pelo VHB são AgHBe negativos. No Brasil não temos estudo em escala nacional estimando a ocorrência destes mutantes nas várias regiões do país (BRUNETTO et al., 1990; CARMAN et al., 1989; CHAN et al., 2000; HADZIYANNIS, 1995; LOK, 2000; LOK et al., 2001; MIYAKAWA et al., 1997; OKAMOTO et al., 1994; RIZZETTO et al., 2000).

Em suma, quando a transmissão da infecção pelo VHB ocorre no período perinatal a maioria dos pacientes infectados apresentam hepatite aguda subclínica e evoluem para a cronicidade, e quando a transmissão ocorre em outras faixas etárias distantes do período perinatal a hepatite aguda é freqüente e a hepatite crônica B ocorre em apenas 5% a 10% dos casos. Acredita-se que as células mononucleares periféricas destes pacientes produzam quantidades subnormais de alfa interferon, associado à ativação anormal dos hepatócitos pelo interferon (TOLENTINO et al., 1985).

É possível que a ausência de ativação dos hepatócitos pelo interferon não produza a indução das proteínas do sistema MHC, assim durante a replicação do VHB, as células T não lesam os hepatócitos infectados porque o VHB suprime a expressão das proteínas MHC da classe I (IKEDA et al., 1986; JACYNA & THOMAS, 1993; POITRINE et al., 1985).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Descrever as características clínicas e moleculares de portadores crônicos do AgHBs com *status* sorológico AgHBe negativo e anti-HBe positivo naturais da Amazônia Ocidental Brasileira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o VHB DNA pela PCR das amostras séricas dos pacientes portadores crônicos do AgHBs com *status* sorológico AgHBe negativo e anti-HBe positivo;
2. Identificar o genótipo das amostras séricas VHB DNA reagentes;
3. Caracterizar os pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo através do exame clínico e complementar.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido em Manaus, na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), centro de referência para o diagnóstico e tratamento das hepatites virais na Amazônia Ocidental Brasileira, responsável pelo ensino, pesquisa e assistência das doenças infecciosas e parasitárias no Estado do Amazonas. Para a assistência a FMTAM possui uma Unidade de Internação com 102 leitos, Unidade de Terapia Intensiva e um Pronto Atendimento para os casos de Urgência. Possui ainda uma Unidade Ambulatorial com 14 consultórios sendo que dois destes são exclusivamente para o atendimento ambulatorial dos casos de hepatites.

Para diagnóstico e pesquisa das hepatites, a FMTAM possui na sua estrutura, uma Gerência de Virologia com laboratório especializado para o diagnóstico sorológico e molecular, constituído de Pesquisadores, Médicos, bioquímicos, Biólogos, Técnicos de Laboratório e Agentes Administrativos.

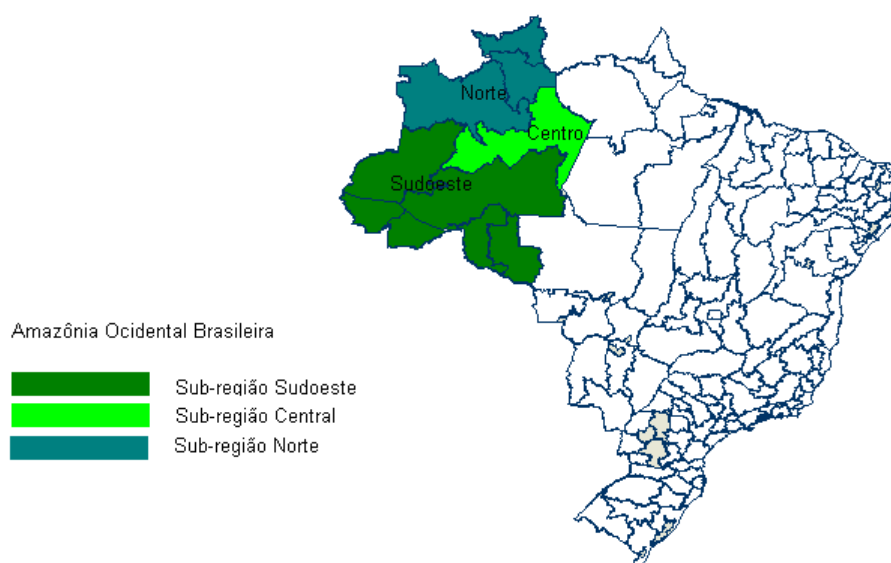


Figura 1: Mapa de localização geográfica da Amazônia Ocidental Brasileira.

Fonte: IBGE, 2000

4.2 MODELO DO ESTUDO

O modelo do estudo foi do tipo descritivo de caso, desenvolvido com a demanda ao ambulatório de hepatites virais da FMTAM, de pacientes portadores crônicos do AgHBs, com *status* sorológico AgHBe negativo e anti-HBe positivo, no período de janeiro a dezembro de 2005.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população do estudo foram os pacientes portadores do AgHBs há mais de seis meses, que procuraram atendimento com o pesquisador no ambulatório de hepatites virais da FMTAM, no período do estudo.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO

- a. Pacientes portadores crônicos do AgHBs com *status* sorológico AgHBe negativo e anti-HBe positivo;
- b. Reação sérica reagente qualitativa para o VHB DNA pela PCR;
- c. Naturais da Amazônia Ocidental Brasileira;
- d. Pacientes de ambos os sexos e de todas as faixas etárias;

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DO ESTUDO

- a. Pacientes co-infectados com o vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), com o vírus da hepatite C e ou com o vírus da hepatite Delta;
- b. Pacientes com história de etilismo crônico ou em uso de drogas imunossupressoras nos últimos seis meses;
- c. Pacientes portadores de diabetes, hipertensão arterial em uso contínuo de medicamentos;
- d. Pacientes portadores de outras causas de elevação de aminotransferases, como: gestação ou estado puerperal, abuso de ingestão de bebida alcoólica, uso recente de drogas hepatotóxicas, comorbidades de natureza auto-imune ou metabólica.

4.6 PROCEDIMENTOS

No período de acompanhamento clínico foi realizada uma biópsia hepática percutânea em cada paciente selecionado para a pesquisa. Durante as consultas, além da rotina hematológica, bioquímica e sorológica foram coletadas 15 mL de amostra de sangue periférico que foram centrifugadas e aliqüotadas e o plasma armazenado a -70 °C sendo posteriormente encaminhado para o laboratório de Biotecnologia do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para amplificação, seqüenciamento e genotipagem do VHB.

No estudo foram considerados como portadores de hepatite crônica B AgHBe negativo aqueles pacientes portadores crônicos do AgHBs, com AgHBe negativo e anti-HBe positivo, que apresentaram reação sérica reagente qualitativa para o VHB DNA pela PCR, com atividade necroinflamatória à biópsia hepática.

O protocolo da pesquisa foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMTAM e seguiu as determinações definidas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

Os participantes selecionados foram informados dos objetivos, vantagens e possíveis riscos dos procedimentos e sua participação foi autorizado mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO H).

Os pacientes selecionados que aceitaram fazer parte do estudo, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram acompanhados ambulatorialmente durante um ano.

Aqueles que por algum motivo não aceitaram em participar do estudo tiveram assegurado à continuidade da assistência, conforme documento aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da FMTAM.

4.6.1 Exame Clínico

Durante o período de acompanhamento da população do estudo no ambulatório de hepatites virais FMTAM, os pacientes foram avaliados três vezes

durante um ano, com intervalos mensais, sendo os resultados das análises, após processamento apresentados em forma de médias, representativas individuais das várias coletas realizadas no período do estudo.

Para registro das visitas clínicas dos pacientes selecionados foi utilizada uma ficha clínica que consta dos seguintes dados: data do atendimento, registro na FMTAM, nome, idade, gênero, telefone, naturalidade, procedência, ocupação, motivo da consulta, período de evolução da doença hepática, dados clínicos sintomas de insuficiência hepática crônica, antecedentes pessoais preditivos de insuficiência hepática crônica e sinais de insuficiência hepática crônica (ANEXO A).

4.6.2 Exames Hematológicos, Bioquímicos e Sorológicos

Durante o acompanhamento dos pacientes portadores crônicos do AgHBs, com AgHBe negativo e anti-HBe positivo, para avaliação hematológica, bioquímica e sorológica foram coletadas amostras de sangue durante as visitas médicas.

Para avaliação hematológica foi coletado sangue através de punção venosa em tubo contendo EDTA para a realização da contagem de plaquetas, realizadas por sistema automatizado com aparelho *Coulter* modelo STK., sendo considerada plaquetopenia a contagem de plaquetas abaixo de 150.000/ μ L de sangue (SOARES et al. 2002).

Para avaliação bioquímica foram coletadas amostras de sangue, através de punção venosa em tubos sem anticoagulante para a realização dos exames que foram processados por sistema automatizado, com aparelho marca *Dade-Behring* modelo *Dimension*, com as seguintes variações da normalidade: aminotransferase do aspartato (AST) 15 a 37 UI/L; aminotransferase da alanina (ALT) 20 a 65 UI/L; bilirrubina total 0,00 a 1,00 mg/dL; alfa-fetoproteína até 10 UI/mL; TAP (Tempo de Atividade da Protrombina) 85 a 100% e albumina 3,6 a 5,0 g/dL (SOARES et al., 2002).

A avaliação sorológica foi realizada somente na primeira amostra da coleta de sangue, pelo método imunoenzimático, técnica *ELISA* (*Enzyme Liked Immnosorbent Assay*), para a confirmação do *status* sorológico da pesquisa (AgHBs positivo,

AgHBe negativo e anti-HBe positivo). Todos os pacientes que tiveram o seu *status* sorológico confirmado foram também testados, para hepatite C (anti-VHC), hepatite Delta (anti-VHD total) e para os anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (ANEXO B).

4.6.3 Exames Biomoleculares

Em todas as reações foram utilizadas amostras controle positivo de VHB DNA com carga viral ≥ 7000 cópias /mL com Kits comerciais *Amplicor HBV Monitor*TM do laboratório Roche[®].

Na extração do DNA das amostras selecionadas foi empregada a técnica desenvolvida por Karasawa et. al (1995), com modificações. A extração do DNA viral procedeu-se com uso do fenol hidratado e tamponado.

Foram utilizados os seguintes primers nas reações de amplificação do gene S pela PCR: P1 5'- TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3', S1 5'- CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3' para a primeira reação de PCR e P2 5'-TGC CTC TCA CAT CTC GTC AA-3', S1 5'- CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3' para a segunda reação de semi-*nested* PCR (ANEXO E).

O produto das reações semi-*nested* PCR do gene S foram visualizados em gel de agarose a 1,5 %. Para migração das amostras em gel na cuba de eletroforese, aplicou-se uma voltagem inicial de 70 volts e final de 100 a 120 volts. Ao termino da migração eletroforética as amostras foram visualizadas e fotografadas utilizando o sistema de captura de imagem *Image Master VDS FTI-500* (Amershan Pharmacia Biotec). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram uma banda de 600pb, quando comparadas ao padrão (ANEXO F).

As amostras positivas foram seqüenciadas pela PCR, utilizando-se os mesmos iniciadores senso e anti-senso utilizados na segunda reação de semi-*nested* PCR do gene S, P2 5'-TGC CTC TCA CAT CTC GTC AA-3', S1 5'- CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3'. Usamos o *Kit DYEnamic*TM *ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Mega BACE TM) da Amershan Bioscience conforme orientação do fabricante. As amostras foram submetidas ao seqüenciamento,

utilizando um seqüenciador automático *MegaBace 1000* da *Amershan Pharmacia Biotech* conforme descrito no método original de Sanger et al. (1997).

A extração do DNA viral procedeu-se com uso do fenol hidratado e tamponado, sendo utilizado nas reações de amplificação do gene C pela PCR os seguintes *primers*: P3 5'-GTG CAC TTC GCT TCA CCT CT-3' e S3 5'-CTA GAT CCC TGG ATG CTG GA-3', posições 1579 e 2153 na primeira reação de *nested* PCR e P4 5'-ATG TCG ACA ACC GAC CTT GA-3' e S4 5'-GAT TGG TGA GGT GAA CAA TG-3', posições 1680 e 2058 na segunda reação de *nested* PCR (ANEXO F).

O produto das reações *nested* PCR do gene C foram visualizados em gel de agarose a 1,5 %. Para migração das amostras em gel na cuba de eletroforese, aplicou-se uma voltagem inicial de 70 volts e final de 100 a 120 volts. Ao termino da migração eletroforética as amostras foram visualizadas e fotografadas utilizando o sistema de captura de imagem *Image Master VDS FTI-500* da *Amershan Pharmacia Biotech*. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram uma banda de 300pb, quando comparadas ao padrão (ANEXO F).

As amostras positivas foram seqüenciadas pela PCR, utilizando-se os mesmos iniciadores senso e anti-senso utilizados na segunda reação de *nested* PCR do gene C. As amostras foram submetidas ao seqüenciamento direto utilizando-se um seqüenciador automático *MegaBace 1000* da *Amershan Pharmacia Biotech* conforme descrito no método original de Sanger et al. (1997).

A análise das seqüências obtidas foi realizada por meio da comparação das seqüências obtidas do *GenBank* utilizando o programa *Blast*, com as já conhecidas dos diferentes genótipos do VHB. Para esta análise foram utilizados os pacotes de *software* livre *BioEdit 7.0.0* e *Mega 3.1*. A edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas obtidas foram realizadas no programa editor e de alinhamento de seqüências *BioEdit*. Após a edição das seqüências utilizando a opção *Graphic view* foi feito a pesquisa para localização e identificação das principais mutações dos dois genes utilizando como referencia seqüências dos diferentes genótipos do VHB obtidas no *GenBank*. Foram usadas as mesmas seqüências utilizadas na análise de genotipagem. A numeração adotada baseou-se na seqüência número de acesso X51970.(ANEXO D).

Para a análise filogenética do VHB foi realizada identificação genotípica das diferentes cepas obtidas, utilizando como parâmetro as seqüências nucleotídicas dos diferentes genótipos do VHB depositadas no *GenBank*. Esta análise foi conduzida utilizando o programa MEGA. Na construção da árvore filogenética aplicou-se o modelo de *Neighbor-Joining* (NJ). Os parâmetros definidos para esse modelo consideram principalmente as substituições da 1ª 2ª e 3ª posições o número de sítios conservados e variáveis e as transversões e transições. O nível de confiança foi obtido usando o método não paramétrico *bootstrap* baseado em 500 réplicas. A classificação genotípica foi realizada mediante análise de similaridade das seqüências obtidas no estudo e seqüências correspondentes aos genótipos de A-H obtidas do *GenBank*. As seqüências externas estão identificadas com seus respectivos números de acesso no banco de genes seguido da subclassificação genotípica de cada um, segundo Norder et al. (2004). As seqüências do estudo estão representadas pelas iniciais MAO e LAB e o número de identificação de cada uma no banco de dados (ANEXO C).

4.6.4 Exame de Biópsia Hepática

Foi realizada biópsia hepática, durante o período de acompanhamento dos pacientes selecionados para a pesquisa, conforme descrito por Sherlock & Dooley (2002), via intercostal com agulha de Menghini, respeitando-se as contra-indicações formais para a realização do procedimento (Tabela 1) (ANEXO B).

Tabela 1

Critérios clínicos e laboratoriais utilizados para a realização da biópsia hepática nos pacientes portadores crônicos do AgHBs com AgHBe negativo e anti-HBe positivo.

Exames	Valores mínimos	Ausência das comorbidades
Plaquetas	> 80.000 p/ mm ³	Doença hematológica
TAP	> 65%	Cisto hepático
RNI	> 1,5	Enfisema subcutâneo
Bilirrubina Total	> 5,0 mg%	Colangite
Glicemia	> 200 mg%	Septicemia

O tecido hepático (≥ 10 mm) foi colocado em formol tamponado a 10% e imediatamente enviado para exame histopatológico na Gerência de Patologia da FMTAM, sendo os resultados tabulados e apresentados de acordo com o sistema de Metavir. A atividade histológica foi mensurada pela intensidade das lesões necronflamatórias: PMN (*Peace Meal Necrosis*) e LN (*Lobular Necrosis*), graduadas da seguinte forma: A0= nenhuma atividade histológica de PMN, ausência ou leve atividade de LN, A1= atividade histológica leve de PMN ou moderada de LN, A2= atividade histológica moderada de PMN e atividade severa de LN e A3= atividade histológica severa de PMN. A fibrose foi mensurada em F0= nenhuma fibrose, F1= fibrose portal sem septos, F2= fibrose portal com septos, F3= fibrose septal sem cirrose e F4= cirrose estabelecida (BEDOSSA & POINARD, 1996).

4.6.5 Exame Ultrassonográfico do Abdome Superior

Foi solicitado durante as visitas dos pacientes selecionados para a pesquisa a realização de exame de investigação ultrassonográfica do abdome superior na FMTAM² para determinação de (ANEXO B):

2. O exame de investigação ultrassonográfico do abdome superior foi sempre realizado pelo mesmo médico examinador, segundo os critérios estabelecidos por Cerri & Rocha (1993)

1. Alterações sugestivas de hepatopatia crônica: fígado contraído (fígado normal tem lobo esquerdo=9 cm; lobo direito=12 cm), observação de atenuação do feixe sonoro e hiperecogenicidade do parênquima hepático, micronódulos (nódulos menores que 1,0 cm), fígado com textura heterogênea e com difícil visualização da estrutura vascular intra-hepática, amputação dos vasos portais intra-segmentares, superfície nodular e ascite.
2. Alterações ultrassonográficas associadas às hepatopatias crônicas: carcinoma hepático primário (lesão focal), litíase biliar, espessamento da parede da vesícula biliar (≥ 3 mm).
3. Sinais ultrassonográficos sugestivos de hipertensão portal:
 - a. Sinais maiores: circulação colateral (veia umbilical, veia gástrica esquerda e veias gástricas curtas), veia porta com calibre maior que 1,2 cm, veia esplênica e veia mesentérica com calibre maior que 0,9 cm.
 - b. Sinais menores: fibrose portal, ausência da variação respiratória no calibre dos vasos portais, esplenomegalia (baço maior que 12 cm no eixo longitudinal), amputação de pequenos vasos portais intra-hepáticos (CERRI & ROCHA, 1993; LU et al., 2003; ZHENG et al., 2003).

4.6.6 Exame Endoscópico do Trato Gastrointestinal Superior

Durante as visitas dos pacientes selecionados para a pesquisa foi realizada endoscopia do trato gastrointestinal superior em todos os pacientes a fim de avaliar a presença de varizes esôfago-gástricas e a presença de sinais preditivos de ruptura das varizes. O exame endoscópico foi realizado no laboratório de endoscopia da FMTAM³ utilizando-se um gastroscópio flexível da marca *Olympus GIF-E* (ANEXO B).

3. O exame endoscópico do trato gastrointestinal foi sempre realizado pelo mesmo médico examinador, seguindo os critérios endoscópicos diagnósticos da Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (2000).

Nos pacientes com hipertensão portal, a dilatação e o aumento da pressão nas veias peri-esofágicas são transmitidas às veias perfurantes que atravessam a camada muscular do esôfago e dilatam o plexo venoso da submucosa. Este plexo venoso dilatado é que se torna visível à endoscopia como varizes. A dilatação transmitida às veias intra-epiteliais resulta em manchas vermelhas na superfície das varizes, descritas por Beppu et al. (1981) como aspecto de vergão (*red weal*), cereja (*cherry red spots*) ou rubor difuso (*diffuse redness*).

As pressões altas exercidas na superfície das varizes contribuem para sua ruptura no esôfago distal. Geralmente a pressão na veia porta deve estar com 12 mmHg ou mais para o aparecimento das varizes esofágicas, embora nem sempre ocorra a correlação da pressão alta com a propensão da sua ruptura.

O melhor valor preditivo de ruptura das varizes esofágicas é o calibre, contudo as manchas descritas por Beppu et al. (1981), são também consideradas como sinais preditivo de sangramento e representativos da dilatação e da hipertensão das veias intra-epiteliais.

4.6.7 Análise Estatística

Os dados clínicos e complementares foram registrados em *software* livres: planilhas do *Open Office* (www.openoffice.org.br) e as análises estatísticas dos dados foram conduzidas utilizando-se o Epi-Info 2000 (www.cdc.gov/epiinfo).

A análise dos dados foi apresentada em gráficos, mapas e tabelas, bem como uma descrição textual dos resultados, utilizaram-se também testes estatísticos de associação e correlação como o Qui-quadrado, exato de Fisher e correlação de Pearson, entre outros apropriados para as análises estatísticas. Adotamos o nível de significância de 5% para os testes estatísticos (VIEIRA & HOSSNE, 2003).

RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

No período de janeiro a dezembro de 2005 foram avaliados 55 pacientes portadores crônicos do AgHBs, com o *status* sorológico AgHBe negativo e VHB DNA reagente pela PCR. Após análise histológica da biópsia hepática foram identificados 63,64% (N=35/55) de pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo e 36,36% (N=20/55) de casos de portadores inativos do AgHBs (Figura 2).

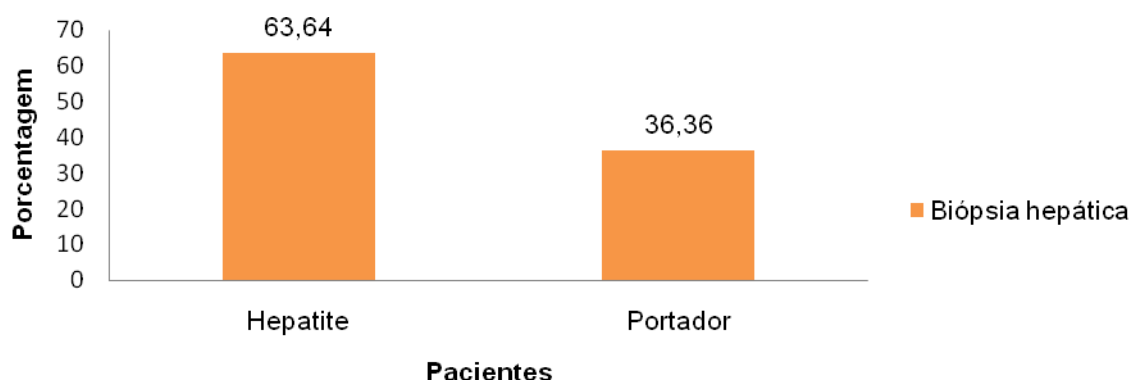


Figura 2: Porcentagem de pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo e portadores inativos do AgHBs no exame histológico da biópsia hepática (N=55).

5.1.1 Gênero e faixa etária

Em relação ao gênero, observaram-se neste estudo dominância do gênero masculino 60% (N=33/55), sendo que nos pacientes com hepatite o gênero masculino foi observado em 41,81% (N=23/55) e o feminino em 21,81% (N=12/55), contudo nos portadores os dois gêneros apresentaram a mesma porcentagem de distribuição, 18,18% (N=10/55). Na população de gênero masculino verificou-se uma porcentagem de 69,69% (N=23/33) de casos de hepatite e 30,30% de portadores (N=10/33). Na população de gênero feminino observou-se uma porcentagem de 54,54% (N=12/22) de casos de hepatite e 45,45% (N=10/22) de portadores inativos do AgHBs (Figura 3).

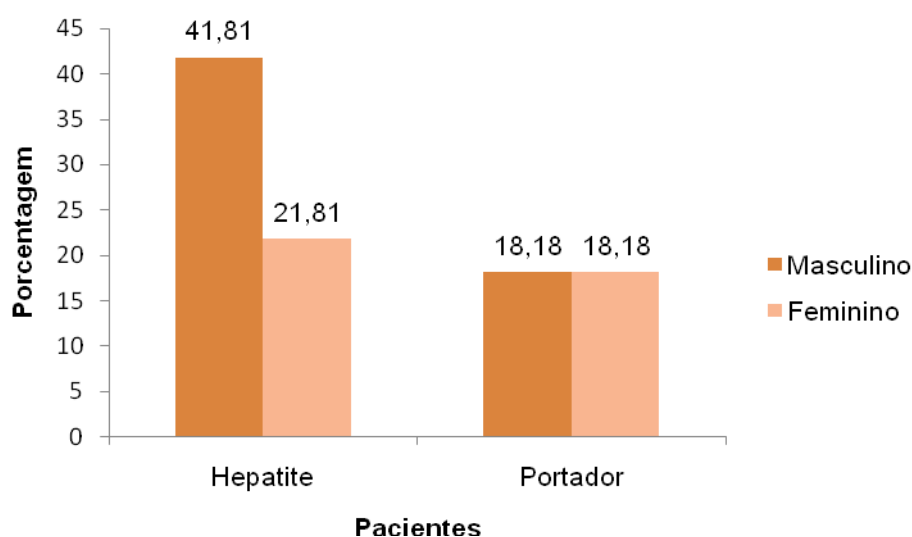


Figura 3: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao gênero dos pacientes (N=55) ($p < 0.05$).

- 1) Na coluna a porcentagem refere-se à freqüência relativa de pacientes com hepatite do gênero masculino em relação à população de pacientes com hepatite e portador.
- 2) Na linha a porcentagem refere-se à diferença estatística entre os pacientes com hepatite e portador.

A faixa etária mais freqüente no estudo foi 26|- a 39 anos, correspondendo 43,63% (N=24/55) da população com hepatite e portador, com idade média de 38,49 anos \pm 14,75.

Nos pacientes com hepatite a faixa etária mais freqüente foi 26|- a 39 anos correspondendo 25,45% (N=14/55), com idade média de 42,57 anos \pm 15,48. Contudo observou-se diferença estatística entre os pacientes com hepatite e a população nas faixas etárias acima de 26 |-39 anos (Tabela 2 e Figuras 4 e 5).

Tabela 2

Distribuição da população com hepatite e portador quanto à faixa etária dos pacientes (N=55).

<i>Idade (anos)</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>		
	N	% ⁽¹⁾	N	%	% ⁽²⁾	N	% ⁽³⁾
13 - 26	3	5,45	5	9,09	37,5	8	14,54
26 - 39	14	25,45	10	18,18	58,33	24	43,63
39 - 52	8	14,55	5	9,09	61,53	13	23,63
52 - 65	7	12,73	0	0,00	100	7	12,72
\geq 65	3	5,45	0	0,00	100	3	5,45

p < 0.05

- 2) A porcentagem na coluna refere-se à freqüência relativa de pacientes com hepatite na faixa etária em relação à população
- 2) A porcentagem na linha refere-se à diferença estatística entre os pacientes com hepatite e portador.
- 3) A porcentagem na linha refere-se ao total de pacientes por faixa etária

A dispersão das idades nos pacientes com hepatite revela uma linha ascendente, demonstrando maior número de pacientes com hepatite em idades mais avançadas (Figura 4).

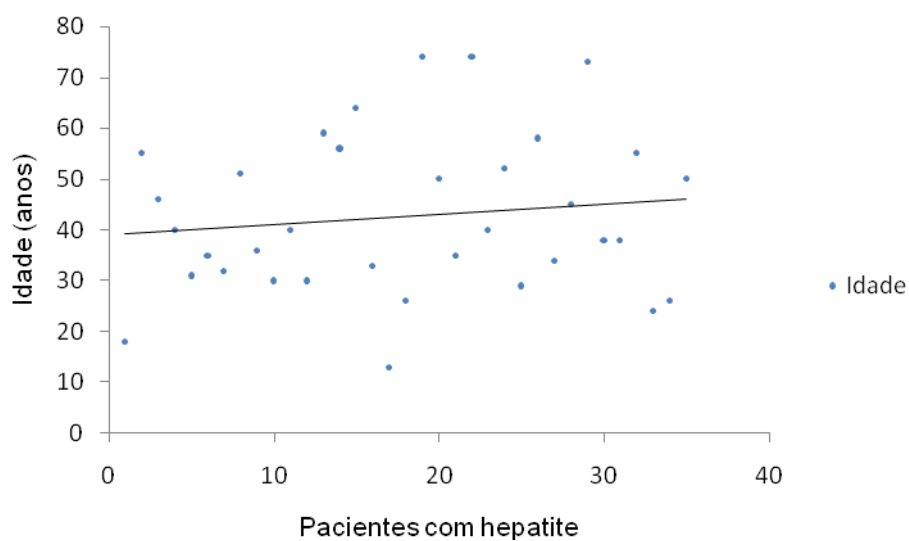


Figura 4: Diagrama de dispersão da idade em pacientes com hepatite (N=35/55)

A dispersão das idades nos pacientes portadores revela uma linha descendente, demonstrando maior número de pacientes portadores em idades mais jovens (Figura 5).

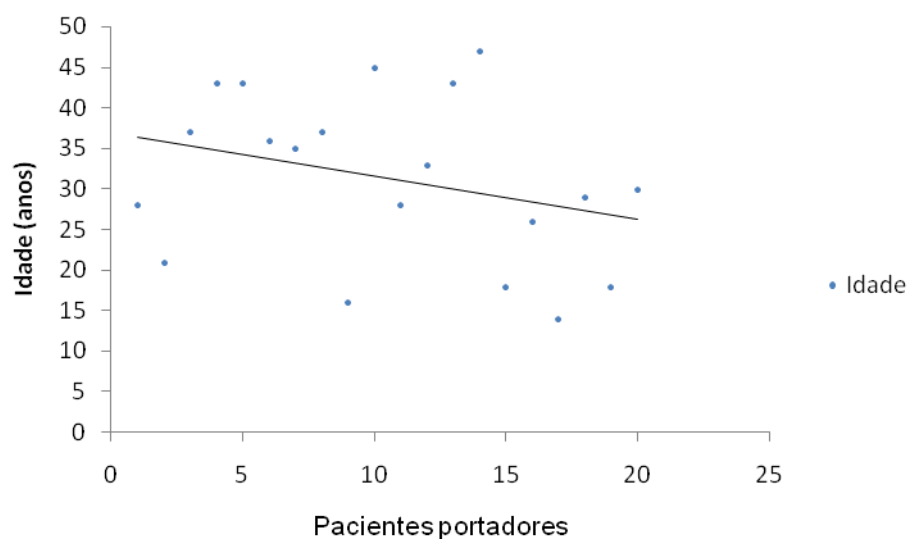


Figura 5: Diagrama de dispersão da idade em pacientes portadores (N=20/55)

5.1.2 Atividade ocupacional

A atividade mais freqüente na população estudada foi autônoma com 87,28% (N=48/55). Nos pacientes com hepatite a atividade ocupacional autônoma correspondeu a 52,72% (N=29/55) e as atividades ligadas ao emprego fixo foram 10,90% (N=6/55). Nos pacientes portadores a atividade autônoma correspondeu a 34,55% (N=19/55) e as atividades ligadas ao emprego fixo foram 1,81% (N=1/55) (Tabela 3).

Tabela 3

Distribuição da população com hepatite e portador quanto à profissão dos pacientes (N=55).

Profissão	Hepatite		Portador		Total	
	N	%	N	%	N	%
Autônomo ⁽¹⁾	29	52,72	19	34,55	48	87,28
Emprego fixo ⁽²⁾	6	10,90	1	1,81	7	12,72
Total	35	63,63	20	36,36	55	100

(1) Estudante, advogado, agricultor, comerciante, empresário, pintor, doméstica e sem emprego fixo.

(2) Funcionário público, profissão ligada à área da saúde, vigilante e trabalhadores do distrito industrial de Manaus.

$p > 0.05$

- 1) Na coluna a porcentagem refere-se à freqüência relativa de pacientes com hepatite quanto à profissão em relação à população de pacientes com hepatite e portador.
- 2) Na linha a porcentagem refere-se à diferença estatística entre os pacientes com hepatite e portador.

5.1.3 Naturalidade e procedência

A naturalidade mais freqüente da população neste estudo foi a Sub-região Central da Amazônia Ocidental Brasileira 54,55% (N=30/55). Nos pacientes com

hepatite a naturalidade mais freqüente foi a Sub-região Sudoeste 32,73% (N=18/55) e nos portadores foi a Sub-região Central 23,65% (N=13/55) (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4

Distribuição da população
quanto à naturalidade dos pacientes (N=55)

Sub-regiões	Hepatite		Portador		Total	
	N	%	N	%	N	%
Sudoeste ⁽¹⁾	18	32,73	7	12,72	25	45,45
Central ⁽²⁾	17	30,90	13	23,65	30	54,55
Total	35	63,63	20	36,36	55	100,00

(1) Sub-região sudoeste: Amazonas, Acre e Rondônia e suas principais cidades são: Porto Velho, Tarauacá, Boca do Acre, Lábrea, Humaitá, São Paulo de Olivença, Fonte Boa e Carauari.

(2) Sub-região Central: Manaus, Manacapuru, Parintins, Itacoatiara, Tefé e Coari.

p > 0.05

- 2) Na coluna a porcentagem refere-se à freqüência relativa de pacientes com hepatite quanto à naturalidade em relação à população
- 2) Na linha a porcentagem refere-se à diferença estatística entre os pacientes com hepatite e portador.

O local de procedência mais freqüente na população com hepatite e portador foi a Sub-região Central 89,09% (N=49/55). Nos pacientes com hepatite e portador o local de procedência mais freqüente foi a Sub-região Central, respectivamente 56,36% (N=31/55) e 32,72% (N=18/55) (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5
Distribuição da população
quanto à procedência dos pacientes (N=55)

Sub-regiões	Hepatite		Portador		Total	
	N	%	N	%	N	%
Sudoeste ⁽¹⁾	4	7,27	1	1,81	5	9,09
Norte ⁽²⁾	0	0,00	1	1,81	1	1,81
Central ⁽³⁾	31	56,36	18	32,72	49	89,09
Total	35	63,63	20	36,36	55	100

- (1) Sub-região sudoeste da Amazônia Ocidental: abrange os Estados do Amazonas, Acre e Rondônia e suas principais cidades são: Porto Velho, Tarauacá, Boca do Acre, Lábrea, Humaitá, São Paulo de Olivença, Fonte Boa e Carauari.
- (2) Sub-região Norte da Amazônia Ocidental: abrange trechos do Estado do Amazonas e a totalidade do Estado de Roraima.
- (3) Sub-região Central da Amazônia Ocidental: Manaus, Manacapuru, Parintins, Itacoatiara, Tefé e Coari.

$p > 0.05$

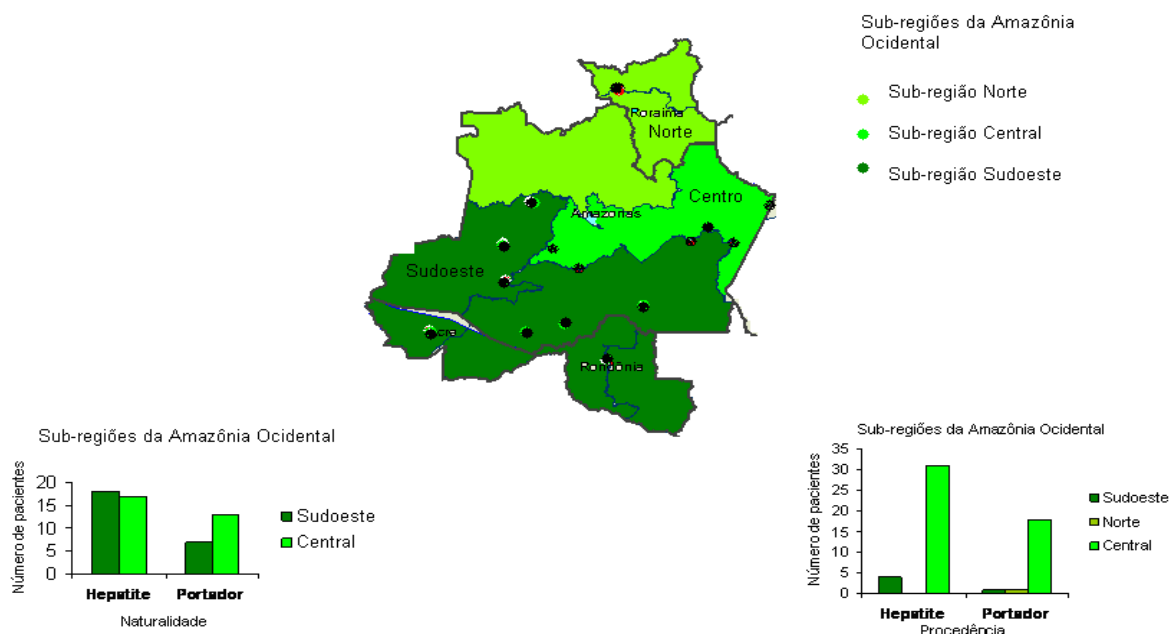


Figura 6: Mapa das Sub-regiões da Amazônia Ocidental Brasileira, demonstrando a distribuição das cidades de naturalidade e procedência da população com hepatite e portadores (N=55).

- Cidades: Porto Velho, Tarauacá, Boca do Acre, Lábrea, Humaitá, São Paulo de Olivença, Fonte Boa, Carauari, Boa Vista, Manaus, Manacapuru, Parintins, Itacoatiara, Tefé e Coari.

Fonte: IBGE (2000)

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

5.2.1 Tempo de evolução da doença

O tempo de evolução informado com maior frequência na população com hepatite e portador foi 1|- a 5 anos, 45,46% (N=25/55). Tanto os pacientes com hepatite como os portadores informaram que o tempo de evolução mais freqüente foi 1|- a 5 anos, respectivamente 30,91% (N=17/55) e 14,55% (N=8/55) (Tabela 6).

Tabela 6

Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao tempo de evolução da infecção pelo VHB nos pacientes (N=55)

Evolução (anos)	Hepatite		Portador		Total	
	N	%	N	%	N	%
< 1	3	5,45	7	12,72	10	18,17
1 - 5	17	30,91	8	14,55	25	45,46
> 5	15	27,28	5	9,09	20	36,37
Total	35	63,64	20	36,36	55	100,00

$p < 0.05$

A linha de tendência da variável tempo em relação à presença de hepatite demonstrou que nos casos com hepatite a linha foi ascendente enquanto que nos portadores a linha foi descendente, com intersecção no intervalo de 1|a 5 anos de evolução (Figura 7).

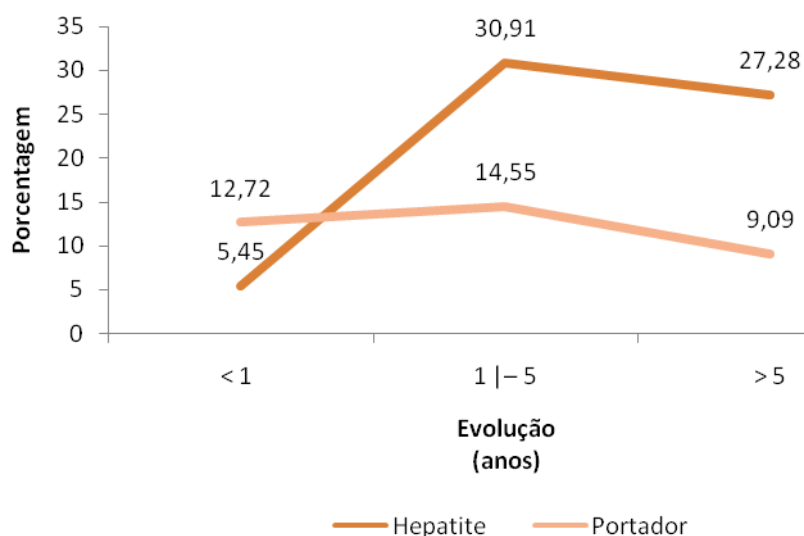


Figura 7: Distribuição da população com hepatite e portador quanto às curvas de tendência da evolução da infecção pelo VHB nos pacientes (N=55).

5.2.2 Motivo da consulta

Em relação ao motivo da consulta médica, observou-se que 78,18% (N=43/55) da população com hepatite e portador apresentavam apenas marcadores sorológicos de infecção pelo VHB e 21,82% (N=16/55) apresentavam no momento da consulta sinais de insuficiência hepática descompensada.

Os pacientes com hepatite que tinham menos de cinco anos de evolução 25,45% (N=14/55) apresentaram apenas marcadores sorológicos de infecção pelo VHB e 10,90% (N=6/55) tinham sinais de insuficiência hepática descompensada. Estes pacientes, no período maior ou igual a cinco anos, tinham apenas marcadores sorológicos de infecção pelo VHB 7,27% (N=4/55) e 20% (N=11/55) apresentaram sinais de insuficiência hepática descompensada.

Os pacientes portadores, no período menor que cinco anos 25,47% (N=14/55) tinham apenas marcadores sorológicos de infecção pelo VHB e 1,81% (N=1/55) apresentaram sinais de insuficiência hepática descompensada. Estes pacientes, no período maior ou igual a cinco anos, tinham apenas marcadores sorológicos de

infecção pelo VHB 7,28% (N=4/55) e apresentaram sinais de insuficiência hepática descompensada 1,81% (N=1/55) (Figura 8).

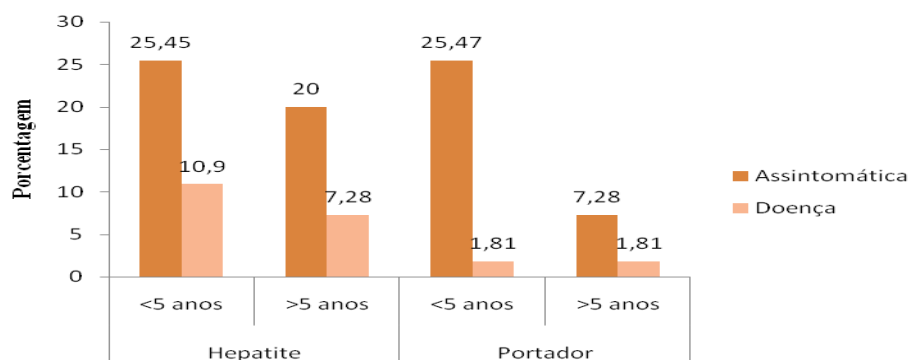


Figura 8: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao motivo da consulta e o tempo de evolução da infecção nos pacientes (N=55).

$p < 0.05$ (Pacientes com hepatite)

$p > 0.05$ (Pacientes portadores)

5.2.3 Manifestações clínicas e antecedentes clínico-epidemiológicos

Nos pacientes com hepatite os sintomas mais observados foram dispepsia e astenia, respectivamente 41,81% (N=23) e 38,18% (N=21). A perda da libido foi observada em 21,80% (N=12), a presença de hemorragia de origem mucosa e artralgia apresentaram freqüências idênticas 18,18% (N=10/55). A anorexia foi observada em 16,36% (N=9/55), encefalopatia e febre também apresentaram freqüências idênticas 9,09% (N=5/55). O sintoma menos freqüente foi *fetor hepaticus* observado em 3,63% (N=2/55) dos pacientes. Foram assintomáticos 16,36% (N=9/55) dos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo.

Nos pacientes portadores a forma assintomática de apresentação foi mais freqüente 25,45% (N=14/55), sendo que 16,36% (N=4/55) apresentaram astenia e 5,46% (N=3/55) anorexia (Figura 9).

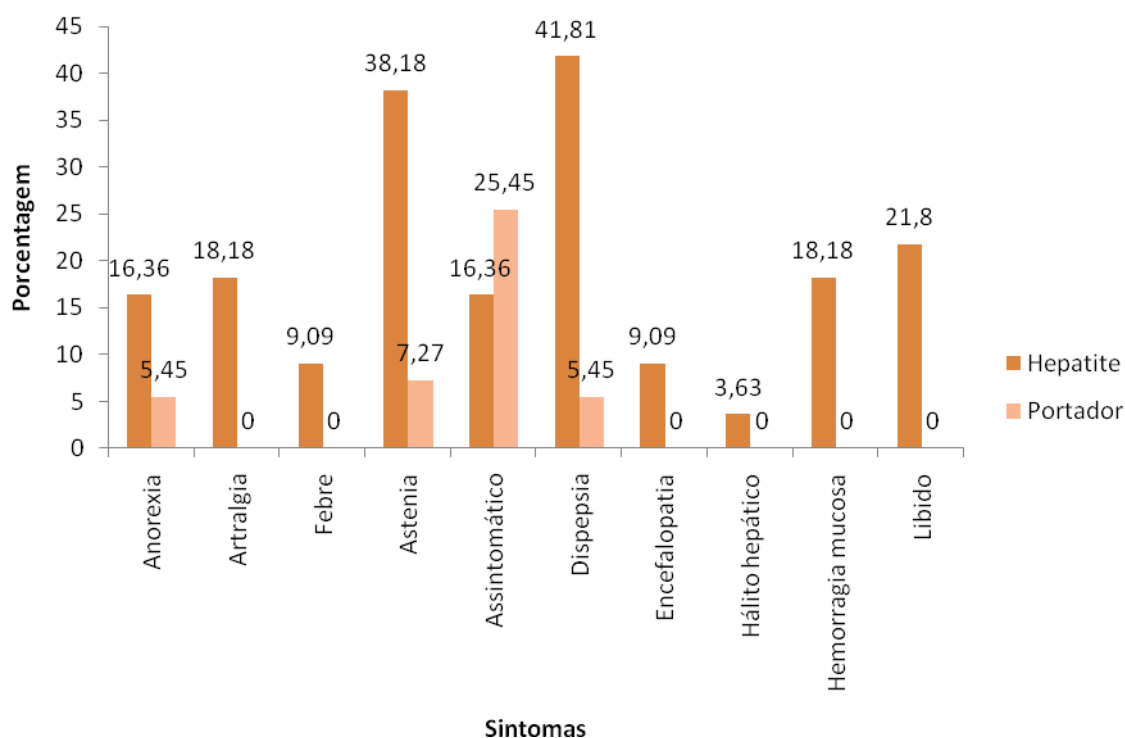


Figura 9: Distribuição da população com hepatite e portador quanto aos sintomas apresentados pelos pacientes (N=55).

$p > 0.05$

Os antecedentes clínico-epidemiológicos dos pacientes com hepatite mais freqüentes foram história passada de icterícia 45,45% (N=25) e história de hepatite na família 36,36% (N=20). Entre os pacientes portadores os antecedentes clínico-epidemiológicos mais freqüentes foram comunicante do VHB e hepatite na família, que apresentaram freqüências idênticas 18,18% (n=10) (Figura 10).

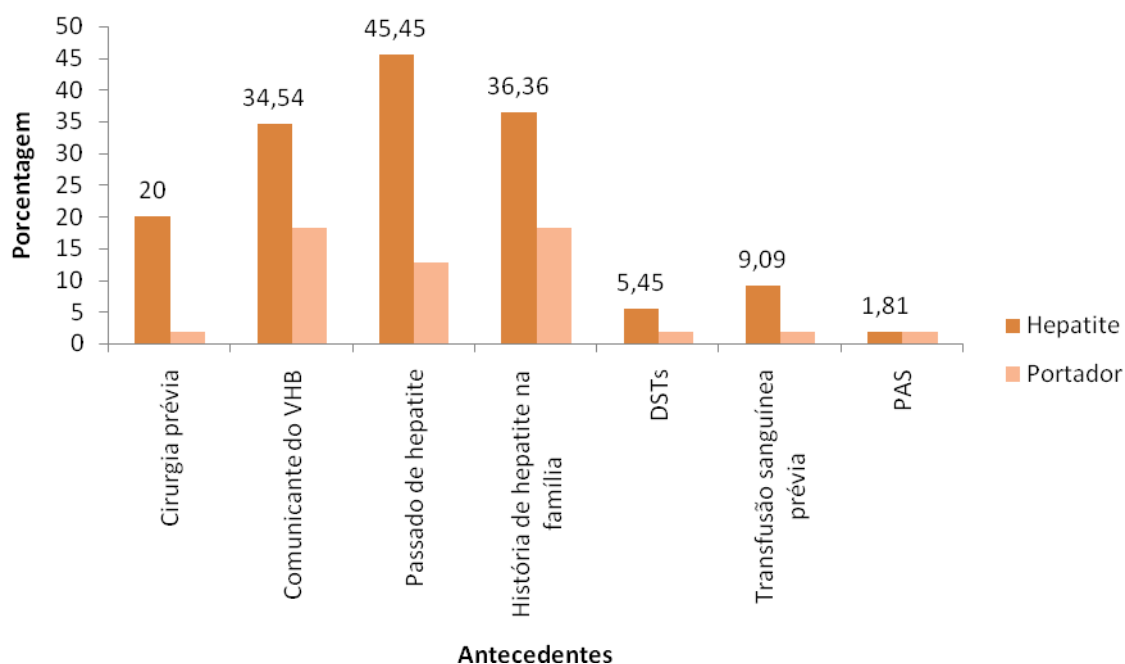


Figura 10: Distribuição da população com hepatite e portador quanto aos antecedentes clínico-epidemiológicos dos pacientes (N=55).

(1) Profissional da área da saúde

(2) $p > 0.05$

Os sinais físicos de maior ocorrência na população de pacientes com hepatite foram esplenomegalia e eritema palmar, respectivamente 40% (N=22/55) e 25,45% (N=14/55). Entre os pacientes portadores o exame físico normal foi mais freqüente observado em 20% (N=11/55) (Figura 11).

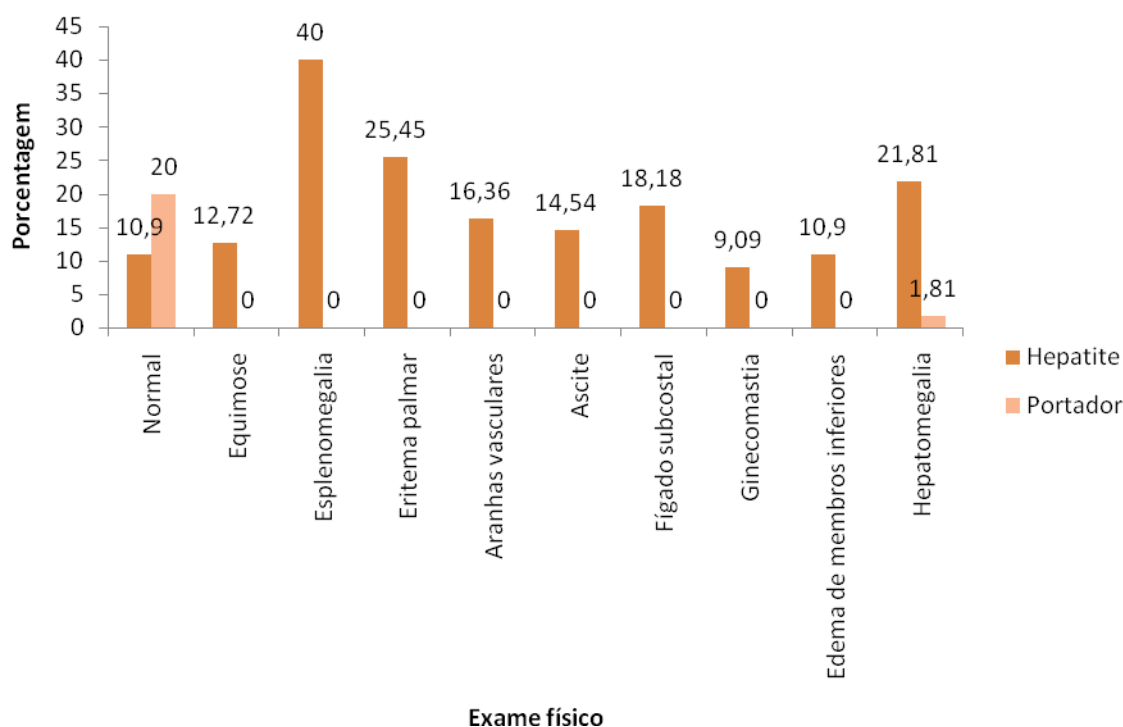


Figura 11: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao exame físico dos pacientes (N=55).

$p > 0.05$

5.3 CARACTERÍSTICAS BIOMOLECULARES

5.3.1 Determinação do VHB DNA

Foi realizada extração do DNA, através da técnica de PCR das 55 amostras de soro selecionadas para participar da pesquisa, baseado nos procedimentos metodológicos descritos por Karasawa et al. (1995).

5.3.2 Amplificação do gene S

Das 55 amostras de soro VHB DNA reagentes, conseguiu-se êxito na amplificação pela PCR do gene S em 40% (N=22/55) das amostras, sendo 25,45% (N=14/55) das amostras procedentes dos pacientes com hepatite e 14,54% (N=8/55)

procedentes dos pacientes portadores. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma banda de 600pb (ANEXO F).

5.3.3 Genotipagem do VHB

O seqüenciamento das amostras amplificadas pela PCR VHB DNA reagentes detectou três tipos de genótipos na população com hepatite e portador: genótipo A subgenótipo Afro-asiático A1 (AA) em 81,81% (N=18/22), genótipo D subgenótipo D1 em 4,54% (N=1/22) e o genótipo F subgenótipo F2 em 13,63% (N=3/22), designados como grupos genômicos baseado em 8% de divergência intergenômica e em menos de 4% de divergência intragenômica (ANEXO C).

Nos pacientes com hepatite o genótipo A (AA) apresentou 54,54% (N=12/22) de frequência e nos portadores 27,27% (N=6/22). O genótipo D (D1) e o genótipo F (F2) apresentaram frequências idênticas nos pacientes com hepatite 4,54% (N=1/22), contudo nos portadores 9,09% apresentaram o genótipo F (F2) e não houve ocorrências nestes pacientes do genótipo D (D1) (Figura 12).

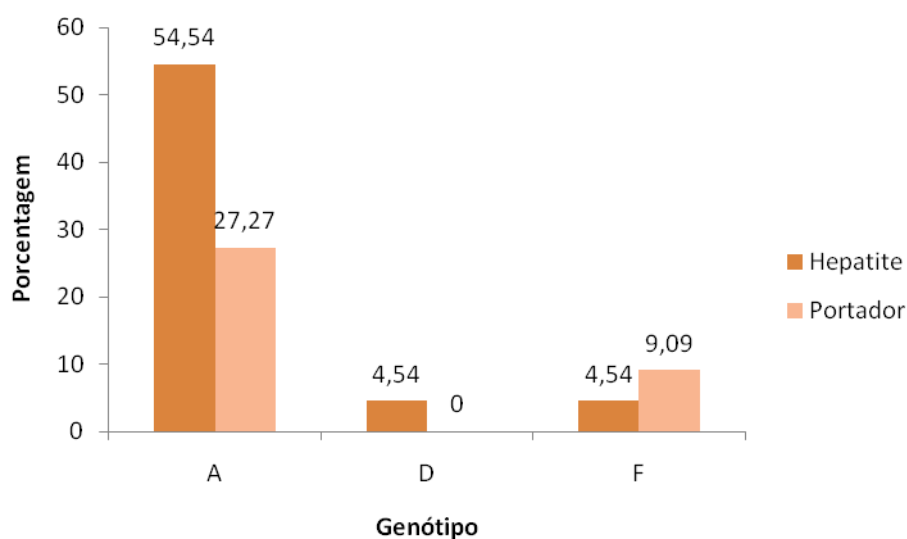


Figura 12: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo dos pacientes (N=22/55)

p > 0.05

5.3.4 Distribuição geográfica dos genótipos

Quanto à distribuição geográfica destes genótipos nas diversas Sub-regiões da Amazônia Ocidental Brasileira observou-se que nas Sub-regiões Sudoeste e Central o genótipo mais freqüente foi o genótipo A subgenótipo A1 (AA), com freqüências idênticas 40,90% (N=9/22), sendo o genótipo F subgenótipo F2 mais encontrado na Sub-região sudoeste 9,09% (N=2/22) (Tabela 7).

Tabela 7

Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo/subgenótipo e origem geográfica na Amazônia Ocidental Brasileira e (N=22/55).

Genótipo	Sub-regiões da Amazônia Ocidental							
	Sudoeste		Central		Norte		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
A	9	40,90	9	40,90	0	0,00	18	81,81
F	2	9,09	1	4,54	0	0,00	3	13,63
D	0	0,00	1	4,54	0	0,00	1	4,54
Total	11	49,99	11	49,98	0	0,00	22	100

p>0.05

5.3.5 Lesão hepatocelular e genótipos

Nos pacientes com hepatite observou-se cirrose hepática em 9,09% (N=2/22) dos pacientes que apresentaram genótipos A subgenótipo A1 (AA) e genótipo F subgenótipo F2. A presença do hepatocarcinoma foi detectada em 9,09% (N=2/22) dos pacientes com genótipo A subgenótipo A1 (AA) e genótipo F subgenótipo F2, sendo a cirrose hepática detectada em 100% destes pacientes. Índices mínimos de lesão hepática foram observados em 13,63% (N=3/22) dos pacientes com genótipos A subgenótipo A1 (AA) e genótipo D subgenótipo D1.

Nos pacientes portadores a presença de pacientes infectados com genótipos A subgenótipo A1 (AA) e F subgenótipo F2 apresentaram respectivamente 27% (N=6/22) e 9,09% (N=2/22) (Figura 13).

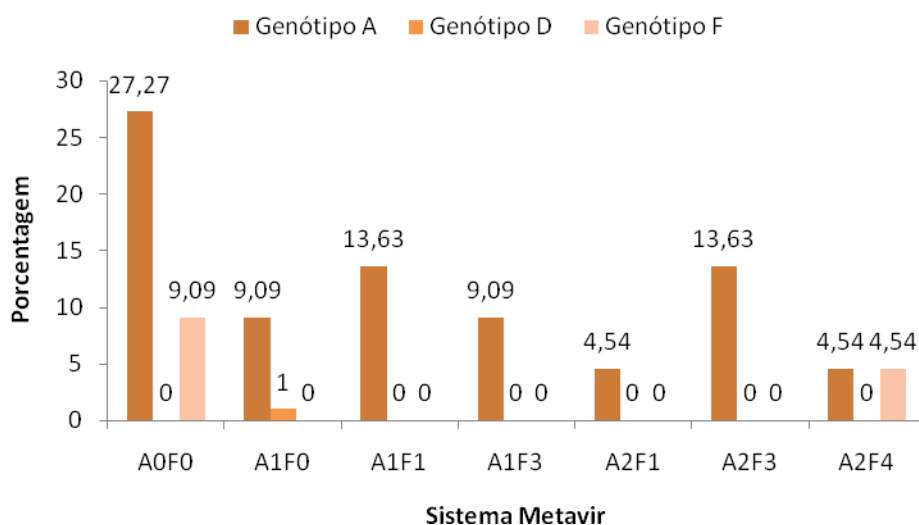


Figura 13: Distribuição da população com hepatite e portador quanto aos genótipos e o grau de lesão hepática dos pacientes (N=22/55)

5.3.6 Amplificação e seqüenciamento da região Pré-core/Core Promoter

A extração do DNA viral das 22 amostras amplificadas pela PCR foi processada utilizando-se os mesmos iniciadores senso e anti-senso, utilizados na segunda reação de *nested* PCR do gene C, sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram uma banda de 300pb (ANEXO F).

Nas 22 amostras amplificadas após o seqüenciamento das regiões pré-core e core promoter, observaram-se mutações em 36,36% (N=8/22) da população com hepatite e portador sendo que em 63,63% (N=14/22) não foram verificadas variações nestas regiões.

Entre as mutações encontradas observou-se entre os pacientes com hepatite mutações da região pré-core em 4,54% (N=1/22) na posição G₁₈₉₆A e em 27,27% (N=6/22) na posição G₁₇₆₄A e A₁₇₆₂T da região core promoter.

Entre os pacientes portadores observaram-se mutações em 4,54% na posição G₁₇₆₄A e A₁₇₆₂T da região core promoter (N=1/22) (ANEXO D) (Figura 14).

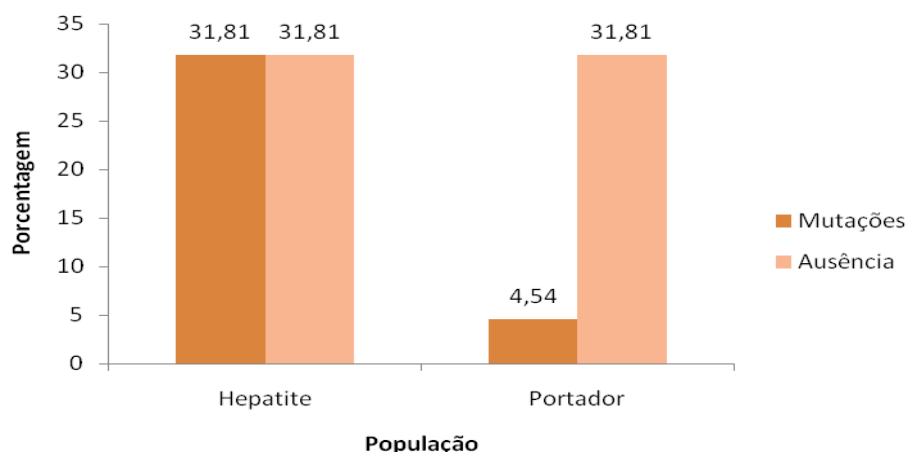


Figura 14: Distribuição população quanto à presença de mutações Pré-core e Core Promoter (N=22/55)

$p > 0.05$

5.3.7 Mutações pré-core/core promoter e genótipos

Em relação a presença de mutações pré-core observou-se que nos genótipos A e F não foram detectadas mutações, contudo no genótipo D foram detectadas 4,54% (N=1/22) de mutações pré-core. Não foram observadas mutações nos genótipos D e F, contudo no genótipo A verificou-se 31,81% (N=7/22) de mutações core promoter (Figuras 15 e 16).

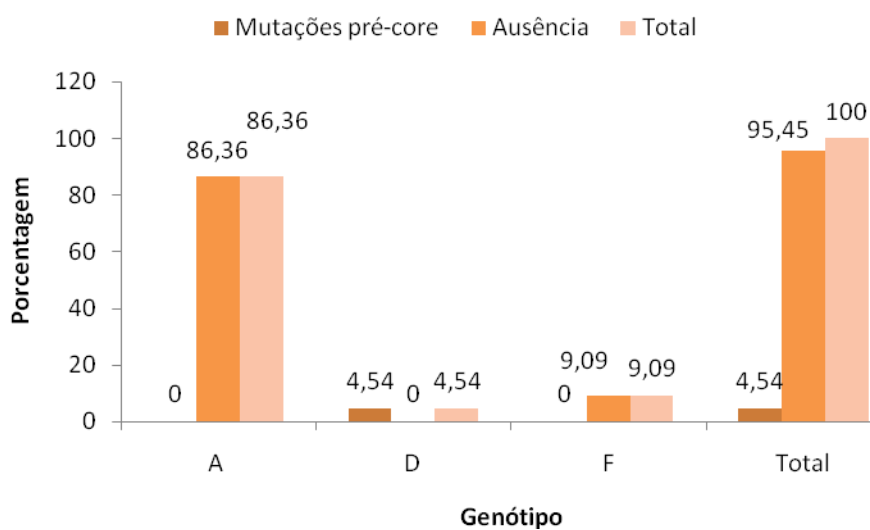


Figura 15: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo e a presença da mutação pré-core nos pacientes (N=22/55)

$p > 0.05$

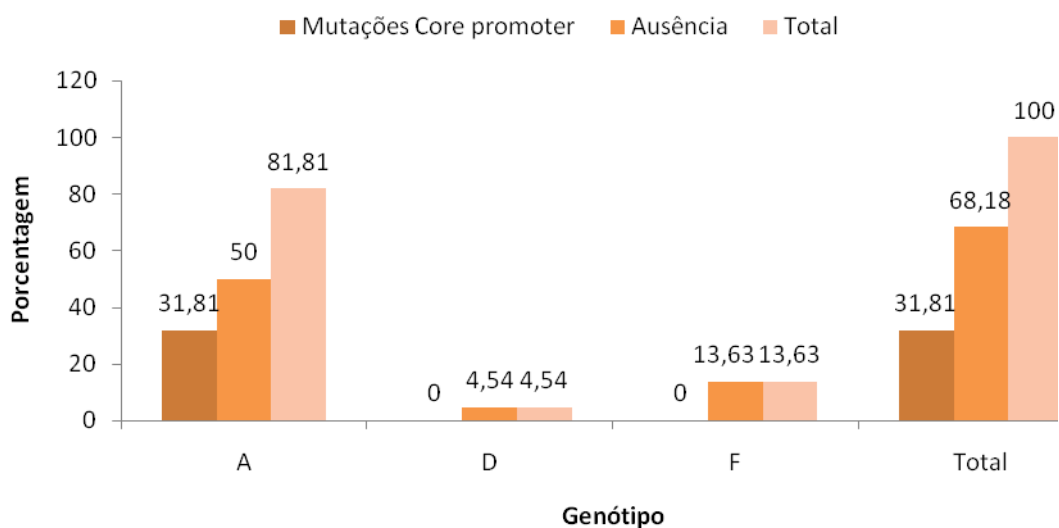


Figura 16: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao genótipo e a presença da mutação core promoter nos pacientes (N=22/55)

$p > 0.05$

5.3.8 Mutações Pré-core/Core Promoter e lesão hepatocelular

Em relação a distribuição da população com hepatite, quanto à presença de mutações na região pré-core foi observada mutações em 4,54% (N=1/22) e nos pacientes portadores não foram encontradas mutações (Figura 17)

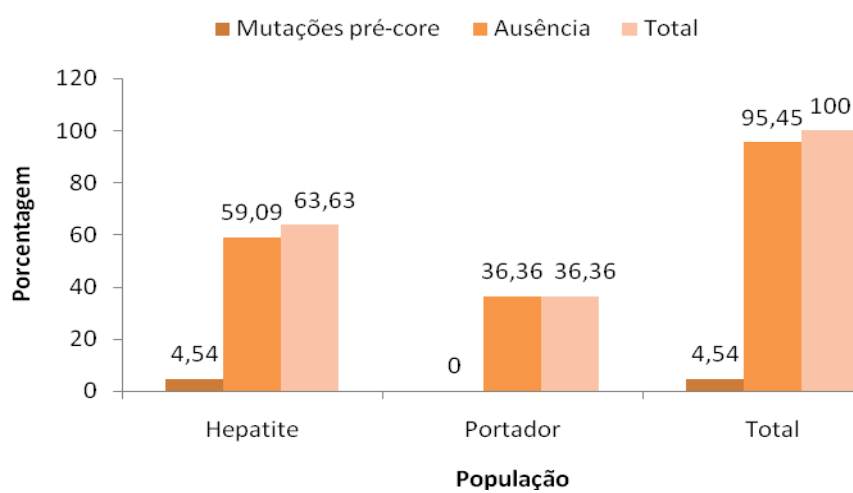


Figura 17: Distribuição da população com hepatite e portador quanto à presença de mutações na região pré-core (N=1/22).

$p > 0.05$

Em relação a distribuição da população com hepatite quanto à presença de mutações na região *core promoter* observaram-se mutações em 27,27% (N=6/22) e nos pacientes portadores foram encontradas mutações em 4,54% (N=1/22) (Figura 18).

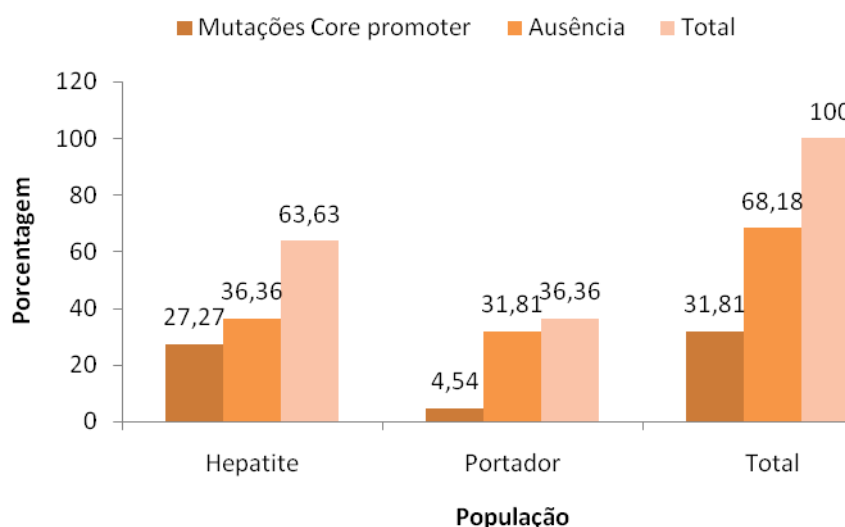


Figura 18: Distribuição da população com hepatite e portador quanto à presença de mutações na região *core promoter* nos pacientes (N=7/22).

5.4 CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

A análise dos exames da população de pacientes com hepatite revelou os seguintes valores médios: contagem plaquetária 119.000/ μ L com desvio padrão de 63.714 e mediana 111.000/ μ L, bilirrubina total 1,58 mg/dL com desvio padrão de 2,026 e mediana 0,88 mg/dL, atividade da protrombina 67,79% com desvio padrão de 23,24 e mediana 60,00%, albumina sérica 3,280 mg/dL com desvio padrão de 0,830 e mediana 3,0 mg/dL, aminotransferases do aspartato e da alanina foram respectivamente 91,30 UI/L e 90,30 UI/L com mediana de 52 mg/dL e 62 mg/dL, respectivamente e desvio padrão de 120,20, alfa-fetoproteína 14,03 UI/mL com desvio padrão de 26,34 e mediana 5,0 UI/L.

Na população de pacientes portadores a análise dos exames revelou os seguintes valores médios: contagem plaquetária 214.950/ μ L com desvio padrão de 58.355 e mediana 211.500/ μ L, bilirrubina total 1,152 mg/dL com desvio padrão 0,939 e mediana 0,90 mg/dL, atividade da protrombina 89,90% com desvio padrão de 13,09 e mediana 95,90%, albumina sérica 3,855 mg/dL com desvio padrão de 0,454 e mediana 3,95 mg/dL, aminotransferases do aspartato e da alanina foram respectivamente 42,20 UI/L e 57,0 UI/L, com 42,22 e 59,8 de desvio padrão e

mediana 25,50 mg/dL e 36,5 mg/dL, alfa-fetoproteína 4,925 UI/mL com desvio padrão de 0,3354 e mediana de 5,0 UI/mL (Tabela 8)

Tabela 8

Distribuição das médias, desvios padrão e medianas dos exames hematológicos e bioquímicos dos pacientes com hepatite e portador (N=55).

Exames	Medidas	Hepatite	Portador
Contagem plaquetária (µL)	Normal		140.000 a 360.000
	Média	119,029	214,950
	Desvio padrão	63,714	58,355
	Mediana	111,000	211,500
Bilirrubina total (mgdL)	Normal		0,3 a 1,0
	Média	1,583	1,152
	Desvio padrão	2,026	0,939
	Mediana	0,90	0,88
Atividade da protrombina (%)	Normal		85 a 100
	Média	67,79	89,90
	Desvio padrão	23,24	13,09
	Mediana	60	95,90
Albumina (g/dL)	Normal		3,6 a 5,0
	Média	3,280	3,855
	Desvio padrão	0,830	0,454
	Mediana	3,0	3,95
AST (UI/L) ⁽¹⁾	Normal		15 a 37
	Média	91,30	42,20
	Desvio padrão	120,20	42,22
	Mediana	52	25,50
ALT (UI/L) ⁽²⁾	Normal		20 a 65
	Média	90,30	57,0
	Desvio padrão	120,20	59,8
	Mediana	62	36,5
Alfa-fetoproteína (UI/mL)	Normal		-10
	Média	14,03	4,925
	Desvio padrão	26,34	0,3354
	Mediana	5,0	5,0

⁽¹⁾ Aminotransferase do aspartato

⁽²⁾ Aminotransferase da alanina

A contagem plaquetária mediana nos pacientes com hepatite foi 118.000/ µL e nos pacientes portadores foi 211.500/ µL, com expressiva diminuição quantitativa das plaquetas nos pacientes com hepatite. Os pacientes com hepatite apresentaram contagem plaquetária menor que 150.000/µL em 75% dos casos e o contrário ocorreu com os pacientes portadores do VHB (N=55) (Figuras 19).

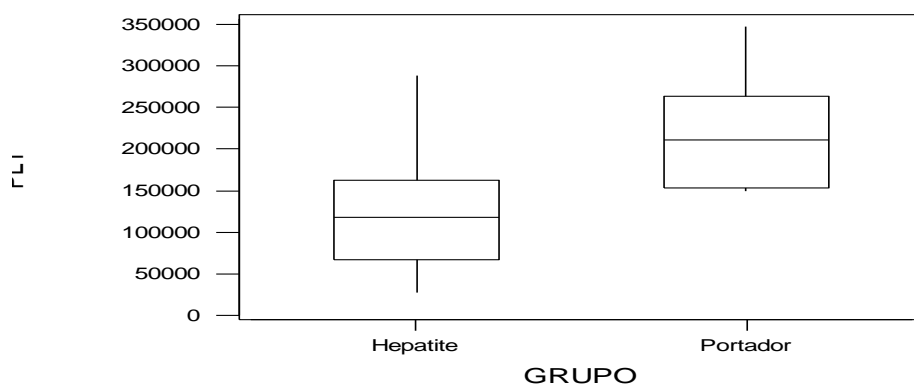


Figura 19: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da contagem plaquetária dos pacientes (N=55)

$p < 0.05$

O valor da mediana da bilirrubina total foi 0,90 mg/dL nos paciente com hepatite e 0,88 mg/dL nos pacientes portadores, revelando porcentagens semelhantes acima e abaixo das medianas nas duas populações (N=55) (Figura 20).

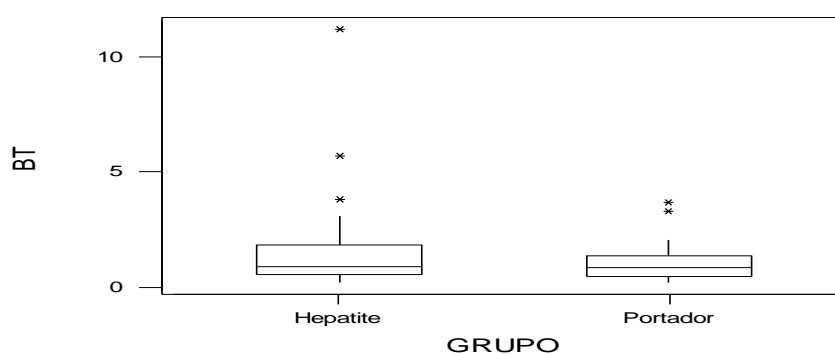


Figura 20: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de bilirrubina total dos pacientes(N=55).

$p > 0.05$

A mediana da atividade da protrombina na população com hepatite foi 60% e 95.90% nos portadores, sendo que os pacientes com hepatite apresentaram 75% das porcentagens abaixo dos valores da atividade da protrombina (85%) e nos portadores 75% das porcentagens foram acima destes valores (N=55) (Figura 21).

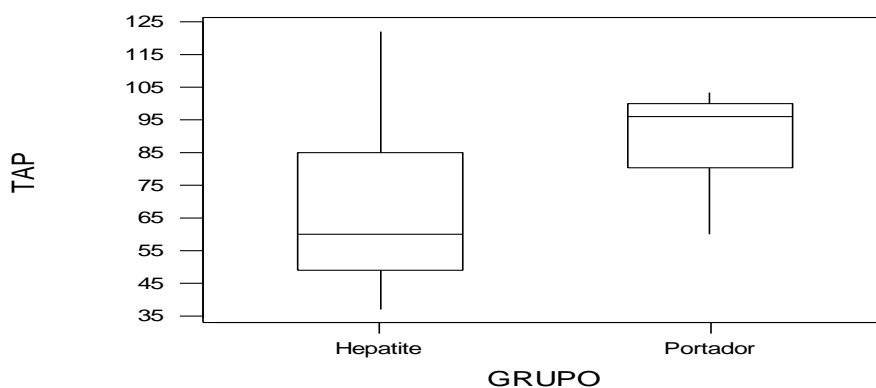


Figura 21: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da atividade da protrombina dos pacientes (N=55)

$p < 0.05$

A mediana da albumina nos pacientes com hepatite foi 3,00 mg/dL e nos pacientes portadores foi 3,95 mg/dL, sendo que os pacientes com hepatite apresentaram 75% das porcentagens abaixo dos valores da albumina (4,00 mg/dL) e nos portadores 75% das porcentagens foram abaixo de 3,95 mg/dL (N=55) (Figura 22) .

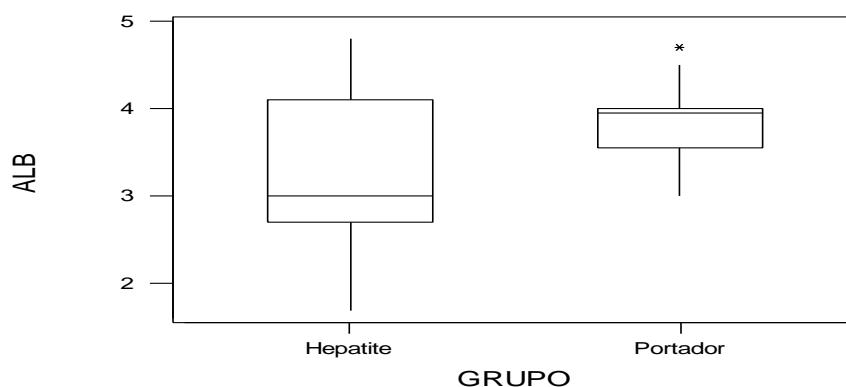


Figura 22: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível da albumina dos pacientes (N=55)

$p < 0.05$

A mediana da AST nos pacientes com hepatite foi 52 UI/L e nos pacientes portadores foi 25,50 UI/L sendo que os pacientes com hepatite apresentaram 75% das porcentagens da AST foram acima de 25 UI/L e nos portadores 75% das porcentagens foram abaixo 52UI/L (N=55) (Figura 23).

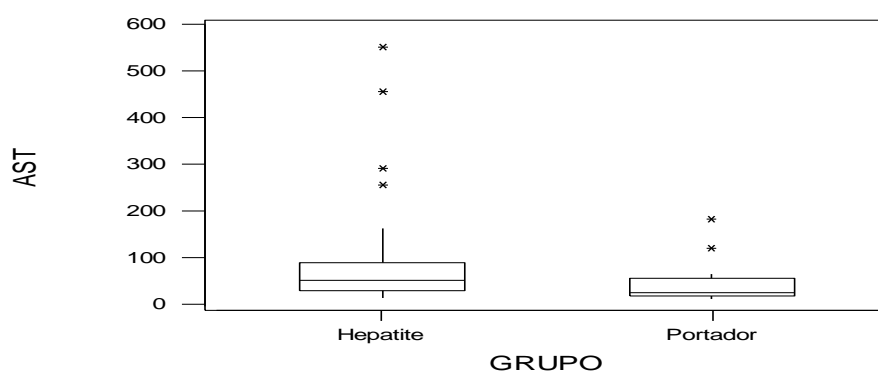


Figura 23: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de aminotransferase do aspartato dos pacientes (N=55)

$p > 0.05$

A mediana da ALT no grupo com hepatite 62 UI/L e no grupo de portadores foi 36,50 UI/L sendo que os pacientes com hepatite apresentaram 75% das

porcentagens da ALT foram acima de 36,50 UI/L e nos portadores 75% das porcentagens foram abaixo de 36,50UI/L (N=55) (Figura 24).

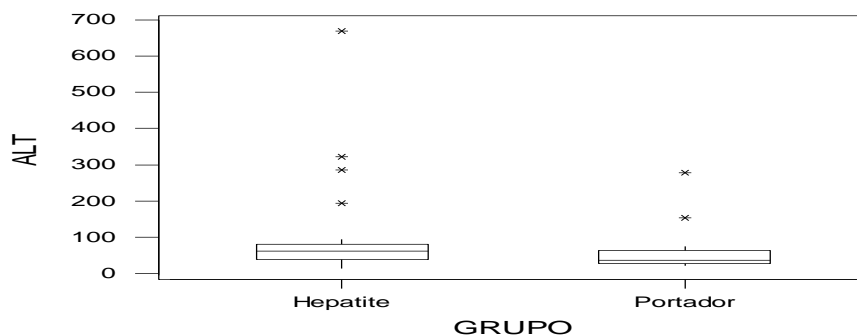


Figura 24: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de aminotransferase da alanina dos pacientes (N=55)

$p > 0.05$

Foram observados *flares* espontâneos da ALT na população com hepatite e portador em 10,90% (N=6/55). Nos pacientes com hepatite observou-se *flares* em 7,27% (N=4/55) e nos pacientes portadores os *flares* foram observados em 3,63% (N=2/55). Quanto à gravidade dos *flares* nos pacientes com hepatite 1,81% (N=1/55) foram leves, 3,63% (N=2/55) foram moderados e 1,81% (n=1/55) severos. Nos pacientes portadores *flares* leves e moderados apresentaram frequências idênticas 1,81% e não foram observados *flares* severos nestes pacientes (N=1/55) (Tabela 9).

Tabela 9

Distribuição dos resultados das análises bioquímicas de *flares* de ALT das amostras coletadas da população do estudo com hepatite e portador (N=55).

<i>Flare</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
<i>Flare</i> ¹	4	7,27	2	3,63	6	10,90
Ausência	31	56,36	18	32,72	49	89,09
Total	35	63,63	20	36,36	55	100,00

p > 0.05

(1) Foi considerado *flare* os valores de ALT ≥ 130 UI/L

A mediana dos valores de alfa-fetoproteína nos pacientes com hepatite e portador foi idêntica 5,0 UI/mL (N=55) (Figura 25)

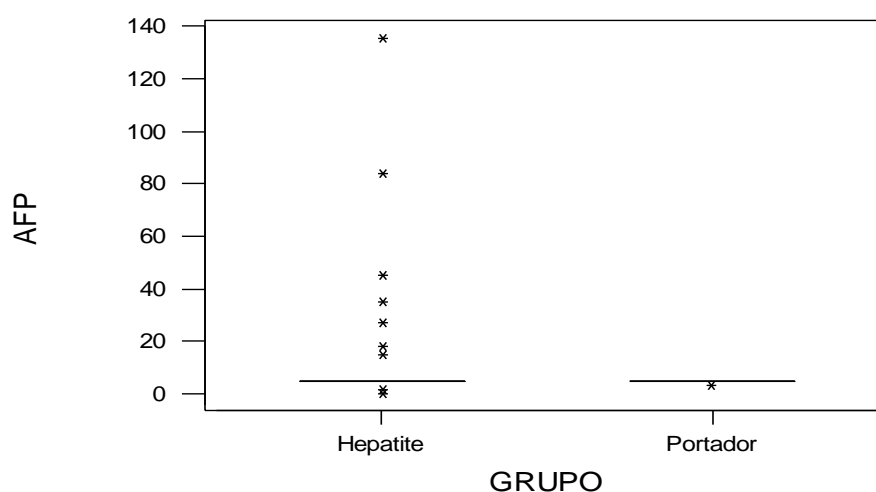


Figura 25: *Box plots* utilizado para comparar a população com hepatite e portador quanto ao nível de alfa-fetoproteína dos pacientes (N=55)

p>0.05

5.5 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Durante o estudo foram realizadas 55 biópsias que após análise histopatológica permitiu classificar os pacientes em dois grupos: pacientes com hepatite e pacientes portadores. Os portadores, conforme o sistema Metavir foi denominado de A0F0, correspondendo a 36,34% (N=20/55) dos casos.

Os pacientes com hepatite foram classificados de acordo com o Sistema de Metavir e assim distribuídos: A1F0 7,27% (N=4/55), A1F1 12,76% (N=7/55), A1F2 1,81% (N=1/55), A1F3 5,45% (N=3/55), A2F1 3,63 (N= 2/55), A2F2 3,63% (N=2/55), A2F3 20% (N=11/55) e A2F4 9,09% (N=5/55). Nos pacientes que apresentaram A2F4 foram observados 3,63% (N=2/55) de casos de hepatocarcinoma (Figuras 26)

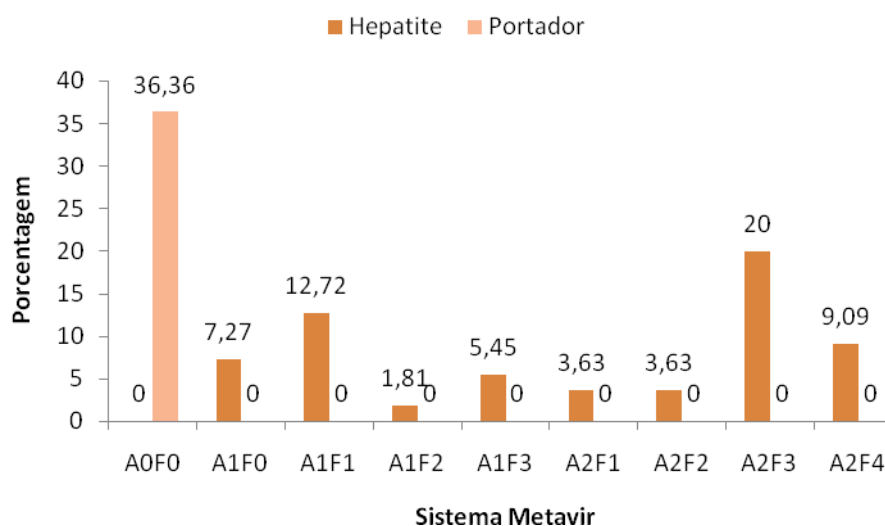


Figura 26: Distribuição da população com hepatite e portador quanto ao resultado do exame histopatológico da biópsia hepática conforme o Sistema de Metavir (N=55).

6.6 CARACTERÍSTICAS ULTRASSONOGRÁFICAS

O exame de ultrassom do abdome superior na população com hepatite e portador avaliou sinais de insuficiência hepática crônica, patologias associadas e sinais ultrassonográficos de hipertensão portal.

Nos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo observou-se os seguintes de sinais de insuficiência hepática crônica: atenuação do feixe sonoro ou hiperecogenicidade do parênquima hepático em 9,09% (N=5/55), fígado heterogêneo em 34,50% (N=19/55), fígado contraído, micronódulos, superfície nodular ou dificuldade de visualização das estruturas vasculares intra-hepáticas em 20% (N=11/55). Nestes pacientes não foram observados exames ultrassonográficos normais.

Nos pacientes portadores foi detectado atenuação do feixe sonoro ou hiperecogenicidade do parênquima hepático em 9,10% (N=5/55), fígado heterogêneo em 1,81% (N=1/55) e o exame de ultrassom foi normal em 25,45% (N=14/55) dos pacientes (Tabela 10).

Tabela 10

Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas sugestivas de fibrose (N=55)

<i>Alterações ultrassonográficas</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
1a ⁽¹⁾	5	9,09	5	9,10	10	18,20
1b ⁽²⁾	19	34,54	1	1,81	20	36,40
1c ⁽³⁾	11	20	0	0,0	11	20,00
Ausência	0	0,0	14	25,45	14	25,40
Total	35	63,63	20	36,36	55	100,00

⁽¹⁾ Atenuação do feixe sonoro

⁽²⁾ Textura heterogênea, apagamento vascular intra-hepático.

⁽³⁾ Fígado contraído, superfície nodular e ascite

p < 0.05

Nos pacientes com hepatite os sinais ultrassonográficos de patologias associadas foram: lesões focais em 5,45% (N=3/55) e colecistopatia litiásica em 18,18% (N=10/55). O exame não revelou associações em 40% (N=22/55) dos pacientes com hepatite. Nos portadores não foram detectadas lesões associadas à insuficiência hepática crônica (N=20/55) (Tabela 11).

Tabela 11

Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas sugestivas de patologia associada (N=55)

<i>Lesões associadas</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
2a ⁽⁴⁾	3	5,45	0	0,00	3	5,45
2b ⁽⁵⁾	10	18,18	0	0,00	10	18,18
Ausência	22	40	20	36,36	42	76,37
Total	35	63,63	20	36,36	55	100,00

p < 0.05

⁽⁴⁾ Lesão focal

⁽⁵⁾ Colecistite, colelitíase

Nos pacientes com hepatite observou-se presença de sinais maiores de hipertensão portal em 38,18% (N=21/55) e não foram observados estes sinais em 25,45% (N=14/55). Nos pacientes portadores os sinais maiores de hipertensão portal não foram observados em 36,36% (N=20/55) dos casos. Nos pacientes com hepatite a presença de sinais menores de hipertensão portal foi verificada em 40% (N=22/55) e não foram observados estes sinais em 23,63% (N=13/55). Nos pacientes portadores os sinais menores de hipertensão portal não foram detectados (N=20/55) (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12

Distribuição população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas sugestivas de sinais maiores de hipertensão portal (N=55)

<i>Sinais de HP</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
Sinais Maiores ⁽⁶⁾	21	38,18	0	0,00	21	38,18
Ausência	14	25,45	20	36,36	34	61,82
Total	35	63,63	20	36,36	55	100,00

p < 0.05

⁽⁷⁾ Circulação colateral, veia porta com calibre maior que 1,2 cm, veia esplênica maior que 0,9 cm e veia mesentérica maior que 0,9 cm.

Tabela 13

Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações ultrassonográficas sugestivas de sinais menores de hipertensão portal (N=55)

<i>Sinais de HP</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
Sinais Menores ⁽⁷⁾	22	40,00	0	0,00	22	40,00
Ausência	13	23,63	20	36,36	33	60,00
Total	35	63,63	20	36,66	55	100,00

p < 0.05

⁽⁷⁾ Ausência da variação respiratória dos vasos portais, esplenomegalia (baço maior que 12 cm), amputação dos vasos portais intra-hepáticos.

5.7 CARACTERÍSTICAS ENDOSCÓPICAS

O exame de endoscopia do trato gastrointestinal superior avaliou na população com hepatite e portador os sinais endoscópicos de hipertensão portal e sinais endoscópicos preditivos de sangramento varicoso. Nos pacientes com hepatite a presença de cordões varicosos no esôfago ou no fundo gástrico foi detectado em 36,36% (N=20/55) e a ausência destes sinais foram observadas em 27,27% (N=15/55). Nos pacientes portadores não foram detectadas alterações endoscópicas (N=20/55). Nos pacientes com hepatite a presença de manchas hematócísticas foi detectada em 12,73% (N=7/55) e não foram detectadas em 50,91% (N=28/55). Nos pacientes portadores não foram observadas manchas hematócísticas (N=20/55) (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14
Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações endoscópicas do trato gastrointestinal sugestivas de hipertensão portal (N=55).

Exame Endoscópico	Hepatite		Portador		Total	
	N	%	N	%	N	%
Varizes ⁽¹⁾	20	36,36	0	0,00	20	36,36
Ausência	15	27,27	20	36,36	35	63,64
Total	35	63,64	20	36,36	55	100,00

p < 0.05

⁽¹⁾ Cordões venosos dilatados no esôfago ou fundo gástrico.

Tabela 15

Distribuição da população com hepatite e portador quanto às alterações endoscópicas do trato gastrointestinal preditivas de sangramento varicoso por hipertensão portal (N=55).

<i>Exame Endoscópico</i>	<i>Hepatite</i>		<i>Portador</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
MHC ⁽²⁾	7	12,73	0	0,00	7	12,72
Ausência	28	50,91	20	36,36	48	87,28
Total	35	63,64	20	36,66	55	100,00

p < 0.05

⁽²⁾ Manchas vermelhas na superfície das varizes esôfago-gástricas.

DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Neste estudo foram acompanhados 55 pacientes durante um ano após a soroconversão do AgHBe, com biópsia hepática demonstrando hepatite em 63,64% e portadores inativos em 36,36% dos pacientes, sendo a cirrose hepática observada em 9,09% (N=5/55) e associação ao hepatocarcinoma (HCH) constatada em 3,63% destes pacientes.

Bonino et al. (1986) e Lai et al. (1994) observaram que durante o curso da infecção crônica pelo VHB a soroconversão do AgHBe geralmente coincide com a normalização dos testes bioquímicos com remissão clínica e histológica do fígado, estes resultados sugerem que a soroconversão do AgHBe em geral confere boa evolução, entretanto a hepatite crônica ativa AgHBe negativo pode se desenvolver à cirrose e ao hepatocarcinoma.

Hsu et al., (2002) acompanhando pacientes após a soroconversão do AgHBe observaram que 66,8% apresentaram remissão clínica e histológica e em 24% dos pacientes, apesar do anti-HBe positivo, o VHB DNA permaneceu reagente no soro. Durante o acompanhamento a cirrose foi observada em 7,8% e o hepatocarcinoma em 2,2% dos pacientes.

Rizzeto et al. (2000) estudando a prevalência de casos de hepatite crônica B AgHBe negativo observaram significativo aumento da prevalência desta hepatite na Itália (90%).

Hadziyannis et al. (2001) relataram que 15% a 30% dos indivíduos AgHBs positivos e AgHBe negativo apresentam hepatite crônica, outros estudos como os realizados por Funk et al. (2002) relatam o aumento da prevalência mundial da doença AgHBe negativa.

Zarski et al. (2006) encontraram uma prevalência de 72% de casos de hepatite crônica B AgHBe negativa na França, observando uma ocorrência maior em pacientes naturais da África, Oriente Médio, do Leste Europeu e de regiões do Sul da Europa quando comparado aos pacientes naturais da França ou de origem Asiática.

Hsu et al. (2002) demonstrou que depois da soroconversão do AgHBe ocorreu uma incidência acumulada de 25% de casos de hepatite crônica B AgHBe negativo no período de acompanhamento destes pacientes.

Os resultados obtidos nestes estudos mostram a ascensão da prevalência da doença hepática AgHBe negativa, confirmando as elevadas taxas de prevalência obtidas no atual estudo (63,64%).

6.1.1 Gênero e faixa etária

O gênero predominante na população de pacientes com hepatite e portador foi o gênero masculino 60%. Nos pacientes com hepatite a prevalência do gênero masculino foi 41,81%, com uma proporção de 1,9:1 em relação às mulheres.

Sharma et al. (2005) observaram que o gênero masculino é predominante na hepatite crônica B AgHBe negativo, apresentando inclusive doença mais ativa e mais grave, com atividade necroinflamatória acentuada observada em mais de 50% dos pacientes.

Fattovich et al. (1984) avaliando o clareamento espontâneo do AgHBe observaram variação anual de 16% de clareamento do AgHBe no gênero masculino e de 30% de clareamento do AgHBe no gênero feminino em países onde a

transmissão do VHB usualmente é horizontal durante a infância sendo a transmissão perinatal pouco freqüente. Nestas populações a maioria das crianças são AgHBe positivo apresentando alterações de ALT e soroconversão próxima ou logo após ao início da puberdade. Este padrão de clareamento do AgHBe também é freqüente em países desenvolvidos onde a transmissão ocorre na idade adulta, preferencialmente pela via sexual. Em regiões com padrão de transmissão vertical, no período perinatal, a freqüência de clareamento do AgHbe apresenta índices bem menores.

Os dados observados sobre a menor prevalência do gênero feminino neste estudo sugerem que nas mulheres a transmissão horizontal durante a infância ou na idade adulta poderia justificar a melhor evolução clínica em relação aos homens, que teriam predominância da transmissão vertical, apresentando assim maiores índices de lesão hepatocelular.

A idade média e a faixa etária mais prevalente na população com hepatite e portador foram respectivamente 38,4 anos e 26|- a 39 anos (43,63%). A idade média dos pacientes com hepatite foi maior (42,5 anos) que a dos pacientes portadores (31,3 anos). A maior ocorrência de casos com hepatite ocorreu na faixa etária de 26|- a 39 anos (25,45%) sendo significativa a relação entre faixa etária e a presença de hepatite.

Em relação à presença de hepatite ou portador dentro da mesma faixa etária constatou-se que a maior probabilidade de o indivíduo ter hepatite concentra-se nas faixas mais elevadas (≥ 65 anos), enquanto que nas faixas etárias mais jovens 13|- a 26 anos a probabilidade de o indivíduo ser portador é maior (62,50%).

Kiffer et al. (2003) estudando os índices de infecção pelo VHB observou que nas faixas etárias mais jovens é a principal característica das áreas de alta endemicidade. Estas observações são referenciadas por outros estudos com populações de regiões de alta endemicidade do VHB como no Sudeste da Ásia, África, Ilhas do Pacífico, Ártico, Regiões do Oriente Médio, Ásia Menor, Caribe onde a infecção no período perinatal por transmissão vertical e durante a primeira infância por transmissão horizontal, através de contato com outros membros da família, portadores do AgHBs, são as principais vias de transmissão e responsáveis pelos elevados índices de infecção nas faixas etárias mais jovens. A maior parte destas populações apresentam uma prevalência de portadores do AgHBs entre 10% e 15%

com aproximadamente 50% a 95% da população apresentando evidência sorológica de infecção passada pelo VHB.

Fattovich et al. (1992) observaram que os pacientes com hepatite crônica AgHBe negativo são em geral mais velhos, em média 40 anos, sendo a faixa etária mais afetada a de 36 a 45 anos, significativamente mais elevada que os pacientes com hepatite crônica AgHBe positivo.

No presente estudo o acometimento das faixas etárias mais jovens sugerem que estes pacientes têm infecção no período perinatal e que a hepatite crônica B AgHBe negativo representa uma fase tardia da história natural da infecção, mais do que uma “nova infecção” com variantes do VHB que não produzem o AgHBe, observando-se que o risco relativo de agravo da doença nos pacientes com hepatite de acordo com o aumento da idade é 0,6 vezes maior com idade ≥ 40 anos do que nos indivíduos com menos de 40 anos (IC 95% 0,4595; 1,0029), confirmando os estudos do grupo de Fattovich et al. (1992).

6.1.2 Atividade ocupacional

No presente estudo não houve associação entre profissão e a probabilidade de ter hepatite, embora um dos pacientes do grupo de portadores apresentasse atividade profissional ligada à área da saúde.

A transmissão do VHB em áreas de alta endemicidade, através de acidente ocupacional, não é a forma de transmissão mais freqüente (SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

Há muito tempo tem sido documentado que a transmissão do VHB pode ocorrer principalmente entre profissionais da área da saúde infectados com pacientes portadores do VHB, principalmente quando tem o HBeAg circulante, contudo foi observado que a transmissão do VHB também pode ocorrer na ausência do HBeAg, de acordo com estudos realizado por Heptonstall (1997) envolvendo casos de acidente ocupacional com pacientes com hepatite B AgHBe negativo.

6.1.3 Naturalidade e procedência

Em relação à naturalidade dos pacientes com hepatite a Sub-região Sudoeste foi mais prevalente com 32,73%, contudo quanto à procedência a Sub-região Central foi a que apresentou maior prevalência de casos 56,36%.

Da Silva (2003) observa que a prevalência no Brasil da infecção pelo VHB é variável, visto ser um país de grande extensão geográfica e diversidade cultural, étnica e socioeconômica. A maioria das regiões brasileiras apresenta endemicidade intermediária, variando de 1% a 2% de freqüência do AgHBs.

Kiffer et al. (2003) estudando a prevalência do AgHBs na Amazônia Ocidental Brasileira considerou esta região como uma área de alta endemicidade, onde a prevalência do AgHBs pode assumir valores que variam de 5% a 20%, com cerca de 50% a 95% da população apresentando evidências sorológicas de infecção passada.

Da Silva (2003) observou que entre as capitais brasileiras as de maior prevalência do anti-HBc total foram as cidades de Manaus (AM) e Rio Branco (AC).

Fonseca (2002), estudando os fatores ambientais e sócio-culturais relacionados ao comportamento humano e com a presença de reservatórios animais ou infestação por insetos, sugeriu que estes fatores poderiam influenciar a circulação de vírus hepatotrópicos na Amazônia Ocidental Brasileira, onde em áreas de alta prevalência e incidência de malária, também de alta densidade de mosquitos, observa-se nas calhas destes rios, caracteristicamente malarígenos, alta prevalência da infecção pelo VHB, fato este não observado entre residentes em calhas de rios não malarígenos.

Estes estudos confirmam a alta prevalência da doença AgHBe negativa encontrada neste estudo, conferindo à Amazônia Ocidental Brasileira importante papel epidemiológico na história natural do VHB.

6.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

6.2.1 Tempo de evolução da doença

Nos pacientes com hepatite o período de evolução da doença mais freqüente foi 1|- 5 anos (30,91%). Conforme estudos realizados por Lee (1997), vários fatores estão implicados no desenvolvimento e na evolução da infecção crônica pelo VHB, entre estes estão à época de aquisição da infecção, aspectos relativos à raça, gênero do hospedeiro e genótipo do VHB.

A análise do tempo de evolução da doença hepática AgHBe negativa revela que o tempo foi uma variável diretamente proporcional em relação a evolução clínica da doença, ou seja, quanto maior o tempo de evolução maiores serão as probabilidades de associação com casos de hepatite na doença hepática AgHBe negativa e quanto menor o tempo de exposição menores serão as probabilidades desta associação, com linhas de tendência demonstrando um cruzamento ao nível do período menor que um ano, sendo a linha de tendência dos pacientes com hepatite ascendente, sugerindo que com a evolução da doença o número de casos de pacientes aumenta, estabilizando-se no estudo ao longo do período maior que cinco anos.

Hsu et al. (2002) demonstraram aumento da incidência de casos de hepatite crônica B AgHBe negativo depois da soroconversão do AgHBe, estes estudos confirmam os achados do presente estudo de que o número de casos de pacientes portadores tende gradativamente a diminuir, enquanto aumenta o número de pacientes com hepatite crônica AgHBe negativo.

6.2.2 Motivo da consulta

O motivo da consulta dos pacientes neste estudo revelou que 78,18% da população com hepatite e portador apresentaram marcadores sorológicos da

infecção e 21,82% apresentaram sinais de doença hepática descompensada no momento da consulta.

Hadziyannis & Vassilopoulos (2001) estudando a história natural da infecção crônica pelo VHB AgHBe negativo observou que durante o curso da hepatite crônica B AgHBe positivo ou após a soroconversão do AgHBe é pouco provável que a infecção primária com mutante pré-core possa evoluir para a cronicidade, sendo este tipo de hepatite considerada uma fase tardia de uma doença de evolução crônica.

Neste estudo foi significativa a relação tempo *versus* motivo da consulta nos pacientes com hepatite, revelando que existe uma relação entre estas duas variáveis independentes. Confirmando os dados encontrados por Hadziyannis & Vassilopoulos (2001) de que a hepatite crônica B AgHBe negativo é uma manifestação tardia de uma doença de evolução crônica.

6.2.3 Manifestações clínicas e antecedentes clínico-epidemiológicos

Durante o período de acompanhamento da população com hepatite observou-se que os sintomas mais prevalentes foram dispepsia, astenia e perda da libido, respectivamente 41,81%, 38,18% e 21,80%. Nos pacientes portadores 25,45% foram assintomáticos.

Os dados obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados na literatura, conforme revisão de consenso realizada pelo grupo de Hadziyannis & Vassilopoulos (2001) que demonstraram que a apresentação mais comum dos pacientes portadores crônicos do AgHBs com AgHBe negativo é a forma assintomática, sendo a sua condição descoberta durante uma doação de sangue ou avaliação da elevação da ALT em exames de rotina sendo que uma pequena porcentagem de pacientes apresentaram sinais de insuficiência hepática crônica descompensada.

O estudo dos antecedentes clínico-epidemiológicos mais freqüentes nos pacientes com hepatite revelou que 45,72% (N=25/55) tinham história pregressa de hepatite, 36,36% (N=20/55) tinham histórico familiar de hepatite ou óbito na família

por hepatite e 34,54% (N=19/55) apresentavam história de contato com o VHB. Nos pacientes portadores o contato com o VHB e a história familiar de casos de hepatite apresentaram freqüências idênticas 18,18% (N=10/55), sendo a história progressiva de hepatite observada em 12,72% (N=7/55) dos pacientes.

Os dados encontrados neste estudo foram semelhantes aos encontrados por Hadziyannis (1995) que relatam que são poucos os pacientes que lembram seu episódio agudo de hepatite, sendo provável que a aquisição intra-familiar do vírus nos primeiros anos de vida seja a forma mais comum de transmissão da doença AgHBe negativa.

Na Grécia, Zacharakis et al. (2005) observou que 40% dos irmãos testados para o AgHBs apresentavam anti-HBe positivo. O mesmo estudo mostrou que usuários de drogas, homossexuais e politransfundidos raramente tinham hepatite crônica B AgHBe negativo.

Durante o acompanhamento da população do estudo no ambulatório de hepatites virais da FMTAM observou-se que nos pacientes com hepatite a alteração mais freqüente ao exame físico foi a esplenomegalia 40% seguido por eritema palmar 25,45% e hepatomegalia 21,81%. O exame físico foi normal em 10,90% dos pacientes com hepatite. Nos pacientes portadores a hepatomegalia foi encontrada em 1,81% e o exame físico foi normal em 20% dos pacientes.

Payne et al. (1996) estudando a dinâmica clínica da infecção crônica pelo VHB verificou que estes pacientes são assintomáticos ou com alguns sintomas dispépticos e astenia, mesmo naqueles indivíduos com hepatite.

Estudos realizados por Adinolfi et al. (2001) durante a avaliação de pacientes trombocitopêncos com hepatite crônica, revelaram significativa correlação inversa entre o tamanho do baço e a contagem plaquetária.

Estas constatações confirmam os achados deste estudo sobre a natureza inespecífica da maioria das observações clínicas encontradas. Contudo sinais de complicações hepáticas resultantes da atividade necroinflamatória crônica, foram importantes, como esplenomegalia encontrada em 40% dos pacientes com hepatite, sugerindo cirrose hepática e hipertensão portal.

6.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

6.3.1 Determinação do VHB DNA e amplificação do gene S

Foi realizada extração do DNA pela PCR das 55 amostras de soro selecionadas para participar da pesquisa, conseguiu-se êxito, na amplificação pela PCR do gene S em 40%, sendo 25,45% destas amostras procedentes de pacientes com hepatite e 14,54% procedentes de pacientes portadores.

Chu et al. (1985), avaliando a carga viral de pacientes AgHBe negativos observou que estes pacientes apresentavam níveis séricos de VHB DNA significativamente menores do que as amostras AgHBe positivas, sendo provável que a falta de amplificação do gene S observada em algumas amostras neste estudo possam estar relacionadas com a baixa carga viral apresentada por estes pacientes.

6.3.2 Genotipagem do VHB

Neste estudo foram encontrados três tipos de genótipos do VHB, genótipos A, D e F em 22 amostras que apresentaram êxito na amplificação do gene S de pacientes com *status* sorológico AgHBe negativo, naturais da Amazônia Ocidental Brasileira.

O genótipo A subgenótipo A1 (AA) foi o mais freqüente com 81,81%, seguido do genótipo F subgenótipo F2 com 13,63% e do genótipo D subgenótipo D1 com 4,54%. Não foram identificados outros tipos de genótipos neste estudo.

6.3.3 Distribuição geográfica dos genótipos

Em relação à distribuição geográfica dos genótipos do VHB foi verificada neste estudo uma ocorrência variada de genótipos de acordo com a situação geográfica dos pacientes.

Nas Sub-regiões sudoeste e Central da Amazônia Ocidental foi predominante o genótipo A, apresentando freqüências idênticas 40,90%. O segundo genótipo em freqüência nestas Sub-regiões foi o genótipo F, detectado em 4,54% dos pacientes da Sub-região sudoeste e em 9,09% dos pacientes da Sub-região Central. O genótipo D subgenótipo D1 foi o terceiro genótipo em freqüência sendo detectado na Sub-região Sudoeste em 4,54% dos casos.

A distribuição geográfica dos genótipos no mundo apresenta segundo Norder et al. (2004) as seguintes prevalências: o genótipo D é o mais freqüente dos genótipos do VHB com 23%, seguido pelo genótipo C 21%, genótipo A 18%, genótipo B 16%, genótipo F 8,9%, genótipo E 7,2% e com freqüências menores o genótipo H e o G respectivamente 2,4% e 1,05%. As associações de genótipos foram observadas por Norder et al. (2004) em 0,7% dos casos.

Kramvis et al. (2002) estudando a prevalência dos genótipos observaram que em muitos países somente um número limitado de genótipos são encontrados, contudo em outros como nos EUA onde a população é mista, com pessoas de várias origens étnicas, todos os genótipos podem ser encontrados. O genótipo A é originário da Europa, Índia, África e América do Norte e formam dois grandes grupos geográficos um Europeu e Norte Americano (A2 ou AE) e um outro Afro-Asiático (A1 ou AA).

Norder et al. (2004) observa que o genótipo D é o mais difundido dos genótipos e predomina em áreas do Mediterrâneo e na Índia, existindo relatos da sua ocorrência em aborígenes da Ásia, Indonésia e Papua. O genótipo D admite atualmente quatro subgenótipos D1, D2, D3 e D4. O subgenótipo D1 tem sido detectado principalmente no Oriente Médio, o D2 apresenta maior ocorrência na Índia, o D3 é detectado na África do Sul e no Alaska, enquanto o D4 foi detectado na Oceania e Somália.

Conforme também estudado pelo grupo de Norder et al. (2004), o genótipo F subdivide-se em dois subgenótipos F1 e F2, o subgenótipo F1 é mais encontrado na América Central e o F2 ocorre principalmente na América do Sul, apesar do genótipo F ser considerado dominante entre aborígenes das Américas a sua presença na Espanha e na França, aparentemente, independe de importações Europeias.

Schaefer (2004) observou que o genótipo F subgenótipo F2, identificado primeiramente no Brasil por Naumann et al. (1993) é encontrado principalmente na América do Sul, contudo o subgenótipo F1 é mais prevalente na América Central, e mais recentemente foi detectado no Peru.

Tonetto et al. (2005) estudando a prevalência dos genótipos do VHB em várias Regiões brasileiras observaram que o genótipo A apresentou as maiores freqüências (50% a 89%), seguido pelo genótipo D (24% a 38%). Os genótipos C e F apresentaram freqüências menores (3% a 4%), contudo Bertolini et al. (2000) demonstraram que o genótipo F apresentou maior freqüência entre tribos isoladas da Amazônia que não mantinham contato com brancos.

Estes dados sugerem uma mudança no perfil genotípico da região, possivelmente influenciada pela dinâmica migratória que vem ocorrendo na Amazônia Ocidental desde o final do século XIX e início do século XX, caracterizada neste estudo pela elevada prevalência do genótipo A (81,81%), em relação ao genótipo F (13,63%), confirmando os estudos realizados por Schaefer et al. (2004) quanto ao fato da distribuição geográfica dos genótipos refletirem os dados antropológicos e epidemiológicos relativos aos eventos migratórios inerentes à raça humana.

6.3.4 Lesão hepatocelular e genótipos

Nos pacientes com hepatite o genótipo mais prevalente foi o genótipo A subgenótipo A1 (AA) 54,54%, enquanto que os demais genótipos encontrados no estudo F2 e D1 apresentaram freqüências menores (4,54%).

Nos pacientes portadores o genótipo mais prevalente foi o subgenótipo A1 (AA) 27,27%, seguido pelo subgenótipo F (F2) 9,09%. Não foram registrados casos de pacientes infectados com o genótipo D1.

Rodrigues-Frias et al. (2006), relataram que o genótipo D apesar de apresentar maior prevalência na Espanha em relação ao genótipo A, respectivamente 48% e 39,5%, observaram que esta relação não se mantinha quando avaliaram a evolução dos pacientes infectados, os quais sugeriram no estudo uma associação significativa entre a evolução da infecção e o genótipo A.

Sakai et al. (2001) avaliando a evolução de diversos pacientes infectados com diferentes genótipos concluiu que os genótipos do VHB apresentam diferentes potenciais de induzir cronicidade e hepatite aguda.

Shina et al. (1991) descreveram um doença mais severa induzida pelo genótipo C quando comparada ao genótipo B. Kao et al. (2000) confirmou muitos dos resultados de Shina et al. (1991), demonstrando maior gravidade no curso da infecção pelo VHB genótipo C, associada com altos escores de atividade necroinflamatória e fibrose hepática, com inclusive maiores índices de cirrose e hepatocarcinoma.

Orito et al. (2003) observou que esta diferença parece ser dependente mais de um subgenótipo determinado do que propriamente do genótipo, pois estudos realizados no Japão onde o genótipo B é prevalente não confirmaram a maior gravidade do genótipo C sobre o genótipo B.

O presente estudo confirma os achados de Tonetto et al. (2005) sobre a maior prevalência do genótipo A no Brasil, chamando a atenção para o predomínio do subgenótipo Afro-Asiático (A1 ou AA) confirmando os estudos de Orito et al. (2003) sobre a importância dos subgenótipos na caracterização da patogenicidade.

6.3.5 Amplificação e seqüenciamento da região pré-core/core promoter

Neste estudo após o seqüenciamento do gene C, observamos mutações em 36,36% das amostras VHB DNA reagentes dos pacientes com hepatite e portador,

com predomínio das mutações na região do *core promoter* sobre as mutações na região pré-*core*, respectivamente 31,81% e 4,54%.

Nos pacientes com hepatite foram observadas mutações na região *core promoter* A₁₇₆₄ isoladamente em 4,54%, T₁₇₆₂ isoladamente em 9,09% e uma mutação dupla básica A₁₇₆₄ com T₁₇₆₂ em 18,18%.

Nos pacientes portadores foi observada uma mutação isolada na região pré-*core* do VHB A₁₈₉₆ em 4,54%.

A hepatite crônica B AgHBe negativa geralmente resulta de formas mutantes do VHB incapazes de produzir o AgHBe e representam atualmente a forma predominante de hepatite crônica B em várias partes do mundo (HADZIYANNIS et al., 2001; CARMAN et al., 1989; FUNK et al., 2002).

A variante pré-*core* resulta da substituição de G₁₈₉₆ por A₁₈₉₆ do gene C levando a perda da translação de AgHBe, porém mantendo a produção do AgHBc, esta mutação é conhecida como A₁₈₉₆. O mecanismo mais provável dessa mutação é a seleção através da resposta imune. Outro tipo de mutação que afeta a produção do AgHBe, pode ser encontrada na região *core promoter* A₁₇₆₂-T₁₇₆₂ e G₁₇₆₄-A₁₇₆₄ importante na manutenção da estrutura secundária do sinal de encapsidação, estas mutações são conhecidas como mutações T₁₇₆₂ e A₁₇₆₄ (SCAGLIONE et al., 1997).

A freqüência de mutações no VHB tem sido estimada em aproximadamente 1,4 a 3,2 x 10⁵ substituições/nucleotídeo/sítio/ano, sendo esta taxa dez vezes maior que a encontrada em outros vírus de DNA. A taxa de mutação é influenciada principalmente pela fase clínica da doença, como a imunotolerância, imunoeliminação, imunossupressão após o transplante hepático e pelo tratamento com drogas antivirais. As mutações pré-*core* e *core promoter* estão entre as principais mutações do VHB (FUNK et al., 2001)

Conforme estudos do grupo de Gonçales Jr (2006) em Campinas (SP), cerca de 70% dos pacientes AgHBs positivos são AgHBe negativos, com elevado potencial de apresentarem mutações nas regiões do *core* e *core promoter*.

Chu et al. (2003) avaliando a prevalência de mutações pré-*core* e *core promoter* nos EUA observaram que as mutações *core promoter* foram mais freqüentes nos EUA. No presente estudo a prevalência de mutações nas regiões pré-*core* e *core promoter* foram relativamente baixas 4,54% e 31,81%, quando

comparada com os estudos realizados por Chu et al (2003), esta diferença provavelmente ocorreu pela maior prevalência do genótipo A/A1 (AA) no presente estudo (81,81%).

6.3.6 Mutações pré-core/core promoter e genótipos

Em relação à presença de mutações na região pré-core e o genótipo predominante, observou-se que nos pacientes infectados com os genótipos A e F não foram encontradas mutações na região pré-core, contudo nos pacientes infectados com o genótipo D encontrou-se mutações na região pré-core em 4,54%.

Em relação à presença de mutações na região core promoter e o genótipo predominante, foi observado que nos pacientes infectados com os genótipos D e F não foram encontradas mutações na região core promoter, contudo nos pacientes infectados com o genótipo A observou-se 31,81% de mutações core promoter.

A correlação negativa entre o genótipo A e mutação pré-core A₁₈₉₆ é relacionada ao pareamento de bases na estrutura do stem-loop na seqüência pré-genômica de encapsidação, mas a base para correlação positiva entre o genótipo A e a mutação da região core promoter não está estabelecida (CHU et al. 2003).

6.3.7 Mutações pré-core e core promoter e lesão hepatocelular

Quanto à presença de mutações na região pré-core observou-se que nos pacientes com hepatite foram encontradas mutações em 4,54% e nos pacientes portadores não foram encontradas mutações na região pré-core.

Quanto à presença de mutações na região core promoter nos pacientes com hepatite observou-se mutações em 27,27% e nos pacientes portadores foram encontradas mutações na região core promoter em 4,54%.

A hepatite crônica B AgHBe negativa geralmente resulta de formas mutantes do VHB incapazes de produzir e secretar o AgHBe, constituindo-se um dos maiores problemas de saúde pública nas regiões de alta prevalência do vírus B (CARMAN et

al., 1989; FUNK et al., 2002; HADZIYANNIS et al., 2001). Contudo, neste estudo a prevalência de mutações nas regiões *pré-core* e *core promoter* nos pacientes com hepatite e portador foram relativamente menor 4,54% e 31,81%, quando comparada com os estudos realizados por Chu et al. (2003). Estas diferenças provavelmente ocorreram pela maior prevalência do genótipo A neste estudo (81,81%).

6.4 CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Os testes de função hepática são utilizados para identificar a presença da doença hepática, sugerir o estágio da doença, estimar sua gravidade e acompanhar a eficácia do tratamento, contudo apresenta limitações relacionadas à sensibilidade e especificidade, razão pela qual devem ser analisados em conjunto (Sherlock & Dooley, 2002).

Neste estudo os testes utilizados para avaliar a função hepática foram agrupados em testes que sugerem a probabilidade de fibrose hepática, testes que avaliam a capacidade metabólica do fígado, testes que avaliam a síntese hepática e testes que avaliam a presença de necrose hepatocelular.

6.4.1 Marcadores da fibrose hepática

A identificação da presença de fibrose hepática é um importante parâmetro na avaliação prognóstica dos pacientes com hepatite crônica. A biópsia hepática representa o padrão ouro para esta avaliação, contudo este procedimento é considerado invasivo, nem sempre possível a realização em todos os pacientes.

No presente estudo foi avaliada a contagem plaquetária como parâmetro preditivo da fibrose hepática. A contagem plaquetária mediana nos pacientes com hepatite foi 118.000/ μ L e nos pacientes portadores foi 211.500/ μ L. Os *Box plots* dos valores plaquetários revelaram diferença significativa na contagem plaquetária entre os pacientes com hepatite e portador, demonstrando que em 75% dos casos a contagem plaquetária foi menor que 150.000/ μ L nos pacientes com hepatite ($p < 0.05$).

Sherlock et al. (2002) estudando a função plaquetária nos pacientes portadores de doença hepática observou que as anormalidades quantitativas e qualitativas da função plaquetária são comuns em todas as formas de doença hepática. Nos pacientes com insuficiência hepática crônica (IHC) e hipertensão portal (HP) a contagem plaquetária é baixa, em parte pelo aumento do seqüestro esplênico e em parte pelos baixos níveis do trombopoetina, permanecendo alterada mesmo após inserção de um tubo intra-hepático porto-sistêmico (TIPS), contudo retornam aos níveis normais após o transplante hepático.

Kosugy et al. (1997) demonstraram aumento de anticorpos IgM e IgG em pacientes com infecção viral crônica por vírus hepatotrópicos, entretanto não conseguiram detectar autoanticorpos anti-plaquetas. Outros estudos observaram uma diminuição quantitativa das plaquetas associada à disfunção medular, principalmente no alcoolismo, na deficiência de ácido fólico e na hepatite viral.

Ordinas et al. (1996) observou que a função de adesão plaquetária é mais precocemente evidenciada do que os defeitos de agregação que em geral são tardios, como demonstraram Younger et al. (1997) após análise da função plaquetária em pacientes com insuficiência hepática crônica (IHC), os quais observaram alteração da função de agregação das plaquetas nos pacientes com Child C.

Dittrich et al. (2005) estudando a correlação entre a contagem de plaquetas no sangue e o gradiente de pressão venosa hepática em pacientes cirróticos não conseguiram demonstrar de forma significativa esta correlação, contudo inferiram que o gradiente de pressão venosa hepática e a disfunção hepatocelular estavam implicadas no baixo nível de plaquetas, conforme demonstrado por outros autores.

Resultados similares foram encontrados por Gianini et al. (2006) e Park et al. (2004), contudo observaram que isoladamente este parâmetro apresentava baixa sensibilidade para substituir a biópsia hepática na avaliação da presença de fibrose durante a evolução da hepatite. Estes estudos confirmam os resultados observados no presente estudo da correlação positiva entre valores plaquetários menores que 150.000/ μ L e a presença de fibrose medida pela classificação de Metavir (75%).

6.4.2 Marcadores de avaliação do metabolismo hepatocelular

As taxas de bilirrubina no sangue normalmente representam o balanço funcional entre produção e excreção hepática (Sherlock & Dooley, 2002).

No presente estudo foram encontrados valores medianos de bilirrubina total de 0,90 mg/dL nos pacientes com hepatite e 0,88 mg/dL nos pacientes portadores.

Em geral a bilirrubina total não é um bom marcador da disfunção hepática, sendo comum o encontro de hepatopatias com valores de bilirrubina total normal, contudo quando aumentada em pacientes portadores de hepatopatia crônica confere um mau prognóstico para estes pacientes (PRATT & KAPLAN, 2003; SHERLOCK & DOOLEY, 2002).

Neste estudo os valores medianos e quartís são similares nos dois grupos, revelando que não existiu associação entre o nível de bilirrubina total e o fato de ter hepatite ou ser portador do VHB ($p > 0.05$).

6.4.3 Marcadores da síntese hepatocelular

Os principais fatores da coagulação são sintetizados pelo fígado, à exceção do fator VIII Um dos exames mais utilizados para avaliar a função de síntese hepática dos fatores da coagulação na doença hepática é a determinação da atividade da protrombina (Sherlock & Dooley, 2002).

A atividade da protrombina neste estudo apresentou valores significativos de mediana 60% nos pacientes com hepatite e 95,90% nos pacientes portadores com distribuição nos *Box plots* demonstrando que 75% dos indivíduos com hepatite têm o nível de protrombina menor que 85% enquanto que entre os portadores 75% têm nível maior que 85%.

Apesar da significância no estudo, como teste funcional hepático a atividade da protrombina isoladamente não é sensível e nem específica, entretanto, a atividade da protrombina em pacientes com doença hepática crônica pode ser usada juntamente com outros testes como método não invasivo para diagnóstico e

prognóstico das doenças hepáticas agudas e crônicas, como também descrito pelo grupo de Oberti et al. (1997).

A albumina é sintetizada exclusivamente pelo fígado. Em adultos são produzidas em média diariamente 10g a 15g de albumina, aproximadamente 200 mg/Kg/dia. A concentração sérica da albumina em um determinado momento reflete não só sua síntese como também sua degradação e distribuição. Portanto uma série de fatores extra-hepáticos envolvidos, incluindo a ingestão e absorção, integridade vascular, perdas (fezes e urina) e o estado catabólico devem ser considerados.

A mediana da albumina nos pacientes com hepatite foi 3,00 g/dL e nos pacientes portadores foi 3,95 g/dL, com distribuição nos *Box plots* 75% tem albumina menor que 4 g/dL nos pacientes com hepatite, enquanto que nos pacientes portadores 75% apresentaram albumina acima de 3,5 g/dL.

Nos pacientes cirróticos, baixa taxa de albumina no soro em geral significa diminuição de síntese hepática, que pode ser de apenas 4,0 g/dia. Contudo, em pacientes com ascite, o baixo nível de albumina no soro pode tanto significar menor síntese hepática quanto hemodiluição. Na doença hepática aguda o nível sérico da albumina não costuma ser alterado, pois sua vida média é longa, aproximadamente 20 dias, enquanto a pré-albumina tem uma vida média mais curta, de apenas dois dias, por este motivo é utilizada em alguns estudos, para avaliar a gravidade das hepatopatias agudas. A limitação do uso da albumina isoladamente como um marcador da síntese hepática deve-se a sua baixa especificidade como descrito pelo grupo de Sherlock & Dooley (2002).

6.4.4 Marcadores de necrose hepática

De Ritis et al. (1972) estudando as aminotransferases nas doenças hepáticas observou que praticamente todas as doenças elevam as aminotransferases. Níveis de até oito vezes o valor normal são inespecíficos e encontrados nas diferentes enfermidades hepáticas, contudo Sherlock & Dooley (2002) observam que a ALT é mais específica do que a AST em relação à lesão hepatocelular.

Pratt & Kaplan (2003) observaram que as maiores elevações das aminotransferases (> 2000 UI/L) são encontradas nas hepatites agudas (viral, tóxica ou medicamentosa) ou na isquemia hepática secundária a insuficiência circulatória aguda. A hepatite viral aguda é a causa mais freqüente de elevações de aminotransferases, embora os valores atingidos sejam inferiores aos registrados nos pacientes com hepatite tóxica ou isquêmica. Nessa situação é comum que os níveis de ALT e AST retornem aos valores normais dentro de sete dias e também que ocorra elevação acentuada da desidrogenase láctica, habitualmente sem maior significado na avaliação de hepatopatias.

O grupo de Sherlock & Dooley (2002) observaram que de maneira geral o nível de elevação das aminotransferases correlaciona-se pouco com o grau de necrose hepatocelular, não sendo de valor para predizer a evolução de enfermidade aguda, contudo a queda rápida dos níveis de aminotransferases na hepatite aguda indica pior prognóstico e alta probabilidade de evolução para insuficiência hepática aguda, principalmente quando em associação com altas taxas de bilirrubina e do tempo da protrombina. A persistência por período maior que seis meses sugere cronicidade do processo.

A mediana da AST e da ALT nos pacientes com hepatite foi 52 UI/L e 62 UI/L e nos pacientes portadores foi 25,50 UI/L e 36,50 UI/L com distribuição de valores máximos e mínimos nos grupos. Os *Box plots* das aminotransferases foram similares tanto entre os pacientes com hepatite como entre os pacientes portadores, não revelando associação entre os grupos.

O grupo de Sherlock & Dooley (2002) observaram que os níveis de elevação das aminotransferases não foram marcadores confiáveis de atividade histológica ou de gravidade em pacientes com hepatite crônica, salvo quando ocorrem grandes elevações. Elevações de até 500 UI/L frequentemente caracterizam as hepatopatias crônicas, em geral transitórias coincidindo com períodos de replicação viral, associação com outros vírus hepatotrópicos, intoxicações medicamentosas ou por drogas, causas metabólicas ou neoplásicas.

Pratt & Kaplan (2003) e outros autores tem estudado as relações da razão AST/ALT e as hepatopatias crônicas virais, sugerindo que esta razão quando superior a um correlacione-se com o diagnóstico de cirrose, com especificidade elevada, contudo observando baixa sensibilidade.

No presente estudo observou-se uma relação significativa entre o razão AST/ALT >1 e a presença de fibrose com uma probabilidade de 23,63% de ocorrência desta relação entre os pacientes com fibrose, semelhante aos índices encontrados Pratt & Kaplan (2003).

Flares das aminotransferases, espontâneos ou induzidos por tratamento são comuns na hepatite crônica B e são geralmente considerados como resultantes de um ou mais ataques vigorosos das células do sistema imune contra os hepatócitos infectados conforme estudos de Nair & Perrillo (2001).

No presente estudo *flares* espontâneos da ALT foram observados em 10,90% da população com hepatite e portador, sendo leves 3,63%, moderados 5,45% e severos 1,81%.

Nos pacientes com hepatite foram diagnosticados *flares* em 7,27% e nos pacientes portadores foram diagnosticados em 3,63%.

Os *Flares* são fenômenos pouco conhecidos que ocorrem espontaneamente ou durante o tratamento viral específico. Na hepatite crônica B é induzido pela replicação viral ou pela resposta do paciente à infecção como estudado por Flink et al. (2005) e conforme sugerido por Zhang et al. (2006) podem também sofrer influências de variações sazonais durante o curso da hepatite crônica pelo VHB.

No presente estudo os *flares* foram mais prevalentes nos pacientes com hepatite (7,27%) e provavelmente refletem replicação viral devido à presença de cepas selvagens residuais ou a presença de cepas mutantes que não expressam o AgHBe. Estes pacientes apresentam elevado potencial de progressão para cirrose e suas complicações confirmando os estudos de Rizzeto et al. (2000).

6.4.5 Marcador do carcinoma hepatocelular (CHC)

A alfa-fetoproteína (AFP) é um exame laboratorial importante na investigação do carcinoma hepatocelular (CHC) sendo considerado sugestivo de CHC valor de AFP maior que 400 UI/mL (GONÇALVES & LIMA PEREIRA, 2004).

A mediana dos valores de alfa-fetoproteína nos pacientes com hepatite e portador foi idêntica (5,0 UI/mL). O hepatocarcinoma foi observado neste estudo em

3,63% (N=2/55) dos pacientes com hepatite (A2F4), que apresentaram alfa-fetoproteína média de 14,03 UI/mL. A análise molecular das amostras sorológicas destes pacientes pela PCR obteve êxito na amplificação do gene S, permitindo a determinação do genótipo A subgenótipo A1 (AA) e genótipo F subgenótipo F2 do VHB. Os dados demográficos revelaram idade média de 47 anos com predomínio do gênero masculino e com tempo médio de evolução da doença maior que cinco anos.

Os pacientes portadores de infecção crônica pelo VHB têm cem vezes mais probabilidade de desenvolvimento do CHC do que os não portadores do AgHBs. O acompanhamento destes pacientes é realizado com ultrassom e dosagem de alfa-fetoproteína, entretanto esta avaliação é imperfeita, embora a alfa-fetoproteína tenha um excelente valor preditivo negativo, o seu valor preditivo positivo é variável de 9% a 30% (GANEN & PRINCE 2004).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a neoplasia primária mais comum do fígado ocorrendo em alta frequência no Sudeste da Ásia e na África Central, e em áreas onde a infecção crônica pelo VHB é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer com uma incidência de 20% a 25% nos pacientes com VHB, aparecendo em 90% dos casos em pacientes com cirrose (LYNCH et al., 1984).

Hsu et al. (2002) observa que a soroconversão do AgHBe em geral confere aos pacientes infectados boa evolução, contudo a hepatite ativa pode evoluir para cirrose e ou hepatocarcinoma. Pacientes AgHBs reagentes após a soroconversão do AgHBe, durante acompanhamento de 8,6 anos em média apresentaram CHC em 2,2% com uma incidência acumulada de hepatite ativa após a soroconversão do AgHBe de 7,8%.

Ryder (2003) estudando os fatores de risco para o CHC encontraram que em homens o risco é maior, independente do fator etiológico, com uma proporção de 1,9:1 em relação às mulheres, a idade média do surgimento do CHC no Reino Unido foi 66 anos, contudo em locais com prevalência alta de CHC a distribuição da idade é bimodal, com picos nas idades de 45 anos e 65 anos. A cirrose hepática está geralmente presente em 90% a 95% dos casos e o VHB é o fator etiológico mais frequentemente associado ao CHC em todo o mundo, com um risco de 5% ao ano para o seu desenvolvimento, entretanto em 40% dos casos esta associação não vem acompanhada de cirrose hepática.

São considerados fatores de risco para a progressão da doença hepática e hepatocarcinoma: pacientes com infecção perinatal que persistem com elevados níveis de replicação por mais que quatro décadas, genótipo C do VHB, elevados níveis de VHB DNA, consumo de álcool, co-infecção com os vírus VHC, VHD e o HIV, gênero masculino, história familiar de hepatocarcinoma, exposição continuada à carcinógenos (aflatoxinas e tabagismo), história de soroconversão do anti-HBe para o AgHBe, presença de cirrose e presença de mutações na região *core promoter* (LOK & MCMAHON, 2007).

Os dados demográficos e clinico-epidemiológicos dos pacientes portadores de CHC observados neste estudo são semelhantes aos encontrados por outros autores em áreas de alta prevalência do VHB e sugerem que neste estudo os pacientes possivelmente tenham contraído a infecção pelo VHB por transmissão através do contato familiar durante o período perinatal.

6.5 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Foram analisadas 55 biópsias hepáticas durante o período de acompanhamento de pacientes portadores do AgHBs com *status* sorológico AgHBe negativo/anti-HBe positivo, sendo os resultados avaliados de acordo com a atividade necroinflamatória e fibrose do parênquima hepático, conforme o sistema de Metavir, sendo que ao final do estudo os resultados das análises histopatológicas concluíram que 63,64% destes pacientes com soroconversão do AgHBe apresentaram hepatite e 36,36% não apresentaram hepatite, sendo denominados de portadores inativos do AgHBs, apesar da presença do anti-HBe e do VHB DNA no soro.

De acordo com estudos realizados por Lok & Lai (1988) com pacientes portadores do AgHBs com ALT elevada, a soroconversão do AgHBe ocorre em 8% a 12% ao ano, mas é baixa entre portadores que estão na fase de imunotolerância e entre pacientes imunocomprometidos. A soroconversão do AgHBe segue-se a uma fase de exacerbação da hepatite, manifestada por *flares*, observando que as maiores taxas de soroconversão do AgHBe são verificadas em pacientes infectados com o genótipo B. Depois da espontânea soroconversão do AgHBe, 67% a 80%

dos portadores do AgHBs tem níveis baixos ou indetectáveis de VHB DNA e ALT normal com mínima ou nenhuma atividade necroinflamatória na biópsia hepática.

Lok et al. (1987) analisando os pacientes que permanecem com AgHBe negativo observou que 10% a 30% continuam com ALT elevada e altos níveis de VHB DNA depois da soroconversão e aproximadamente 10% a 20% podem ter reativação do VHB, replicação e exacerbação da hepatite depois de anos de quiescência. Níveis moderados e elevados persistentes de replicação ou reativação do VHB DNA seguindo-se ao período de quiescência, caracterizam a hepatite crônica B AgHBe negativo com VHB DNA com níveis maiores que 2.000 UI/mL e atividade necroinflamatória persistente no fígado. Muitos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo apresentam mutações nas regiões *pré-core* e *core promoter*. Estes pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo tem carga viral menor do que os pacientes com AgHBe positivo e caracterizam-se por apresentar uma viremia flutuante, em geral são mais velhos e tem doença hepática mais severa, representando a fase tardia da evolução da infecção crônica pelo VHB.

Zacharakis et al. (2005) avaliando pacientes portadores do AgHBs no Norte da Grécia, uma área considerada de intermediária endemicidade do VHB, durante 12 anos observou pacientes portadores do AgHBs tinham VHB DNA detectável no soro, com significativa atividade necroinflamatória fibrose na biópsia hepática.

Chu & Liaw (2007) avaliando casos de infecção crônica pelo VHB observaram que a prevalência da hepatite crônica B AgHBe positivo em portadores assintomáticos era elevada antes dos 15 anos de idade e diminuía a menos de 10% depois dos 40 anos. Entretanto observaram que os pacientes que soroconvertiam antes dos 40 anos tinham melhor prognóstico do que aqueles que persistiam soropositivos após esta idade.

No presente estudo a prevalência de pacientes portadores após a soroconversão foi 36,36%, observando-se neste grupo uma faixa etária média menor que 40 anos, revelando índices muito próximos aos verificados pelos diversos estudos. Nos pacientes com hepatite após a soroconversão a prevalência de casos de hepatite foi 63,64%, sendo a faixa etária destes pacientes mais elevada, com idade média maior que 40 anos, confirmando os estudos de Chu & Liaw (2007) de que pacientes com soroconversão com menos de 40 anos de idade devem ser considerados pacientes com bom prognóstico em comparação com aqueles que

soroconvertem com mais de 40 anos de idade sendo estes pacientes candidatos a tratamento específico do VHB pelo alto risco de evoluírem para cirrose e suas complicações.

Neste estudo observou-se cirrose em 9,09% (N=5/55) dos pacientes com hepatite demonstrando que a hepatite crônica B AgHBe negativo representa uma fase tardia da história natural da infecção crônica pelo VHB, mais do que uma nova infecção com mutantes *pré-core* ou *core promoter*, que não produzem o AgHBe conforme observado nos estudos de Fattovich et al. (1992) e Tassopoulos et al. (1999).

Em relação ao genótipo e a doença hepática induzida pelo VHB, dois estudos demonstraram que existem diferenças clínicas no curso das hepatites induzidas por infecção com diferentes genótipos. Os estudos de Shina et al. (1991) e de Kao et al. (2000) descrevem a maior agressividade do genótipo C sobre o genótipo B, inclusive com maior grau de fibrose, maior prevalência de cirrose e hepatocarcinoma. Em relação aos genótipos A e D um estudo na Índia realizado por Thakur et al. (2002) demonstrou que o genótipo D está associado com maior severidade da doença hepática e pode ser preditivo de hepatocarcinoma em pacientes jovens portadores de infecção pelo VHB com este genótipo.

Nos pacientes com hepatite o genótipo o mais prevalente foi A/A1 (AA) (54,54%), sendo os genótipos D e F menos freqüentes (4,54%).

Em relação à presença de mutações *pré-core* e *core promoter* foi observado que nos pacientes com hepatite ocorreram mutações *pré-core* e *core promoter* em 31,81%, sendo mais freqüentes as mutações na região *core promoter* (27,27%).

Chu et al. (2003) observou que mutações da região do *core promoter* e da região *pré-core* são encontradas em um terço dos pacientes com infecção crônica pelo VHB nos EUA. A prevalência destas mutações nos EUA varia de acordo com a etnia, idade e genótipo do VHB. Este estudo também demonstrou que os pacientes com mutações na região do *core promoter* são mais propensos a desenvolver cirrose e descompensação hepática. Nos EUA os pacientes com AgHBe negativo com mutações na região *core promoter* e na região do *pré-core* tem altos níveis de VHB DNA no soro, maior do que naqueles infectados com VHB selvagem.

No presente estudo observou-se uma significativa relação entre lesão hepática e a presença do *status* AgHBs positivo e AgHBe negativo (63,64%), provavelmente influenciada pela etnia, tempo de doença, genótipo e mutações do VHB. O genótipo mais prevalente nos pacientes com hepatite no estudo foi o genótipo A subgenótipo A1 (AA) (54,54%) sendo a presença de mutações pré-*core* e *core promoter* do VHB observadas em 36,36% dos pacientes com infecção crônica pelo VHB com *status* sorológico AgHBe negativo, com maior prevalência das mutações *core promoter* (27,27%), confirmando os trabalhos realizados pelo grupo de Chu et al. (2003) em relação ao predomínio da mutação *core promoter* nos pacientes infectados com o VHB do genótipo A.

6.6 CARACTERÍSTICAS ULTRASSONOGRÁFICAS

O exame ultrassonográfico hepático neste estudo teve os seguintes objetivos: avaliar os sinais de fibrose, de patologias associadas à infecção crônica pelo VHB e detectar sinais ultrassonográficos de hipertensão portal.

De acordo com Guerrini et al. (1988), a descrição anatômica ultrassonográfica hepática compreende um fígado com superfície lisa, textura homogênea, onde são identificadas estruturas vasculares em seu interior que correspondem aos vasos portais e veias hepáticas. A artéria hepática e os ductos biliares são visualizados próximos ao hilo. As veias hepáticas não têm paredes ecogenicamente demonstráveis e dirigem-se cefalicamente, aumentando de calibre até penetrar na veia cava inferior. Os vasos do sistema portal possuem paredes refringentes nítidas e vão se tornando mais calibrosos em direção caudal, até formarem o tronco da veia porta. Existem dois grupos de veias hepáticas: o superior que se divide em ramo direito, médio e esquerdo e o inferior que é composto por veias hepáticas menos calibrosas

Neste estudo, durante o período de acompanhamento da população foram realizadas três análises ultrassonográficas, as quais foram descritas e agrupadas de acordo com a presença de fibrose, patologias associadas à infecção crônica pelo VHB e sinais ultrassonográficos de hipertensão portal.

6.6.1 Marcadores ultrassonográficos de fibrose hepática

Scott et al. (2001) descreveram que as alterações da atenuação do feixe sonoro causadas pela fibrose, hepatomegalia e textura heterogênea, além de micronódulos são observações freqüentes nas hepatopatias crônicas. Estas alterações são dependentes da fase evolutiva da doença fibrogênica. Inicialmente existe apenas hepatomegalia sem alteração da textura do fígado. Numa segunda fase existe leve atenuação do feixe sonoro, causada pela fibrose, contudo é menos intensa que a atenuação do feixe sonoro observada na esteatose hepática. Na terceira fase existe um padrão micronodular com nódulos mais ecogênicos e menores que um centímetro, os quais podem ser observados também na superfície hepática. Iniciam-se nesta fase alterações dos contornos, atrofia do parênquima, hipertrofia do lobo caudado e apagamento das estruturas vasculares. Na última fase, como resultado da fibrose intensa ocorre retração do fígado e a superfície nodular é bem visível, podendo ser detectado ascite.

Neste estudo nos pacientes com hepatite encontramos sinais de atividade fibrogênica demonstrando a sensibilidade do exame ultrassonográfico em avaliar fibrose hepática em 90,2% (IC 95% 75,9; 96,8) com valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 88,3; 100) e valor preditivo negativo de 77,8% (IC 95% 51,9; 92,6), confirmando os estudos realizados pelo grupo de Scott et al. (2001).

6.6.2 Marcadores ultrassonográficos de doenças associadas

Conforme Bouchier et al. (1969) a ascite geralmente associa-se à cirrose hepática e a esplenomegalia pode acompanhar qualquer fase da cirrose, não estando obrigatoriamente associada à hipertensão portal, sendo importante a avaliação global da textura do fígado no diagnóstico da lesão focal em razão da maior incidência de hepatocarcinomas nestes pacientes. Outra associação descrita por estes autores foram as colecistopatias que foram associadas à doença hepática crônica mais que com a população normal.

Em relação aos sinais ultrassonográficos sugestivos de patologias associadas à infecção crônica pelo VHB, observou-se no presente estudo ocorrências apenas no grupo com hepatite, sendo mais freqüentes as colecistopatias, que foram observadas em 18,18% e as lesões focais, observadas em 5,45%. Estes achados confirmam os achados em pacientes portadores de hepatopatia crônica observados pelo grupo de Bouchier et al. (1969).

6.6.3 Marcadores ultrassonográficos de hipertensão portal

Cerri & Rocha (1993) consideram a veia porta dilatada quando mede acima de 1,2 cm, assim como valores acima de 0,9 cm para a veia esplênica e mesentérica superior. Estes valores, contudo não são absolutos, pois existem pacientes normais com calibre de vasos portais acima da média, sem significado clínico. O sinal mais característico da hipertensão portal é a circulação colateral.

O sítio da colateral dependerá do sítio da obstrução ao fluxo portal, ou seja, pré-sinusoidal ou hepático. Assim na obstrução do tipo intra e pós-sinusoidal a descompressão é hepatofugal. Na hipertensão pré-sinusoidal como a pressão intra-hepática está essencialmente normal, a descompressão é geralmente hepatopetal.

Caletti et al. (1990) descreveram que as colaterais portossistêmicas podem ser divididas em dois grupos, de acordo com a área de drenagem. *Shunts* em direção a veia cava inferior ocorrem entre as colaterais calibrosas, que mantém alto fluxo, e proporcionam conseqüentemente, alto risco de encefalopatia, como ocorre na fase terminal da cirrose hepática.

Quando os *shunts* são em direção a veia cava superior e as veias colaterais cursam próximas as superfícies da mucosa determinam maior risco para sangramento digestivo. As três principais veias colaterais identificadas ao exame ultrassonográfico são: veia umbilical, veia gástrica esquerda e veias gástricas curtas, as duas últimas dão origem às varizes de fundo gástrico e esôfago distal.

Nos pacientes com hepatite foram observados sinais maiores de hipertensão portal em 38,18% e sinais menores em 40%. Nos pacientes portadores não observamos sinais de hipertensão portal. Neste estudo foi altamente significativa a

associação entre os sinais ultrassonográficos de hipertensão portal e a presença de hepatite confirmando os estudos de Cerri & Rocha (1993) e Caletti et al. (1990) sobre a associação da hipertensão portal com hepatite crônica.

6.7. CARACTERÍSTICAS ENDOSCÓPICAS

O exame de endoscopia do trato gastrintestinal superior avaliou na população com hepatite e portador a presença de varizes esofágicas e sinais preditivos de sangramento varicoso.

Nos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo a presença de cordões varicosos no esôfago ou no fundo gástrico foram detectados em 36,36%. Nos pacientes portadores não foram detectadas alterações endoscópicas. A presença de manchas hematocísticas na superfície das varizes foi detectada em 12,73% dos pacientes com hepatite.

Garcia-Tsao et al. (1985) sugeriram que o sangramento por ruptura de varizes esôfago-gástricas representa a principal complicação da hipertensão portal, com uma mortalidade que varia de 20% a 60% dos casos, contudo o fenômeno hemorrágico tem vários outros condicionamentos.

São escassos os estudos sobre a história natural do sangramento por varizes esofágicas, porém há indícios de que 30% dos pacientes com varizes de médio calibre teriam chance de vir a sangrar anualmente.

O estudo de NIEC (1988) demonstrou após análise estatística com o modelo de regressão múltipla de Cox, que apenas três fatores apresentavam valor preditivo para o sangramento das varizes: a classificação de Child, o calibre das varizes e as manchas vermelhas na superfície das varizes.

Assim valores do índice de NIEC menores que 20 apresentam risco de sangramento de apenas 1,6% no primeiro ano de seguimento e índices maiores que 40 demonstram que a probabilidade de hemorragia será de 68,9% no mesmo período de seguimento.

No presente estudo a aplicação do índice de NIEC no grupo com hepatite revelou um índice de 38,57 com uma probabilidade de hemorragia para o período de

12 meses de 37,8%, semelhante aos resultados encontrados pelo grupo de Garcia-Tsao et al. (1985) que estudaram a história natural do sangramento das varizes esôfago-gástricas.

CONCLUSÕES

- 8.1 Este estudo demonstrou uma prevalência de hepatite crônica B AgHBe negativo em pacientes da Amazônia Ocidental Brasileira portadores do AgHBs com *status* sorológico AgHBe negativo/anti-HBe positivo de 63,64%.
- 8.2 A frequência de pacientes portadores inativos do AgHBs após a soroconversão do AgHBe foi 36,36%, observando-se nestes pacientes uma idade média ≤ 40 anos, enquanto nos pacientes com hepatite observou-se uma idade média ≥ 40 anos, revelando que a soroconversão do AgHBe com menos de 40 anos de idade, pode ser considerada um fator preditivo de bom prognóstico em comparação com aqueles que soroconvertem o AgHBe após os 40 anos, que em geral apresentam pior prognóstico.
- 8.3 A análise do tempo de evolução da doença sugere que com o passar do tempo o número de casos de pacientes portadores inativos do AgHBs tende a diminuir, enquanto aumenta o número de casos de pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo, estabilizando-se neste estudo ao longo do período ≥ 5 anos.

- 8.4 Foi possível identificar na Amazônia Ocidental Brasileira os genótipos e subgenótipos mais prevalentes do VHB nos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo, correspondendo ao genótipo A subgenótipo Afro-Asiático (AA) a maior prevalência, 54,54%, ao genótipo D subgenótipo D1, 4,54% e ao genótipo F subgenótipo F2, 4,54%.
- 8.5 O seqüenciamento das regiões *pré-core* e *core promoter* dos pacientes com hepatite crônica B AgHBe negativo identificou 31,81% de mutações, com predomínio das mutações *core promoter* A₁₇₆₄ e T₁₇₆₂, com uma proporção de 7:1 em relação as mutações *pré-core* A₁₈₉₆, sendo este predomínio atribuído a elevada prevalência do genótipo A subgenótipo Afro-Asiático (AA) (54,54%).
- 8.6 Neste estudo foi verificada uma significativa associação entre os pacientes com hepatite, com tempo de doença ≥ 5 anos, com o genótipo A (AA) e mutações do VHB.
- 8.7 Nos pacientes com hepatite crônica AgHBe negativo a sensibilidade do exame ultrassonográfico em avaliar a fibrose hepática foi 90,2% (IC 95% 75,9; 96,8) com valor preditivo positivo de 100% (IC 95% 88,3; 100) e valor preditivo negativo de 77,8% (IC 95% 51,9; 92,6).
- 8.8 Vários autores descrevem o genótipo F como o genótipo mais prevalente na região contrastando com os resultados encontrados neste estudo que demonstrou uma maior prevalência do genótipo A sub-genótipo Afro-asiático. Esta modificação nos índices de prevalência pode estar relacionada como os movimentos migratórios que a região vem sofrendo há várias décadas, o que poderia estar contribuindo para a mudança do perfil genotípico do VHB, necessitando de mais estudos para confirmar estas observações epidemiológicas na Amazônia Ocidental Brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINOLFI, L. E.; GIORDANO, M. G.; ANDREANA, A. et al. Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of trombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis. **J Hematol.** v. 113, p. 590-95, 2001.

ALBERTI, A.; CHEMELLO, L.; BENVENÚ, L. Natural history of hepatitis C. **J Hepatol.** v. 31, p. 17-24, 1999.

ALTER, H. J.; HOLLAND, P. V. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B antigen-positive donors. **An Intern Med.** v. 77, p. 691-99, 1972.

ALTER, M. J.; MARGOLIS, H. S. The emergency of hepatitis B as a sexually transmitted disease. **Med Clin North Am.** v. 74, p. 1529-41, 1990.

ALTER, M. Epidemiology and disease burden of hepatitis B and C. **Antiviral.** P. 9-15, 1996.

ARANGO, H. G. **Bioestatística Teórica e Computacional.** Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.

ARAUS-RUIZ, P. et al. Genotype H: a new Ameridian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. **J Gen Virol.** v. 83, p. 2059-73, 2002.

ASHIS, M.; BANUMATHI, R.; VIJAY, R. et al. Liver histology and immunohistochemical findings in asymptomatic incidental detection of hepatitis B virus infection. **Indian J Gastroenterology.** v. 25, p. 128-31, 2006.

BARTENSCHLAGER, R.; SCHALLER, H. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. **EMBO J.** v. 11, p. 3413-20, 1992.

BAUMERT, T. F.; ROGERS, S. A.; HASEGAWA, K. et al. Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. **J Clin Invest.** v. 98, p. 2268-76, 1996.

BEASLEY, R. P.; HWANG, L. Y. Incidence of hepatitis B virus infection in preschool children in Taiwan. **J Infect Dis.** v. 146, p. 198-204, 1982.

BEASLEY, R. P. Hepatitis B virus. The major ethiology of hepatocellular carcinoma. **Cancer.** v. 15, p. 1942-56, 1988.

BEDOSSA & POYNARD. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **The METAVIR Cooperative Study Group.** v. 24, p. 289-93, 1996.

BENSABATH, G.; SOARES, M. C. P.; BARROS, V. L. R. S. Aspectos epidemiológicos da infecção associada delta-vírus da hepatite B no município de Boca do Acre, microrregião do Purus, Amazonas. **Anais do Congresso da Soc Bras Med Trop.** Salvador, Bahia, p. 107, 1984.

BEPPU, K.; INOKUCHI, K.; KOYANAGI, N. Prediction of variceal hemorrhage by esophageal endoscopy. **Gastrointest Endos.** v. 27, p. 213-18, 1981.

BERTOLETTI, A.; SETTE, A.; CHISARI, F. V. et al. Natural variants of cytotoxic epitops are T-cell receptor antagonist for antiviral cytotoxic T-cells. **Nature.** v. 369, p. 407-10, 1994.

BLUM, H. E.; BAUMERT, F. T. hepatitis B vírus mutants: molecular biology and clinical relevance. **Viral Hepatitis.** v. 6, p. 177-90, 2000.

BONINO, F.; ROSINA, F.; RIZZETTO, M. et al. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and ant-Hbe. **Gastroenterology.** v.90, p. 1268-73, 1986.

BORTOLOTTI, F.; JARA, P. Outcome of chronic hepatitis B in Caucasian children during a 20-year observation period. **J Hepatol.** v. 29, p.184-90, 1998.

BOUCHIER, I. A. D. Post mortem study of the frequency of gallstones in patients with cirrhosis of the liver. **Gut.** v. 10, p. 705, 1969.

BRAGA, W. S.; BRASIL, L. M.; SOUZA, R. A. et al. The occurrence of hepatitis B and Delta vírus infection within seven Amerindian ethnic groups in the Brazilian Western Amazon. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 34(4), p. 349-55, 2001.

BRUNETTO, M. R.; STENIER, M.; SCHODEL, F. et al. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HbeAg and may be responsible for severe hepatitis. **Ital J Gastroenterology.** v. 21, p. 151, 1989.

BRUNETTO, M. R.; STENIER, M. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-Hbe positive chronic hepatitis B. **J Hepatol.** v. 10, p. 258-61, 1990.

BRUNETTO, M. R.; GIARIN, M. M. Wild typ and e antigen-minus hepatitis B virus and course of chronic hepatitis. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 88, p. 4186-90, 1991.

BRUNETTO, M. R.; OLIVIERI, F.; COCO, B. et al. Outcome of anti-Hbe positive chronic hepatitis B in alpha-interferon treated and untreated patients: a long term cohort study. **J Hepatol.** v. 36, p. 263-70, 2002.

BRUSS, V.; GERLICH, W. H. Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. **Virology.** v. 163, p. 268-75, 1988.

BURK, R. D.; HWANG, L. Y.; HO, G. Y. et al. Outcome of perinatal hepatitis B virus exposure is dependent on maternal virus load. **J Infect Dis.** v. 170, p. 1418-50, 1994.

CACCIOLA, L.; CARENZIA, G.; POLLICINO, T. et al. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus (HBV) and outcome of perinatal infection. **J Hepatol.** v. 36, p. 426-32, 2002.

CALETTI, G.; BROCCHI, E.; BARALDINI, M. et al. Assessment of portal hypertension by endoscopic ultrasonography. **Gastrointest Endosc.** v. 36, p. 21, 1990.

CARMAN, W. F.; HADZIYANNIS, S.; MCGARVEY, M. J. et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet.** p. 588, 1989.

CAVANAUGH, V. J.; GUIDOTTI, L. G. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. **J Virol.** v. 71, p. 3236-43, 1997.

CERRI, D. C.; ROCHA, G. G. Fígado In:_____. **Ultra-sonografia Abdominal.** São Paulo: Sarvier, 1993.

CHAN, H. L. Y.; LOK, A. S. F. Hepatitis B in adults: A clinical perspective. In: LEE, W. M. **Hepatitis B Clinics in Liver Disease.** v. 3, p. 291-308, 1999.

CHAN, H. L. Y.; LEUNG, N. W. Y. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. **Hepatology.** v. 31, p. 763-68, 2000.

CHANG, M. H.; SUNG, J. L. Factors affecting clearance of hepatitis B e antigen in hepatitis B surantigen carrier children. **J Pediatr.** p. 115-391, 1989.

CHEINQUER, H. Tratamento atual da hepatite crônica B. In: COUTINHO, A. **Curso de Hepatologia Clínica.** Recife: Editora Universitária da UFPE, p. 217-39, 2003.

CHENG, K. C.; SMITH, G. L. Hepatitis B virus large surface protein is not secreted but is immunogenic when selectively expressed by recombinant vaccinia virus. **J Virol.** v. 60 (2), p. 337-44, 1986.

CHISARI, F. V.; FERRARI, C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. **Ann Rev Immunol.** v. 13, p. 29-60, 1995.

- CHISARI, F. V.; Cytotoxic T cells and viral hepatitis. **J Clin Invest.** v. 99, p. 1472-77, 1997.
- CHU, C. M.; LIAW, Y. F. Natural history of chronic hepatitis B virus infection na immunopathological study. **J Gastroenterol Hepatol.** v. 12, p. 218-22, 1997.
- CHU, C. J.; HUSSAIN, M.; LOK, A. S. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. **Hepatology.** v. 36, p. 1408-15, 2002.
- CHU, C. J.; KEEFFE, E. B.; HAN, S. H. et al. Prevalence of HBV Precore/core promoter variants in the United States. **Hepatology.** v. 38, p. 619-28, 2003.
- CHU, C. J.; LIAW, Y. F. Chronic hepatitis B virus infection acquired in childhood: special emphasis on prognostic and therapeutic implication of delayed HbeAg seroconversion. **J Viral Hepat.** v. 14, p. 147-52, 2007.
- CLEMENTE, C. M.; CARRILHO, F. J. Epidemiologia. In: DA SILVA, L. C. **Hepatitis Agudas e Crônicas.** 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003.
- CONDE, S. R. S. S.; MÓIA, L. J. P.; BARBOSA, M. S. B. et al. Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia Oriental. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. I (supl), p. 33-39, 2004.
- COUROUCE-PAUTY, A. M.; LEMAIRE, J. M. New hepatitis B surface antigensubtypes inside the ad category. **Vox Sang.** v. 35 (5), p. 304-8, 1978.
- COURSAGET, P.; YVONET, B. Age and sex related study of hepatitis B virus chronic carrier state in infants from an endemic area (Senegal). **J Med Virol.** v. 22, p. 1-5, 1987.
- DA SILVA, L. C.; MADRUGA, C. L.; CARRILHO, F. J. Spontaneous hepatitis B surface antigen clearance in a long-term follow-up study of patients with chronic type B hepatitis. Lack of correlation with hepatitis C and D virus superinfection. **J Gastroenterol.** v. 31(5), p. 696-701, 1996.
- DA SILVA, L. C. **Hepatitis Agudas e Crônicas.** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2003.
- DE FRANCHIS, R.; MEUCCI, G. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. **An Intern Med.** v. 118, p. 191-94, 1993.
- DE JONGH, F. E.; JANSSEN, H. L. A. Survival and prognostic indications in hepatitis B surface antigen positive cirrhosis of the liver. **Gastroenterology.** v. 103, p.1630-35, 1992.
- DE RITS, F.; COLTORTI, M.; GIUSTI, G. Serum-transaminase activities in liver disease. **Lancet.** v. 1(7752), p. 685-87, 1972.

DI BISCEGLIE, A. M.; WAGGONER, J. G. Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in liver of chronic carriers correlation with serum markers and changes associated with loss of hepatitis B e antigen after antiviral therapy. **Gastroenterology**. v. 93, p. 1236-41, 1987.

DIENTAG, J. L.; SCHIFF, E. R. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. **N Engl J Med**. v. 341, p. 1256-63, 1999.

DITTRICH, S.; MATTOS, A. A.; CHEINQUER, H. et al. Correlação entre a contagem de plaquetas no sangue e o gradiente de pressão venosa hepática em pacientes cirróticos. **Arq Gastroenterol**. v. 42, p. 35-40, 2005..

ECHEVARRIA, J. M.; LEÓN, P. Epidemiologia de las hepatitis crônicas con carácter virico en las comunidades indígenas de la cuenca amazônica y de otros ecosistemas similares. **Cad Saúde Pública**. v. 19(6), p. 1583-91, 2003.

EHATA, T.; OMATA, M.; CHUANG, W. L. et al. Mutations in core nucleotide sequence of hepatitis B virus correlate with fulminant and severe hepatitis. **J Clin Invest**. v. 91, p. 1206-13, 1993.

EVERITT, B. S.; HOTHORN, T. **A Handbook of statistical analyses usig R**. New York: Chapman & Hall, 2006.

FARREL, G. Hepatitis B e antigen soroconversion. Effects of lamivudine alone or in combination with interferon alfa. **Journal of Medical Virology**. v. 61, p. 374-79, 2000.

FATTOVICH, G.; ALBERTI, A.; TREMOLADA, F. et al. Natural history of liver disease associated with hepatitis B virus VHB infection. In: VYAS, G. N.; DIENSTAG, J. L.; HOOFNAGLE, J. H. **Viral Hepatitis and Liver Disease**. Orlando: Grune & Stratton, 1984.

FATTOVICH, G.; BROLLO, L.; GIUSTINA, G. et al. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. **GUT**. v. 32, p.294-98, 1991.

FATTOVICH, G.; FARCI, P.; RUGGE, M. et al. A randomized controlled trial of lynchblastoid interferon-alpha in patients with chronic hepatitis B lacking HbeAg. **Hepatology**. v. 15, p. 584-89, 1992.

FATTOVICH, G.; GIUSTINA, G. Ocurrence of hepatocellular carcinoma and descompensation in western European patients with cirrhosis type B. The Eurohep study group on hepatitis B virus and cirrhosis. **Hepatology**. v. 21, p. 77-82, 1995.

FERREIRA, M. S. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Rev Soc Bras Med Tropical**. v. 34 (4), p. 389-400., 2000.

FLINK, H. J.; SPRENGERS, D.; HANSEN, B. E. et al. Flares in chronic hepatitis B patients induced by the host or the virus? Relation to treatment response during Peg-interferon α – 2b therapy. **Gut**. v. 54, p. 1604-609, 2005.

FRANCO, V. S.; GUIMARÃES, R. S.; FRANCO, L. J. et al. Marcadores sorológicos da hepatite viral B e alfa-1-antitripsina em índios da tribo Mekranhotire. **Rev Paul Méd**. v. 103, p. 223-27, 1985.

FOCCACIA, R.; CONCEIÇÃO, O. J. G. Estimated prevalence of viral hepatitis on the general population of the municipality of São Paulo measured by plasmatic markers through samples collected from a stratified, randomized and residence-based population survey. **Braz J Infect Dis**. v. 2, p. 268-83, 1998.

FONG, T. L.; DI BISCEGLIE, A. M. High levels of viral replication during acute hepatitis B infection predict progression to chronicity. **J Med Virol**. v. 43, p. 155-58, 1984.

FONSECA, J. C.; SIMONETTI, S. R.; SCHTZMAYR, H. G. et al. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 82(3), p. 469-71, 1988.

FONSECA, J. C. Hepatitis D. **Rev Soc Bras Med Trop**. V. 35 (mar-abr) n.2, 2002.

FUGISAWA, T.; KOMATSU, H. Long-term outcome of chronic hepatitis B in adolescents or young adults in follow-up from child-hood. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 30, p. 201-6, 2000.

FUNK, M. L.; ROSEMBERG, D. M.; LOK, A. S. World-wide epidemiology of HbeAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. **J Viral Hepat**. v. 9(1), p. 52-61, 2002.

FURASTÉ, P. A. Normas Técnicas para o Trabalho Científico: Elaboração e Formatação. 14 ed. Porto Alegre: Gráfica e Editora Brasil, 2006..

GANEM, D.; VARMUS, H. The molecular biology of the hepatitis B vírus. **Am Rev Biochem**. v. 56, p. 651-93, 1987.

GANEM, D. Hepadnaviridae: The viruses and their replication. **Virology**. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. Et al. 3. ed. Philadelphia Lippincott-Raven: Howley. P. 2703-3737, 1996.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B vírus infection – Natural history and clinical consequences. **NEJM**. v. 350, p. 1118-129, 2004.

GARCIA-TSAO, G.; GROSZMANN, R. J.; FISCHER, R. L. et al. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. **Hepatology**. v. 5, p. 419-24, 1985.

GAYOTTO, L. C. C.; QUARENTEI, A. A.; CABRAL, G. L. Soroepidemiologia das hepatites A e B nas áreas dos rios Biá e Alto Juruá, Amazonas Oriental. **GED**. v. 3, p. 106-16, 1984.

GERLICH, W. H.; ROBINSON, W. S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. **Cell**. v. 21 (3), p. 801-9, 1980.

GIANNINI, E. G.; ZAMAN, A.; CEPPA, P. et al. A simple approach to noninvasively identifying significant fibrosis in chronic hepatitis C patients in clinical practice. **J Clin Gastroenterol**. v. 40, p. 521-27, 2006.

GONÇALVES JR, F. L. Hepatitis B. In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 299-314, 1996.

GONÇALVES JR, F. L.; PEREIRA, J. S. F.; SILVA, C. et al. Hepatitis B vírus DNA in sera of blood donors and of patients infected with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V.10, p. 718-20, 2004.

GONÇALVES, N. S. L.; GONÇALVES JR, L. F. Perfis sorológicos anômalos, genótipos e mutantes do VHB. **The J Infec Dis**. v. 10 (suppl I august), p. 23-28, 2006

GOTOH, K.; MIMA, S.; UCHIDA, T. et al. Nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from subjects without serum anti-hepatitis B core antibody. **J Med Virol**. v. 46, p. 201-6, 1995.

GRAEME, J. M. A. & EDDESTON, A. L. W. Acute and chronic hepatitis. In: TRIGER, D. R. **Clinical Immunology of the Liver and Gastrointestinal tract**. Bristol: John Wright and Sons Ltd., 1985.

GRANDJACQUES, C.; PRADAT, P. Rapid detection of genotypes and mutations in the pré-core promoter and the pre-core region of hepatitis B vírus genome: correlation with viral persistence and disease severity. **J Hepatol**. v. 33, p. 430-39, 2000.

GROB, P. Introduction to epidemiology and risk of hepatitis B. **Vaccine**. v. 13, p. 514, 1995.

GUIDOTTI, L. G.; ISHIKAWA, T. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. **Immunity**. v. 4, p. 25-36, 1996.

GUIDOTTI, L. G.; McCLARY H. Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. **J Exp Med**. v. 191, p. 1247 -52, 2000.

GUERRINI, R. M.; CERRI, G. G.; MAGALHÃES, A. Critérios para segmentação hepática. **Rev da Imagem**. v. 10, p. 107, 1988.

GUNTHER, S.; PIWON, N.; WILL, H. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. **J Virol.** v. 699, p. 5437-44, 1995.

HADZIYANNIS, S. J. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment. **Viral Hepat Rev.** v. 1, p. 7-36, 1995.

HADZIYANNIS, S. J.; VASSIPOULOS, D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. **Hepatology.** v. 34, p. 617-24, 2001.

HALFON, P.; BOURLIERE, M.; POL, S. et al. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. **J Viral Hepat.** v. 13(5), p. 329-35, 2006.

HEPTONSTALL, J. Transmission of hepatitis B to patients from four infected surgeons without hepatitis B e antigen. **The New Engl J of Med.** v. 336, p. 178-85, 1997.

HOOFNAGLE, J. H.; DUSHEIKO, G. M. Seroconversion from hepatitis B e antigen to antibody in chronic type B hepatitis. **Ann Intern Med.** v. 94, p. 744-748, 1981.

HOOFNAGLE, J. H.; SCHAFRITZ, D. A. Chronic type B hepatitis and the "healthy" HbsAg carrier state. **Hepatology.** v.7, p. 758-63, 1987.

HSU, Y. S.; CHIEN, R. N.; YEH, C. T. et al. Long-term outcome after spontaneous HbeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. **Hepatology.** v. 35, p. 1522-27, 2002.

IKEDA, T.; PIGNATELLI, M. Relationship of HLA protein display to activation of 1-5'synthetase in Hbe antigen or anti-Hbe positive chronic HBV infection. **Gut.** v. 27, p. 1498-501, 1986.

INTERNATIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON HEPATITIS B. 13-14 september, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). **Journal of Hepatology.** v. 38, p. 533-40, 2003

JACYNA, M. R.; THOMAS, J. C. Pathogenesis and treatment of chronic infection. In: ZUCKERMAN, A. j.; THOMAS, H. C. **Viral Hepatitis, Scientific Basis and Clinical Management.** Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.

JUNKER-NIEPMANN, M.; BARTENSCHLAGER, R. A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. **EMBO J.** v. 9 (10), p. 3389-96, 1990.

KAO, J. H.; WU, N., H. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. **J Hepatol.** v. 33, p. 998-1002, 2000.

KARASAWA, T.; AIZAWA, Y.; ZENIYA, M. et al. Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and Interferon-induced seroconversion. **J Medical Virol.** v. 45, p. 373-80, 1995.

KIFFER, C. R. V.; VIANA, G. B.; CHEINQUER H. Epidemiologia. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatite Virais.** São paulo: Atheneu, 2003.

KOSUGI, S.; IMAI, Y.; KURATA, Y. et al. Platelet-associated IgM elevated in patients with chronic hepatitis C contains no antiplatelet autoantibodies. **Liver.** v. 17, p. 230, 1997.

KRAMVIS, A.; KEW, M. The core promoter of hepatitis B virus. **J Viral Hepatitis.** v. 6, p. 415-27, 1999.

KRAMVIS, A.; WEITZMANN, W. K. B. A. KEW, C. M. Analysis of the complete genome of subgroup A hepatitis B virus isolates from South Africa. **Journal of General Virology.** v. 83, p. 835-39, 2002.

LAI, M. E.; SOLINAS, A.; MAZZOLENI, A. P. et al. The role of pre-core hepatitis B virus mutants on the long-term outcome of chronic hepatitis B virus hepatitis. A longitudinal study. **J Hepatol.** v. 20, p. 773-81, 1994.

LASKUS, T.; SLUSARCZYK, J. Autoimmune chronic active hepatitis developing after acute type B hepatitis. **Dig Dis Sci.** v. 34(8), p. 1294-97, 1989.

LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **N Engl J Med.** v. 337 (24), p. 1733-45, 1997.

LI, J.; BUCKWOLD, V. E.; HON, M. W. et al. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. **J Virol.** v. 73, p. 1239-44, 1999.

LIAW, Y. F.; CHU, C. M. Clinical and histological events preceding hepatitis B e antigen seroconversion in chronic type B hepatitis. **Gastroenterology.** v. 84, p. 216-19, 1983.

LIAW, Y. F.; TAI, S. T. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: A prospective study. **Hepatology.** v. 8, p. 493-96, 1988.

LIEN, J. M.; PETEU, D. J. Initiation and termination of duck hepatitis B virus DNA synthesis during virus maturation. **J Virol.** v. 61 (12), p. 3832-40, 1987.

LINDH, M.; HORAL, P.; DHILLON, A. P. et al. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in the HbeAg negative stage show more severe liver damage. **Hepatology.** v. 24, p. 494-501, 1996.

LINDH, M.; HANNOUN, C.; DHILLON, A. P. et al. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. **The Journal Infectious Disease**. v. 179, p. 775-82, 1998.

LINDH, M.; HORAL, P. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. **J Viral Hepat**. v. 7, p. 258-67, 2000.

LOK, A. S. F.; LAI, C. L. Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**. v. 92, p. 1839-43, 1987.

LOK, A. S. F.; LAI, C. L. A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen positive chinese children. **Hepatology**. v. 8, p. 1130-33, 1988.

LOK, A. S. F. Antiviral therapy of the asian patient with chronic hepatitis B. **Seminars in Liver Disease**. v. 13, p. 360-66, 1993.

LOK, A. S. F.; Hepatitis B infection pathogenesis and management. **J Hepatology**. 32 supplement I, p. 89-97, 2000.

LOK, A. S. F.; HEATHCOTE, E. J.; HOOFNAGLE, J. H. Management of hepatitis B: 2000 Summary of a workshop. **Gastroenterology**. v. 120, p. 1828-53, 2001.

LOK, A. S. F.; McMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology**. v. 45(2), p. 507-39, 2007.

LU, L. G.; ZENG, M. D.; MAO, Y. M. Relationship between clinical and pathologic findings in patients with chronic liver diseases. **World J Gastroenterol**. v. 9 (12), p. 2796-800, 2003.

LUNEL, F.; CADRANEL, J. F. Hepatitis virus infections in heart transplant recipients: epidemiology, natural history, characteristics, and impact on survival. **Gastroenterology**. v. 119, p. 1064-74, 2000.

LYNCH, H. T.; SRIVASTANSKUL, P.; PHORNTHUTKUL, K. et al. Familial hepatocellular carcinoma in a endemic area of Thailand. **Cancer Genet Cytogenet**. v. 11, p. 8-11, 1984.

MACHADO, M. C. C.; OLIVEIRA, A. C. História natural e manuseio do carcinoma hepatocelular no paciente com hepatite B. **BJID**. v. 10 (suppl I-august), p. 40-45, 2006.

MADDREY, W. C. Hepatitis B: an important public health issue. **J Med Virol**. v. 61, p. 362-66, 2000.

McMAHON, B. J.; ALWARD, W. L.; HALL, D. B. et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. **J Infect diseases**. v. 151, p. 599-603, 1985.

MAPA DA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA AMAZÔNIA OCIDENTAL. Disponível em < http://www.egler.net/mapa/subreg_amaz.htm > Acesso em: 15 jan. 2007.

MANESIS, E. K.; PAPTAEODORIDIS, G. V.; SEVASTIANOS, V. et al. Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative polymerase chain reaction assay in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection. **Am J Gastroenterol.** v. 98, p. 2261-67, 2003.

MARGOLIS, H. S.; ALTER, M. J. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. **Semin Liver Dis.** v. 11, p. 84-92, 1991.

MAYNARD, J. E. Hepatitis B: global importance and need for control. **Vaccine.** v. 8(supl I), p. 18-20, 1990.

MEDRONHO, R. A.; CARVALHO, D. M.; BLOCH, K. V. et al. **Epidemiologia.** Belo Horizonte: Atheneu, 2003.

MIYKAWA, Y.; OKAMOTO, H. The molecular basis of hepatitis B e antigen (HbeAg) negative infection. **J Virol Hepat.** v. 4, p. 1-8, 1997.

MILICH, D. R.; SCHODEL, F. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can effect Th cell phenotype. **J Virol.** v. 71 (3), p. 2192-201, 1997.

MILICH, D. R.; CHEN, M.; HUGHES, J. L. et al. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. **J Immunol.** v. 160, p. 2013-21, 1998.

MIRANDA, M. F. S. Propriedades gerais dos vírus. In: SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana.** São Paulo: Guanabara Koogan, 2000.

MOREIRA, S. D. R.; PIANOVSKI, M. A. D.; ALDENUCCI, M. et al. Alta prevalência de AgHBs e anti-HBcT em doadores de sangue da região sudoeste do Paraná. **GED.** v. 14, p. 173, 1995.

NAIR, S.; PERRILLO, P. R. Serum alanine aminotransferase flares during interferon treatment of chronic hepatitis B: is sustained clearance of HBV DNA dependent on levels of pretreatment viremia? **Hepatology.** v. 34 (5), p. 1021-26, 2001.

NASSAL, M. Hepatitis B virus morphogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 214, p. 297-337. 1996.

NASSAL, M. ; SCHALLER, H. Hepatitis B virus replication - an update. **J Viral Hepat.** v. 3 (5), p. 217-26, 1996.

NAUMANN, H.; SCHAEFER, S.; YOSHIDA, C. F. et al. Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brasil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. **J Gen Virol.** v. 74, p. 1627-32, 1993.

NIEC – The Italian Endoscopic Club for Study and Treatment of Esophageal Varices. Prediction of the first variceal hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. A prospective multicenter study. **N Engl J Méd.** v. 319, p. 983-89, 1988.

NORONHA, M. C. **Geoespaço. O Espaço Geográfico do Amazonas.** Manaus: Concorde, 2003.

NORDER, H.; HAMMAS, B.; LEE, S. D. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. **J Gen Virol.** v. 74, p. 1341-48, 1993.

NORDER, H.; COUROUCE, A. M. Complete genomes phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology.** v. 198 (2), p. 489-503, 1994.

NORDER, H.; COUROUCE, A. M. Genetic diversity of hepatitis B virus strain derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HbsAg subtypes. **Intervirology.** v. 47, p. 289-309, 2004.

OBERTI, F.; VALSESIA E.; PILETTI, C. et al. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. **Gastroenterology.** V.113(5), p. 1609-16, 1997.

OGATA, N.; ZANETTI, A. R. Infectivity and patho-genicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis b vírus that emerged in a vaccinated infant. **J Infect Dis.** v. 175, p. 511-23, 1997.

OKAMOTO, H.; IMAL, M.; TSUDA, F. et al. Point Mutation in the s gene of hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adry or adwr. **J Virol.** v. 61, p. 3030-34, 1987.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H. et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol.** v. 69, p. 2575-83, 1988.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; AKAHANE, Y. et al. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. **J Virol.** v. 68, p. 8102-10, 1994.

OKATH, F. A.; **East Afr Med J.** v. 67, p. 640-49, 1990.

OLIVEIRA, C. M. C. **Variabilidade genética do gene de superfície do vírus da hepatite B (VHB) em portadores naturais da Amazônia brasileira.** 2001. 112 p. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em genética e Evolução, do Centro de Ciências Biológicas e da saúde da universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

ORDINAS, A.; ESCOLAR, G.; CIRERA, I. et al. Existence of platelet-adhesion defect in patients with cirrhosis independent of hematocrit: studies under flow conditions. **Hepatology.** v. 24, p. 1137-42, 1996.

ORITO, E.; ICHIDA, T.; SAKUGAVA, H. et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. **Hepatology.** v. 34, p. 590-94, 2001.

PARK, S. Y.; KANG, K. H.; PARK, J. H. et al. Clinical efficacy of AST/ALT ratio and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in HBV infected patients without clinically evident liver cirrhosis. **Korean J Gastroenterol.** v. 43, p. 246-51, 2004.

PAPATHEORIDIS, G. V.; MANESIS, E.; HADZIYANNIS, S. J. The long-term out-come of interferon-alpha treated patients with HbeAg negative chronic hepatitis B. **J Hepatol.** v. 34, p. 306-13, 2001.

PAPATHEORIDIS, G. V.; HADZIYANNIS, S. J. Reviw article: current management of chronic hepatitis B. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 19, p. 25-37, 2004.

PAYNE, R. J. H.; NOWAK, N. A. The dynamics of hepatitis B virus infection. **Proc Natl Acad Sci.** v. 93, p. 6542-46, 1996.

PENNA, A.; ARTINI, M. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. **J Clin Invest.** v. 98, p. 1185-94, 1996.

PERDIZ, R. H. O.; PERDIZ, R. O.; FERREIRA, C. A. et al. Estudo da prevalência da infecção pelos vírus das hepatites B (VHB), C (VHC) e D (VHD) em gestantes. **GED.** v. 14, p. 148, 1995.

PERRILLO, R. P. Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease. **Gastroenterology.** v. 120, p. 1009-22, 2001.

PITON, A.; POYNARD, T.; IMBERT-BISMUT, F. et al. Factors associated with serum alanine transaminase activit in healthy subjects consencies for the definities of normal velecy for selection of blood donors and for patients with chronic hepatitis C. **Hepatology.** v. 27, p. 1213-19, 1988.

POITRINE, A.; CHOUSTERMAN, S. Lack of in vivo activation of the interferon system in HbsAg positive chronic active hepatitis. **Hepatology.** v. 5, p. 171-74, 1985.

POLLACK, J. R.; GANEM, D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. **J Virol.** v. 67 (6), p. 3554-63, 1993.

POLLACK, J. R.; GANEM, D. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. **J Virol.** v. 68 (9), p. 5579-87, 1994.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Evaluation of abnormal liver enzyme results in asymptomatic patients. **N Engl J Med.** v. 342, p. 1266-71, 2000.

REALDI, G.; ALBERTI, A. Seroconversion from hepatitis B e antigen to anti-HBe in chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology.** v. 79, p. 195-99, 1980.

REALDI, G.; FATTOVICH, G. ; HADZIYANNIS S. et al. Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: a multicenter study. **J Hepatol.** v. 21, p. 656-66, 1994.

RECHERMANN, B.; PASQUINELLI, C. Hepatitis B virus (HBV) sequence variation of cytotoxic T lymphocyte epitopes is not common in patients with chronic HBV infection. **J Clin Invest.** v. 96 (3), p. 1527-34, 1995.

REZENDE, R. E. F. **Relação da mutação pré-core G1896A do vírus da hepatite B (HBV) com genótipo viral, níveis séricos de HBV-DNA, expressão tecidual do antígeno core e agressão hepática em pacientes com hepatite B crônica.** 2002. Tese de doutoramento, Ribeirão Preto.

RIZZETO, M. VOLPES, R. Response of pré-core mutant chronic hepatitis B infection to lamivudine. **J Med Virol.** v. 61 (3), p. 398-402, 2000.

RODRIGUEZ-FRIAS, F.; JARDI, R.; BUTI, M. et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. **J Viral Hepat.** v. 13(5), v. 343-50, 2006.

RYDER, S. D. Guidelines of the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in adults. **Gut.** v. 52, p. 1-8, 2003.

SABLON, E. Hepatitis B virus: molecular biological aspects. In: COUTINHO, A. **Curso de Hepatologia Clínica.** Recife: Editora Universitária da UFPE, p. 157-66, 2003.

SAKAI, T.; SHIRAKI, K.; SUGIMOTO, K. et al. Hepatitis B genotypes in patients with acute hepatitis B virus infection. **J Hepatol.** v. 35, p. 829-30, 2001.

SANGER, F R. NICKLENS, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci.** v. 74: 5463-67.

SATTLER, F.; ROBINSON, W. S. Hepatitis b viral DNA molecules have cohesive ends. **J Virol.** v. 32 (1), p. 226-33, 1979.

SCAGLIONI, P. P.; MELEGARI, M.; WANDS, J. R. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. **Virology**. v. 233, p. 374-81, 1997.

SCHAEFER, S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. **Jornal of Viral Hepatitis**. v. 12, p. 111-124, 2004.

SCOTT, W. W.; DONOVEN, P. J.; SANDERS, R. C. The sonography of diffuse liver disease. **Semin Ultras**. v. 2, p. 219, 1981.

SCHALLER, H. ; FISCHER, M. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 168, p. 21-39, 1991.

SCHUMUNIS, G. A.; ZICKER, F. Risk of transfusion-transmitted infection disease in Central and South America. **Emerging Infect Dis**. v. 4, p. 1-12, 1998.

SHAPIRO, C. N. Epidemiology of hepatitis B. **Pediatr Infect Dis J**. v. 12, p. 433-37, 1993.

SHARMA, S. K.; CHWLA, N. S. Y. Hepatitis B vírus: inactive carriers. **Virology Journal**. v. 2, p. 82-86, 2005.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. Chronic hepatitis: general features, and autoimmune chronic disease. In:_____ **Disease of The Liver and Biliary System**. 11 ed. Oxford: Blackwell Science. p. 321-33, 2002.

SHINA, S.; FUJINO, H.; UTA, Y. et al. Relationship of HbsAg subtypes with HbeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I analysis of 1744 HbsAg carriers. **Am j Gastroenterol**. v. 86, p. 866-71, 1991.

SHIH, C. Funcional significance of naturally occurring hepatitis B virus variants. In: LAI & LOCARNINI. **International Medical Press**. p. 23-41, 2002.

SILVA, L. C. Aspectos clínicos e diagnósticos das hepatites por vírus e por outras causas. In:_____. **Hepatite Agudas e Crônicas**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

SILVEIRA, T. R.; DA FONSECA, J. C. Hepatitis B soroprevalence in Latin América. **Rev Panam Salud Publica**. v. (6): 378-83, 1999.

SOARES, J.; PASQUALOTTO, A. C.; ROSA, D. D. et al. Exames hematológicos. In:_____. **Métodos Diagnósticos**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

SOFTWARE OPEN OFFICE. Disponível em < <http://www.openoffice.org.br> > Acesso em: 15 dez. 2006.

SOFTWARE EPI-INFO. Disponível em < <http://www.cdc.gov/epiinfo> > Acesso em 5 de jan. 2007.

STERNECK, M.; GUNTHER, S.; GERLACH, J. et al. Hepatitis B virus sequence changes involving in liver transplant recipients with fulminant hepatitis. **J Hepatol.** v. 26, p. 754-64, 1997.

SU, C. W.; HUANG, Y. H.; HUO, T. I. et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. **Gastroenterology.** v. 130 (6), p. 1625-35, 2006.

SUMMERS, J.; SMOLEC J. M.; SNYDER, R. A virus similar to human hepatitis B associated with hepatitis and and hepatoma in woodchucks. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 75, p. 4533-37, 1978.

TAKEDA, A.; AKAHANE, Y.; SUZUKI, H. et al. Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HbeAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. **Hepatology.** v. 12, p. 1284-89, 1990.

TANAKA, S.; YOSHIBA, M. A common-source outbreak of fulminant hepatitis B in hemodialysis patients induced by pre-core mutant. **Kidney Int.** v. 48, p. 1972-78, 1995.

TANAKA, J. Hepatitis B epidemiology in Latin America. **Vaccine.** 18 suppl, v. 1 (2), p. 17-19, 2000.

TANG, J. R.; HSU, H. Y. Hepatitis surface antigenia at birth: a long-term follow up. **J Pediatr.** v. 133, p. 374-77, 1998.

TASSAPOULOS, N. C.; PAPAERVANGELOU, G. I. Natural history of acute hepatitis B surface antigens-positive hepatitis in Greek adults. **Gastroenterology.** v. 92, p. 1844-50, 1987.

TASSAPOULOS, N. C.; VOLPES, R. PASTORE, G. et al. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen negative hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine precore mutant group. **Hepatology.** v. 29, p. 889-96, 1999.

THAKUR, V.; GUPTAN, R. C.; KAZIM, S. N. et al. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. **J Gastroenterol Hepatol.** v. 17, p. 165-70, 2002.

THE INCIDENT INVESTIGATION TEAMS. Transmission of hepatitis B to patients from four infected surgeons without hepatitis B e antigen. **New Engl J Med.** v. 336, p. 178-84, 1997.

- THOMAS, H. C. The hepatitis B virus and the host response. **J Hepatol.** v. 11, p. 583-89, 1990.
- THUNG, S. N. & GERBER, M. A. **Sem Liver Disease.** p. 69, 1984.
- TOLENTINO, P.; DIANZANI, F. Decreased interferon response by lymphocytes from children with chronic hepatitis. **J Infect Dis.** v. 132, p. 459-61, 1985.
- TONETTO, P. A.; GONÇALVES, N. S. L.; SOUZA, D. L. et al. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite B (VHB) entre pacientes cronicamente infectados na região de Campinas-SP. **GED – Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva.** v. 24, p. 6, 2005.
- TRAUTWEIN, C.; SCHREM, H. Hepatitis B virus mutations in the pre S genome before and after liver transplantation. **Hepatology.** v. 24, p. 482-88, 1996.
- TSAI, S. L.; CHEN, P. J. Acute exacerbation of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and antigens. **J. Clin Invest.** v. 89, p. 87-96, p. 1992.
- VEZOZZO, D. C. P.; ROCHA, D. C.; CERRI, G. G. Fígado. In: CERRI, G. G.; ROCHA, D. C. **Ultra-sonografia Abdominal.** São Paulo: Sarvier, 1993.
- VIEIRA, S.; HOSSNE, W. S. **Metodologia Científica para a Área da Saúde.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.
- VILLENEUVE, J. P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **J Clin Virol.** v. 34 (suppl 1), p. 139-42, 2005.
- WAKITA, T.; KAKUMU, S.; SHIBATA. et al. Detection of pre-C and core region mutants of hepatitis B virus in chronic hepatitis B virus carriers. **J Clin Invest.** v. 88, p. 1793-801, 1991.
- WEBSTER, G. I. M.; REIGNAT, S. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamics and cellular immune mechanisms. **Hepatology.** v. 32, p. 1117-240, 2000.
- WEI, Y.; FOUREL G.; RENARD C-A. et al. **Hepatitis B viruses and hepatocellular carcinoma.** In: Viral hepatitis A to F: an update, American Association for the Study of Liver Diseases, Chicago, 1994.
- WEISSBERG, J. L. ANDRESS, L. L.; SMITH, C. L. et al. Survival in chronic hepatitis B. An analysis of 379 patients. **Ann Intern Med.** v. 101, p. 613-16, 1984.
- XU, Z.; JENSEN, G. Activation of hepatitis B virus S promoter by the viral large surface protein via induction of stress in the endoplasmic reticulum. **J Virol.** v 71 (10), p. 7387-92, 1997.

YE, F.; YUE, Y.; LI, S. et al. Presence of HbsAg, HbcAg, and HBVDNA in ovary and ovum of the patients with chronic hepatitis B virus infection. **Am J Obstet Gynecol.** V. 194(2), p. 387-92, 2006.

YOUNGER, H. M.; HADOKÉ, P. F.; DILLON, J. F. et al. Platelet function in cirrhosis and the role of humoral factors. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** v. 9, p. 989, 1997.

ZACHARAKIS, G. H.; KOSKINAS, J.; KOTSIYOU, S. et al. Natural history of chronic HBV infection: a cohort study with up to 12 years follow-up in North Greece (part of the Interreg I-II/EC-project). **J Med Virol.** v. 77, p. 173-79, 2005.

ZARSKI, J. P.; MARCELLIN, P.; LEROY, V. Characteristics of patients with chronic hepatitis B in France: predominant frequency of HBe antigen negative cases. **J Hepatol.** 2006.

ZHANG, S. J.; CHEN, Z. X.; JIANG, K. P. et al. Effect of seasonal variation on the clinical course of chronic hepatitis B. **J Gastroenterol.** v. 41, p. 1107-15, 2006.

ZHENG, M.; CAI, W.; WENG, H. et al. Determination of serum fibrosis indexes in patients with chronic hepatitis and its significance. **Chin Med J.** v. 116, p. 346-49, 2003.

ANEXO A – Questionário clínico-epidemiológico

I. Dados de identificação de um paciente portador de VHB

<i>Registro do paciente na pesquisa</i>	<i>Registro do paciente na FMTAM</i>
Nome	Fone de contato
Idade	Sexo
Natural	Procedência
Profissão	

II. Motivo da consulta

<i>Doença hepática crônica</i>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Doação de sangue 2. Após hepatite aguda 3. Durante check-up de rotina 4. Exames de pré-operatório ou durante o ato cirúrgico abdominal 5. Exame de pré-natal 6. Descompensação hepática 7. Comunicante de VHB

III. Evolução

<i>Tempo de doença hepática crônica</i>		
(1) 6m - 1ano	(2) 1 - 5anos	(3) > 5anos

ANEXO A – Questionário clínico-epidemiológico

IV. História clínica e exame físico

<i>Sintomas de insuficiência hepática crônica</i>	
1. Fadiga/Astenia	2. Febre
3. Anorexia	4. Dispepsia flatulenta
5. Dor abdominal	6. Irregularidade do fluxo menstrual
7. Cansaço nas pernas	8. Hemorragia de mucosas
9. Acolia fecal	10. Perda da libido
11. Fetor hepaticus	12. Artralgia
13. Assintomático	14. Encefalopatia
<i>Antecedentes pessoais preditivos de insuficiência hepática crônica</i>	
1. Icterícia	13. Mãe AgHBs positiva
2. Hepatite	14. Casos de hepatite na família
3. Uso de drogas	15. Óbito na família com VHB
4. Transfusão sanguínea	
5. Procedentes de área endêmica	
6. Homossexualidade	
7. DSTs	
8. Profissional da área de saúde	
9. Transplante de órgão	
10. Insuficiência Renal Crônica	
11. Cirurgia prévia	
12. Comunicante com o VHB	
<i>Sinais de insuficiência hepática crônica</i>	
1. Perda da massa muscular	2. Atrofia testicular
3. Febre	4. Distribuição dos pelos corporais
5. <i>Fetor hepaticus</i>	6. Aumento da glândula parótida
7. Icterícia	8. Ascite
9. hiperpigmentação da pele	10. Veias abdominais visíveis
11. Equimose/Púrpuras	12. Esplenomegalia
13. Aranhas vasculares	14. Hepatomegalia
15. Eritema palmar	16. Alterações neurológicas
17. Ginecomastia	18. Exame físico normal
19. Fígado subcostal	20. Edema de membros inferiores

ANEXO B – Exames complementares

I. Exames hematológicos

<i>Exames</i>	
1. TAP (Normal= -85%)	
2. Plaquetas (Normal= -150.000 p/mm3)	

II. Exames bioquímicos

<i>Exames</i>	
1. ALT (20 a 65 U/L)	2. Bilirrubina T (<1,1 mg%/dL)
3. AST (15 a 37 U/L)	4. Creatinina (<1,3 mg%/dL)
5. Albumina (> 3,5 mg%/dL)	6. Alfafetoproteína (<10 UI/mL)

Flare leve valores de ALT \geq 130 UI/L, moderado os valores de ALT \geq 260 UI/L e severo os valores de ALT \geq 520 UI/L (NAIR & PERRILLO, 2001).

III. Exames sorológicos

<i>Exames</i>	
1. AgHBs	2. Anti-HD Total
3. AgHBe	4. Anti-VHC
5. Anti-HBc Total	6. Anti-VIH
7. Anti-HBe	

IV. Exames biomoleculares

<i>Exames</i>
1. VHB DNA Qualitativo pela PCR
2. Amplificação do gene S do VHB
3. Amplificação e seqüenciamento do gene C do VHB

ANEXO B – Exames complementares

V. Exame histológico da biópsia hepática

<i>Sistema Metavir</i>	
Atividade necro-inflamatória	Fibrose
A0 = nenhuma atividade	F0 = nenhuma fibrose
A1= PMN ⁽¹⁾ leve e moderada de necrose lobular (LN) ⁽²⁾	F1 = fibrose porta sem septos
A2 = PMN moderada e severa LN	F2 = fibrose porta com septos
A3 = PMN severa	F3 = fibrose septal sem cirrose
	F4 = cirrose

⁽¹⁾ PMN = *Peace Meal Necrosis*;

⁽²⁾ LN= *Lobular Necrosis*

ANEXO B – Exames complementares

VI. Exame ultrassonográfico

<i>1. Sinais de insuficiência hepática crônica</i>		
a. Esteatose	b. Hepatite crônica	c. Cirrose hepática
1. Atenuação do feixe sonoro;	1. Fígado com textura heterogênea	1. Fígado contraído;
2. Hiperecogenicidade do parênquima hepático		2. Micronódulos;
		3. Superfície nodular
		4. Dificil visualização das estruturas vasculares IH
<i>2. Lesões associadas à IHC</i>		
a. Lesão focal	b. Sinais de colecistopatia	
1. Neoplasia hepática primária	1. Colecistite	
	2. Litíase	
<i>3. Alterações sugestivas de hipertensão portal</i>		
a. Sinais maiores *	b. Sinais menores **	
1. Circulação colateral	1. Ausência de variação respiratória dos vasos portais	
2. Veia porta com calibre $\geq 1,2$ cm	2. Esplenomegalia ≥ 12 cm	
3. Veia esplênica $\geq 0,9$ cm	3. Amputação de vasos portais IH.	
4. Veia mesentérica $\geq 0,9$ cm	4. Sem alterações vasculares menores	

* Sinais relativos aos efeitos vasculares da hipertensão portal

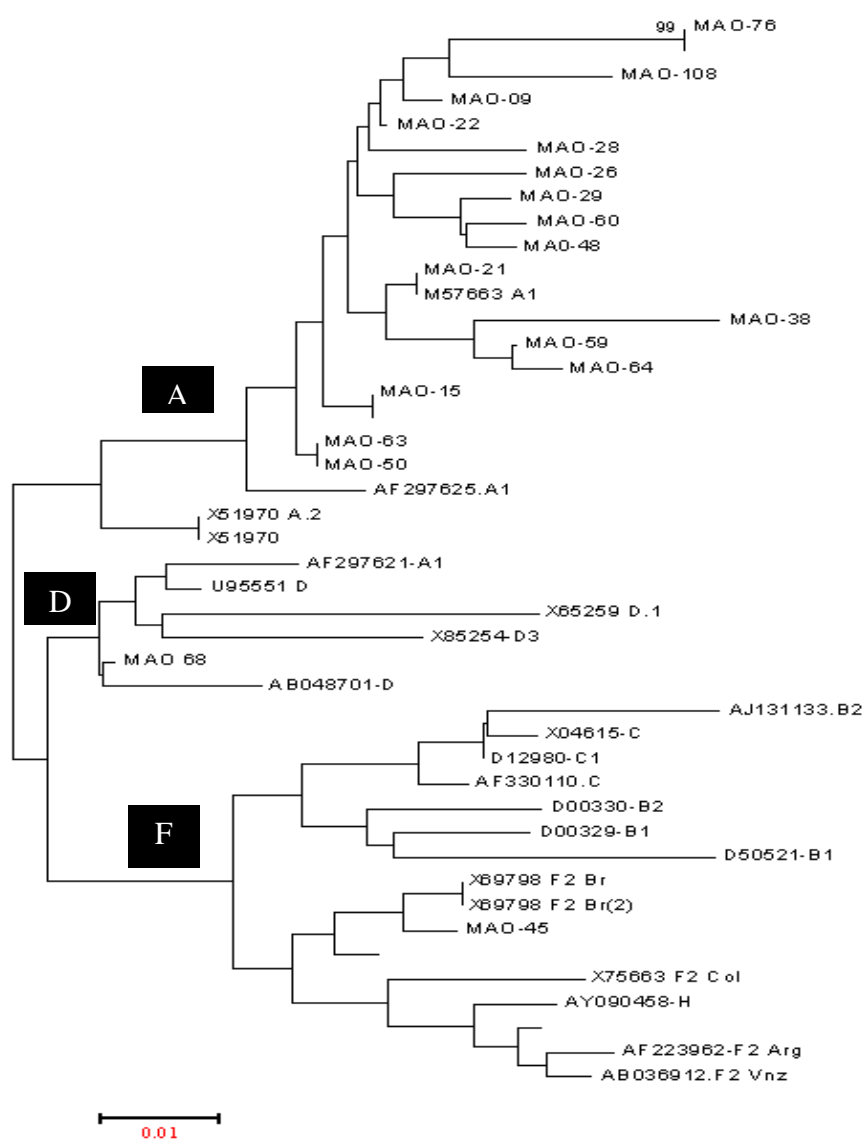
** Sinais relativos à fibrose hepática

ANEXO B – Exames complementares**VII. Exame de endoscopia**

<i>1. Endoscopia do TGI Superior</i>		
a. Pesquisa de varizes esofagogástricas na mucosa	Presente	Ausente
1. Cordões venosos dilatados no esôfago	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Cordões venosos dilatados no fundo do estômago	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. Pesquisa de manchas hematócísticas na mucosa	Presente	Ausente
1. Manchas vermelhas na superfície das varizes:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

ANEXO C – Análise filogenética do VHB

Dendrograma obtido pelo *neighbour-joinnig* para análise filogenética do VHB da população com hepatite e portador (N=22/55).



ANEXO D – Mutações pré-core e Core promoter

Região pré-core com mutações nas posição A₁₈₉₆.

Mutação pré-core G→A1896
X51970.A.2
TGGGGCATGGACATTGACCCCTTATAAAGAAATTTGGAGCTACTGTGGAGTTACTCTCGTTT

MAO-28A...
MAO-26T...A...
MAO-60T...A...
MAO-35T...
MAO-45T...
MAO-14T...A...G...T...
MAO-63
MAO-108G...A...
MAO-50
MAO-09A...
MAO-48T...A...
MAO-29T...T...
MAO-76T...A...
MAO-57T...A...
MAO-22A...
MAO-38C...A...A...
MAO-59C...A...
MAO-21A...
MAO-64C...A...
MAO 68 A...
MAO-15A...
MAO-42A...

Região do core promoter com mutações nas posição T₁₇₆₂ e A₁₇₆₄.

Mutação do core promoter A→T1762-G→A1764
X51970_A.2
TGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCCACCAGC

MAO-09T...
MAO-14C...C...
MAO-15T...
MAO-21T...
MAO-22T.A...T...
MAO-26T.A...T...
MAO-45C...
MAO-35
MAO-38T...
MAO-48 A...A...T...T...
MAO-50C...T.A...T...
MAO-59T...T...
MAO-60C...T.A...T...
MAO-64C...A...T...T...
MAO-63T...T...
MAO-68
MAO-76T...T...

ANEXO E – Primers utilizados no estudo

Seqüências de *primers* usados na população com hepatite e portador para a amplificação do gene S do genoma do VHB.

Primeira PCR				
P1 ⁽⁴⁾	S ⁽¹⁾	5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'	23nt	2823-2845
S1 ⁽³⁾	A ⁽²⁾	5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3'	20nt	685-704
Segunda PCR – Semi-nested				
P2 ⁽⁴⁾	S ⁽¹⁾	5'-TGC CTC TCA CAT CTC GTC AA-3'	20nt	102-121
S1 ⁽³⁾	A ⁽²⁾	5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3'	20nt	685-704

(1) senso

(2) anti-senso

(3) Oligonucleotídeo sintetizado por Oliveira (2001)

(4) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene S

Seqüências de *primers* usados na população do estudo para a amplificação do gene C do genoma do VHB.

Primeira PCR				
P3 ⁽¹⁾	S ⁽¹⁾	5'-GTG CAC TTC GCT TCA CCT CT-3'	23nt	1579
S3 ⁽³⁾	A ⁽²⁾	5'-CTA GAT CCC TGG ATG CTG GA-3'	20nt	2153
Segunda PCR - Nested-PCR				
P4 ⁽³⁾	S ⁽¹⁾	5'-ATG TCG ACA ACC GAC CTT GA-3'	20nt	1680
S4 ⁽³⁾	A ⁽²⁾	5'-GAT TGG TGA GGT GAA CAA TG-3'	20nt	2058

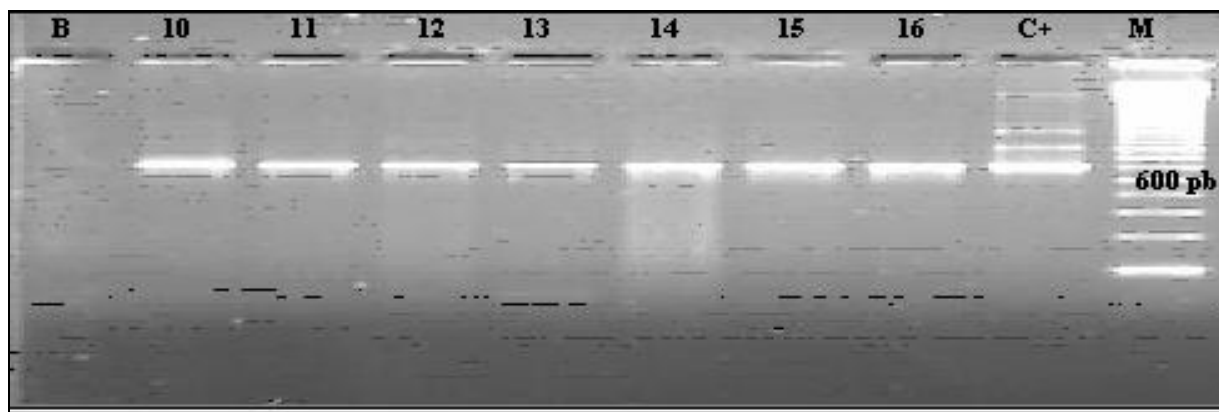
(1) senso

(2) anti-senso

(3) Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene C

ANEXO F – Fotografia da eletroforese em gel de agarose

Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto da segunda reação de *semi-nested* PCR da amplificação do gene S do VHB

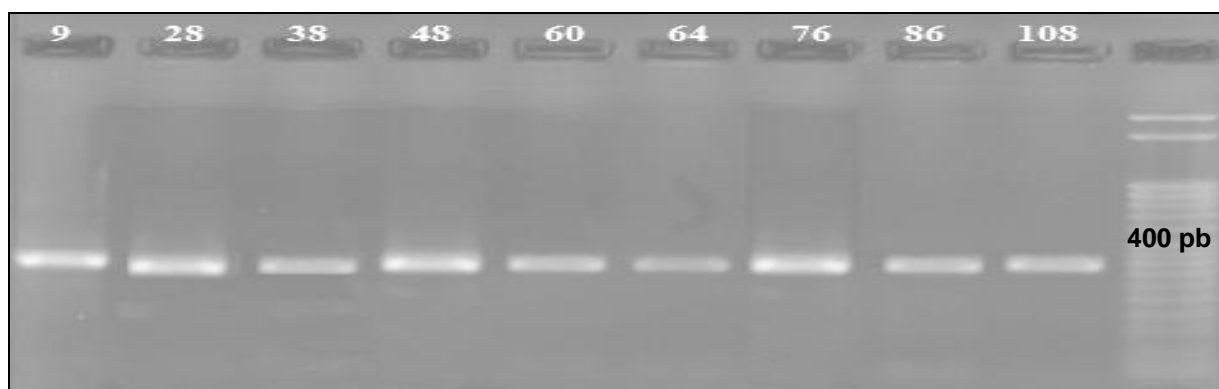


M. Marcador molecular da direita é o *Ladder* 100pb

B Controle de reagente para verificar pureza dos reagentes

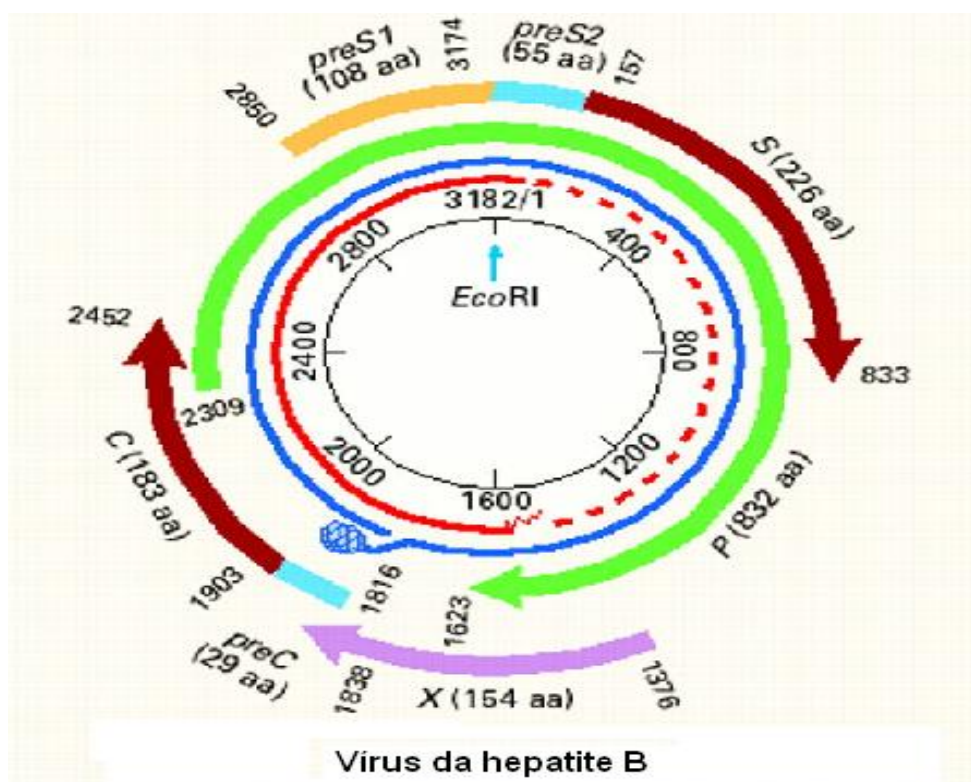
C. Controle positivo do fabricante com sensibilidade de 7×10^3 cópias por mL

Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do produto da segunda reação de *nested* PCR da amplificação do gene C do VHB.



ANEXO G – Diagrama do genoma do VHB adaptado de Wei et al. (1994)

No genoma do VHB existe uma proteína covalentemente ligada à extremidade 5' da fita de polaridade negativa e um oligorribonucleotídeo ligado na extremidade 5' da fita de polaridade positiva. Proximal à extremidade 5' de ambas as fitas observa-se uma pequena seqüência de 11 nucleotídeos que são diretamente repetidas e por isso são chamadas de *direct repeats* (DR1 e DR2), importantes para a iniciação da replicação. O seu genoma apresenta quatro fases de leitura abertas ou ORFs (*open reading frames*) designadas de pré-S/S, pré-C/C, P e X. Todos estes genes são codificados pela fita longa e possuem pelo menos uma região de sobreposição a outro gene (GERLICH et al., 1980; LIEN et al., 1987).



ANEXO H – Termo de consentimento livre e esclarecido

Registro no DEP da FMTAM: 2642/2003 - FMTAM

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA HEPATITE CRÔNICA B AgHBe NEGATIVO NA AMAZÔNIA OCIDENTAL BRASILEIRA.

Você está sendo convidado para participar de um estudo que irá avaliar as características da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB). Este estudo está sendo conduzido na FMTAM, localizada Avenida Pedro Teixeira número 25, Manaus AM, fone 3238 17 11 (Ramal 281), tendo como investigador responsável o médico **Flamir da Silva Victoria Fone 99820583, CRM AM 2166**. As autoridades de saúde exigem que você tome conhecimento do propósito e possíveis riscos desta investigação. Pedimos que você lesse este formulário de consentimento completamente e faça todas as perguntas que você possa ter antes de concordar em participar deste estudo.

PROPÓSITO(S) DO ESTUDO. Estudar o comportamento da função do fígado nos pacientes portadores crônicos de infecção pelo vírus da hepatite B, com AgHBs positivo, AgHBe negativo e anti-HBe positivo (marcadores do vírus da hepatite B). Determinar no sangue a presença e o tipo de vírus através do exame de DNA do VHB. Identificar e caracterizar os pacientes portadores da hepatite crônica B AgHBe negativo através do exame clínico e de exames complementares.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Se você for um voluntário para este estudo, será solicitado durante as consultas que responda a perguntas sobre seu histórico médico e será feito um exame físico. Serão coletadas amostras de sangue de uma de suas veias do braço para verificar a presença e o tipo de vírus da hepatite B em seu sangue. Os testes de sangue também irão também verificar como o seu fígado funcionando. Um teste de sangue irá também verificar se você está infectado com os vírus da hepatite C, Delta ou vírus da imunodeficiência humana (HIV). Se você estiver infectado pelos vírus da hepatite C, Delta ou HIV você não está apto a participar deste estudo. Você deverá também se submetido a um exame de ultrassom do fígado e uma endoscopia do seu estômago na FMTAM, a fim de avaliar o comprometido do seu fígado. Também será submetido a uma biópsia do fígado quando iniciar o estudo, onde será retirado um fragmento pequeno de tecido do fígado através de uma agulha, sem cortes, através da pele. Este fragmento será examinado para ver quanto o vírus da hepatite B lesou o seu fígado. A biópsia somente será realizada se você tiver parâmetros clínicos e laboratoriais prévios que permitam a realização do procedimento. Este procedimento será realizado pelo **Dr Flamir da Silva Victoria** no laboratório de Endoscopia da FMTAM.

ANEXO H – Termo de consentimento livre e esclarecido

RISCOS E DESCONFORTOS: Os testes a serem seguidos neste estudo poderão envolver riscos e ou desconfortos a você durante a sua realização. Os riscos envolvidos com a realização da **coleta de sangue** de uma veia incluem desconforto no local da inserção da agulha, possivelmente uma equimose e raramente infecção da pele. Há também uma rara possibilidade de desmaio. Os riscos envolvidos com a realização do ultrassom inexistem, contudo a endoscopia do seu estomago lhe trará algum desconforto durante e imediatamente após o procedimento, tipo dor na garganta e ânsia de vômitos. As reações alérgicas ao uso de drogas anestésicas durante o procedimento endoscópico são raras, mas pode ocorrer, motivo pelo qual o exame será realizado no laboratório de Endoscopia da FMTAM, sendo que o paciente somente será liberado após restabelecimento completo do exame. A realização da **biópsia do fígado** produz alguns desconfortos que inclui dor no lado direito do abdome superior (local da biópsia e do uso do anestésico), também poderá ocorrer equimose ou inchaço ao redor da inserção da agulha no lado direito do abdome superior. Você será orientado a permanecer na sala do procedimento durante duas horas, será realizado o controle periódico dos seus sinais vitais para avaliar sangramentos. Após as duas horas você será avaliado pelo **Dr Flamir da Silva Victoria** para verificar se poderá ser liberado para a sua residência. Caso seja liberado receberá orientações sobre dieta e repouso domiciliar durante as próximas 24 horas. **NOVOS ACHADOS:** Você será informado sobre qualquer nova informação obtida durante o curso do estudo, que possa afetar a evolução da sua doença. **CONFIDENCIALIDADE:** Você tem o direito à privacidade. Todas as informações obtidas neste estudo que possam ser identificadas com o seu nome permanecerão de forma confidencial tanto quanto possível. Seu nome não será revelado em nenhum relatório ou publicação resultante deste estudo sem seu expresso consentimento. Os indivíduos envolvidos neste estudo e em seus cuidados médicos, monitores qualificados e autoridades de saúde podem inspecionar e copiar seus registros médicos quando apropriados e necessários. Se você for uma mulher e engravidar durante o período do estudo, poderá ser necessário o exame de sangue de seu bebê após o parto, se adequado. **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:** Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir por não participar deste estudo. Uma vez que você decida por participar neste estudo, você pode retirar seu consentimento e finalizar sua participação a qualquer momento. Se você decidir por não participar ou se retirar a sua participação do estudo, você não será punido ou perderá quaisquer benefícios aos quais você tem direito. Isto não irá afetar seus cuidados médicos futuros. **DESCONTINUAÇÃO DO ESTUDO:** Seu médico, o responsável pelo estudo ou seu representante legal poderá finalizar a sua participação neste estudo a qualquer momento sem seu consentimento. Você será retirado do estudo caso você deixe de seguir as orientações para a participação no estudo. **COMPENSAÇÃO DE DANOS:** Se você vier a sofrer qualquer dano físico como resultado direto do estudo, você receberá todos os cuidados médicos providos pela Instituição na qual o estudo se realizou. A reparação de eventuais danos está disponível a você sem quaisquer compensações financeiras decorrentes do dano.

Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

ANEXO H – Termo de consentimento livre e esclarecido

DUVIDAS: Se você tiver alguma dúvida sobre a pesquisa ou seus direitos como paciente de pesquisa durante ou após o estudo, você pode contatar o Dr Flamir da Silva Victoria no telefone 99820583. Você pode também contatar o presidente do Comitê de Ética da FMTAM Dr Luis Carlos Lima Ferreira no telefone 3238-1711 (ramal 241). **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:** Eu li neste formulário de consentimento. Tive a oportunidade de fazer todas as perguntas referentes a este estudo e minhas dúvidas foram respondidas. Os riscos e benefícios deste estudo foram explicados a mim. Concordo livremente em participar deste estudo. Eu receberei uma cópia deste acordo.

Paciente _____

Responsável _____

Sexo do paciente: Masculino () Feminino (); Idade: ____anos;

RG (do paciente ou do responsável legal); _____

CPF _____

Impressão dactiloscópica

Endereço _____

Cidade _____ Estado _____

CEP _____ Fone _____

Assinatura do Paciente ou Representante Legal

Investigador Responsável: Flamir da Silva Victoria CREMAM 2166; CPF 694 300 10
Endereço do Serviço Av Pedro Teixeira, 25; Cidade Manaus; Estado Amazonas;
CEP 69 040 000 Telefone: (0XX) 92 3238 17 11 Ramal 281