



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E DOS POLIMORFISMOS NOS
GENES DE CITOCINAS (TNF- α , INF- γ , TGF- β 1 e IL-10) COM A
APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE B CRÔNICA**

SIMONE REGINA SOUZA DA SILVA CONDE

Belém-Pará

2010

SIMONE REGINA SOUZA DA SILVA CONDE

**CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E DOS POLIMORFISMOS NOS
GENES DE CITOCINAS (TNF- α , INF- γ , TGF- β 1 e IL-10) COM A
APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE B CRÔNICA**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto.

BELÉM, PARÁ

2010

Conde, Simone Regina Souza da Silva

Correlação dos níveis séricos e dos polimorfismos nos genes de citocinas (TNF- α , INF- γ , TGF- β 1 e IL-10) com a apresentação clínica da hepatite B crônica. Belém-Pará, 2010, p. 167.

Tese de Doutorado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários.

1. Hepatite B crônica
2. polimorfismos nos genes de citocinas
3. nível sérico de citocinas

SIMONE REGINA SOUZA DA SILVA CONDE

**CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E DOS POLIMORFISMOS NOS
GENES DE CITOCINAS (TNF- α , INF- γ , TGF- β 1 e IL-10) COM A
APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE B CRÔNICA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes
Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em
Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Profª. Dra. Maristela Gomes da Cunha
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dra. Lizomar de Jesus Maués Pereira Moia
Instituto de Ciências da Saúde, UFPA

Prof. Dr. Hugo Cheinquer
Faculdade de Medicina, UFRS

Profª. Dra. Samia Demachki (suplente)
Instituto de Ciências da Saúde, UFPA

Belém, 2010

Ao meu esposo Cláudio e filhos Lucas e Maria Victória,
minhas fontes de energia e amor;

Aos meus alunos, pelo meu
encantamento com a docência;

Aos meus pacientes,
razão principal de todos
os esforços de aprimoramento.

“O único homem que se educa é aquele que aprendeu como aprender, que aprendeu como se adaptar e mudar, que se capacitou que nenhum conhecimento é seguro, nem definitivo.”

Carl Rogers

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará, maior universidade federal brasileira, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal desde a graduação e que tenho a honra de fazer parte de seu corpo docente;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários, pelo esmero contínuo em formar e aperfeiçoar profissionais com senso crítico e com capacidade de transformação da realidade amazônica;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, pelo intenso aprendizado, pela correção minuciosa da tese e pela condução ética e vibrante deste desafio de permitir que uma profissional clínica de formação pudesse adentrar também no campo da pesquisa laboratorial e molecular;

Aos professores da banca de qualificação, Prof. Dr. Ricardo Ishak, Profa. Dra. Maristela Cunha, Profa. Dra. Lizomar Moia e Profa. Dra. Samia Demachki, pelas importantes contribuições oferecidas no planejamento e execução desta pesquisa;

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas, fundamentais na concretização deste trabalho pelo companheirismo desinteressado, auxílio decisivo e amizade pura;

Aos amigos Rosimar Martins, Renata Hermes, Felipe Freitas, Vânia Azevedo e Lucinda Souza, por toda generosidade e conhecimentos compartilhados em pesquisa laboratorial, sem os quais esta etapa de vida teria pedras intransponíveis;

Aos amigos do Grupo de Fígado da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, por todo o aprendizado e crescimento pessoal e profissional que

experimentei nos longos anos de convívio e por auxiliarem na seleção dos pacientes pesquisados;

Aos pacientes do ambulatório de doenças hepáticas, pela confiança e estímulo contínuo de aperfeiçoamento e por terem prontamente concordado em participarem da pesquisa;

À minha família de nascimento, papai Silva, mamãe Clarice e manos Júnior, Consuelo, Mônica, Sylvia e Paulo, pelo amor incondicional compartilhado, por me darem a solidez dos valores necessários à luz dos ensinamentos do Mestre Jesus e por sonharem junto comigo;

Aos meus sogros-pais, Cláudio (*in memoriam*) e Maria Thereza, por me aceitarem como filha e pelo grandioso auxílio na criação de meus filhos;

Aos meus rebentos, Lucas e Maria Victória, fontes de inspiração e amor, por entenderem as dificuldades desta etapa que lhes roubava tempo de convívio e, mesmo assim, continuavam torcendo e estimulando à finalização desta pesquisa;

A Deus, pela vida, pela família, pelos amigos, pela saúde e por Ter colocado em meu caminho, aquele que é meu porto seguro, meu pai, meu irmão, meu conselheiro, meu amante e meu amor, Cláudio. Saiba que você é o raio de sol que aquece meu coração, a brisa suave que alivia minhas dores, a água cristalina que mata minha sede de viver e o ar puro que me permite sentir o encantamento da vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	17
1.2 CARACTERÍSTICAS DO VHB.....	18
1.3 EPIDEMIOLOGIA DO VHB.....	30
1.3.1 Vias de Transmissão.....	31
1.3.2 Soroepidemiologia.....	32
1.3.3 Epidemiologia Molecular.....	39
1.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA E HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VHB.....	42
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO VHB.....	51
1.5.1 Hepatite B Aguda.....	51
1.5.2 Hepatite B Crônica.....	53
1.6 PATOLOGIA E IMUNOPATOGENIA DA INFECÇÃO PELO VHB...	55
1.6.1 Patologia da Hepatite B.....	55
1.6.2 Imunopatogenia da Infecção pelo VHB.....	57
1.6.2.1 Características e funções do TNF- α	66
1.6.2.2 Características e funções do INF- γ	67
1.6.2.3 Características e funções do TGF- β 1.....	68
1.6.2.4 Características e funções da IL-10.....	69
1.7 OBJETIVOS.....	71
1.7.1 Objetivo Geral.....	71
1.7.2 Objetivos Específicos.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	73

2.2	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	74
2.2.1	Exames hematológicos e bioquímicos.....	74
2.2.2	Sorologia e Dosagem Quantitativa do DNA do VHB.....	74
2.2.3	Genotipagem do DNA do VHB.....	75
2.2.4	Dosagem dos níveis séricos do TNF-α, do INF- γ, do TGF-β1 e Il-10.....	76
2.2.5	Avaliação dos polimorfismos nos genes do TNF-α, do INF- γ, do TGF-β1 e Il-10.....	77
2.2.5.1	Extração do DNA.....	77
2.2.5.2	Polimorfismo do TNF- α	78
2.2.5.3	Polimorfismo do INF- γ	79
2.2.5.4	Polimorfismo do TGF- β 1.....	80
2.2.5.5	Polimorfismo da IL-10.....	81
2.3	PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	82
2.4	PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS.....	83
2.5	PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	83
3	RESULTADOS.....	85
3.1	AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA.....	87
3.2	ANÁLISES MOLECULARES.....	90
3.3	RESULTADOS DOS NÍVEIS SÉRICOS E DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS.....	93
3.3.1	TNF-α.....	93
3.3.2	Interferon-γ.....	98
3.3.3	TGF-β1.....	104
3.3.4	IL-10.....	110
4	DISCUSSÃO.....	117
5	CONCLUSÕES.....	133
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
	ANEXOS.....	161

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visualização das partículas virais do VHB no soro de paciente infectado pela microscopia eletrônica	20
Figura 2 -	Representação esquemática da partícula viral completa do VHB	20
Figura 3 -	Representação esquemática do genoma do VHB	21
Figura 4 -	Árvore filogenética do genoma completo do VHB	23
Figura 5 -	Representação esquemática do ciclo replicativo do VHB	26
Figura 6 -	Distribuição geográfica da infecção crônica pelo VHB	33
Figura 7 -	Distribuição da prevalência do HBsAg no Brasil	35
Figura 8 -	Taxa de detecção de hepatite B, segundo região e ano, Brasil 1999 a 2007	35
Figura 9 -	Distribuição geográfica dos genótipos do VHB	40
Figura 10 -	Distribuição dos genótipos do VHB mais prevalentes no Brasil .	41
Figura 11 -	Representação esquemática da história natural da infecção crônica pelo VHB	44
Figura 12 -	Padrão sorológico da hepatite B aguda com evolução para cura .	53
Figura 13 -	Padrão sorológico da hepatite B crônica	55
Figura 14 -	Representação esquemática da fase aguda da hepatite B	58
Figura 15 -	Representação esquemática dos mecanismos citolíticos e não-citolíticos dos LT CD8+ contra o VHB	60

Figura 16 -	Representação esquemática da resposta imune à infecção pelo VHB	61
Figura 17 -	Representação esquemática do gene do TNF- α	67
Figura 18 -	Representação esquemática do gene do INF- γ	68
Figura 19 -	Representação esquemática do gene do TGF- β 1	69
Figura 20 -	Representação esquemática do gene da IL-10	70
Figura 21 -	Sinais e sintomas prevalentes entre os pacientes portadores de hepatite B crônica, grupo B	88
Figura 22 -	Associação da carga viral do VHB entre os grupos A e B e entre os HBeAg positivos e negativos	91
Figura 23 -	Nível sérico médio do TNF- α nos portadores de hepatite B, grupo A, grupo B e grupo controle	96
Figura 24 -	Correlação dos níveis séricos do TNF- α com ALT (a), AST (b), GGT (c) e da carga viral do VHB (d)	97
Figura 25 -	Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo do TNF- α -308G/A, segundo a classificação histopatológica METAVIR.	97
Figura 26 -	Associação dos níveis séricos do TNF- α com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR	98
Figura 27 -	Nível sérico médio do INF- γ nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle	101

Figura 28 -	Correlação dos níveis séricos do INF- γ com ALT (a), AST (b), GGT (c) e da carga viral do VHB (d)	102
Figura 29 -	Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo do INF- γ +874T/A, segundo a classificação histopatológica METAVIR	103
Figura 30 -	Associação dos níveis séricos do INF- γ com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR	104
Figura 31 -	Nível sérico médio do TGF- β 1 nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle	106
Figura 32 -	Correlação dos níveis séricos do TGF- β 1 com ALT (a), AST (b), GGT (c) e DNA-VHB (d)	108
Figura 33 -	Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo do TGF- β 1 -509C/T, segundo a classificação histopatológica METAVIR	109
Figura 34 -	Associação dos níveis séricos do TGF- β 1 com a atividade e fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR	109
Figura 35 -	Nível sérico médio da IL-10 nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e controle	112
Figura 36 -	Correlação dos níveis séricos da IL-10 com ALT (a), AST (b), GGT (c) e carga viral do VHB (d)	113
Figura 37 -	Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo da IL-10 -1082A/G, segundo a classificação histopatológica METAVIR	114

Figura 38 - Associação dos níveis séricos da IL-10 com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genótipos, subgenótipos e subtipos do VHB e a frequência das mutações pré-core e da região basal promotora do core	29
Tabela 2 -	Relação dos polimorfismos nos genes das citocinas estudadas	82
Tabela 3 -	Distribuição por sexo e média de idade dos pacientes portadores de hepatite B crônica e do grupo controle	85
Tabela 4 -	Características demográficas dos grupos A e B dos pacientes portadores de hepatite B crônica	86
Tabela 5 -	Ocorrência de etilismo e possíveis rotas de aquisição do VHB nos grupos A e B	87
Tabela 6 -	Resultados de testes hematológicos, bioquímicos e sorológicos dos pacientes portadores de hepatite B crônica dos grupos A e B ..	89
Tabela 7 -	Distribuição dos resultados histopatológicos, de acordo com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação METAVIR	90
Tabela 8 -	Genótipos, subgenótipos e subtipos do DNA-VHB de 40 amostras de pacientes portadores de hepatite B crônica, distribuídos nos grupos A e B	92
Tabela 9 -	Associação dos genótipos e subgenótipos do DNA-VHB com a apresentação clínica da hepatite B crônica	93
Tabela 10 -	Associação dos genótipos do DNA-VHB com a positividade do HBeAg e nível sérico do DNA-VHB	93

Tabela 11 - Distribuição do polimorfismo TNF- α -308G/A nos grupos de portadores de hepatite B e grupo controle	94
Tabela 12 - Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, da carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos do TNF- α -308G/A	95
Tabela 13 - Associação do nível sérico do TNF- α com os polimorfismos do TNF- α -308G/A	96
Tabela 14 - Distribuição do polimorfismo INF- γ +874T/A no grupo de portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle	99
Tabela 15 - Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, da carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos do INF- γ +874T/A	100
Tabela 16 - Associação do nível sérico do INF- γ com os polimorfismos do INF- γ +874T/A	102
Tabela 17 - Distribuição do polimorfismo do gene TGF- β 1 -509C/T no grupo de portadores de hepatite B, grupo A, grupo B e grupo controle	105
Tabela 18 - Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos do TGF- β 1 -509C/T	106
Tabela 19 - Associação do nível sérico do TGF- β 1 com os polimorfismos do	

TGF- β 1 -509C/T	107
Tabela 20 - Distribuição do polimorfismo do gene IL-10 -1082A/G nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle	110
Tabela 21 - Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT , da carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos IL-10 -1082A/G	111
Tabela 22 - Associação do nível sérico da IL-10 com os polimorfismos do IL-10 -1082A/G	112
Tabela 23 - Associação dos genótipos combinados de citocinas com a apresentação clínica da hepatite B crônica	116

RESUMO

A hepatite B crônica apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, resultante de diversos fatores, tais como o padrão de secreção e polimorfismo nos genes de citocinas. Este trabalho objetiva correlacionar os polimorfismos TNF- α -308G/A, INF- γ +874A/T, TGF- β 1 -509C/T e IL-10 -1081A/G e os níveis séricos destas citocinas com a apresentação clínica da hepatite B. Foram selecionados 53 casos consecutivos de hepatite B, sendo divididos em grupo A (portador inativo= 30) e B (hepatite crônica/cirrose= 23). Como grupo controle, selecionaram-se 100 indivíduos com anti-HBc e anti-HBs positivos. Os níveis séricos das citocinas foram determinados por ensaios imunoenzimáticos, tipo ELISA (eBioscience, Inc. Califórnia, San Diego, USA). A amplificação gênica das citocinas se realizou pela PCR e a análise histopatológica obedeceu à classificação METAVIR. Identificou-se maior prevalência do genótipo TNF- α -308AG (43,3% vs. 14,4%) no grupo B do que nos controles e a presença do alelo A se correlacionou com risco de infecção crônica pelo VHB (OR= 2,6). Os níveis séricos de INF- γ e de IL-10 foram maiores ($p < 0,001$) nos controles do que os demais grupos e, inversamente, as concentrações plasmáticas de TGF- β 1 foram menores no grupo controle ($p < 0,01$). Observou-se, na histopatologia hepática, que atividade inflamatória ≥ 2 se correlacionou com maiores níveis de TNF- α e de INF- γ ($p < 0,05$), assim como a fibrose ≥ 2 com maiores níveis de INF- γ ($p < 0,01$). Na população pesquisada, menores níveis séricos de INF- γ e de IL-10 e maiores de TGF- β 1 estiveram associados com a hepatite B crônica, bem como a presença do alelo A no gene TNF- α -308 aumentou em 2,6 o risco de cronificação.

Palavras-chave: hepatite B crônica, polimorfismos nos genes de citocinas, nível sérico de citocinas.

ABSTRACT

Chronic hepatitis B has a wide spectrum of clinical manifestations resulting from various factors, such as the pattern of secretion and polymorphism in cytokine genes. This work aims to correlate the TNF- α -308G/A, INF- γ +874A/T, TGF- β 1 -509C/T e IL-10 -1081A/G polymorphisms and serum levels of these cytokines with the clinical presentation of hepatitis B. It was selected 53 consecutive cases of hepatitis B divided into group A (inactive carrier= 30) and B (chronic hepatitis / cirrhosis= 23). As a control, we selected 100 individuals anti-HBc and anti-HBs positives. Serum levels of cytokines were determined by enzyme immunoassays (eBioscience, Inc. California, San Diego, USA). The gene amplification of cytokines was carried out by PCR and histopathological analysis followed by METAVIR classification. It was identified that genotype TNF- α -308GA was more prevalent among B group than controls and that presence of A allele increased the risk for chronic disease (OR= 2,6). The serum levels of INF- γ and IL-10 were higher ($p < 0,001$) in controls than others groups A and B and the TGF- β 1 levels were lower ($p < 0,01$) in controls. It was noted that inflammatory activity ≥ 2 correlated with higher levels of TNF- α and IFN- γ ($p < 0.01$) and fibrosis ≥ 2 with higher levels of INF- γ ($p < 0.01$). In the studied population, lower INF- γ and IL-10 levels and higher TGF- β 1 level were associated with chronic hepatitis B, and that the presence TNF- α -308 A allele increased in 2,6 the risk for chronic disease .

Keywords: chronic hepatitis B, polymorphisms in cytokine genes, serum levels of cytokines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A hepatite B continua sendo um grande problema de saúde pública, visto a existência de evidência sorológica de infecção passada em cerca de dois bilhões de indivíduos no mundo, sendo que destes, 350 milhões permanecem cronicamente infectados (WHO, 2007). A possibilidade de evolução para insuficiência hepatocelular e carcinoma hepatocelular (CHC), torna esta doença responsável por 500.000 a um milhão de mortes por ano e é uma das principais causas de transplante hepático (Lok & McMahon, 2007).

A descoberta do *Vírus da hepatite B* (VHB) reporta a década de 1940, quando baseado nas diferenças epidemiológicas observadas nos casos de hepatite infecciosa, MacCallum (1947) introduziu os termos hepatite A, para os casos de infecção com repercussão epidêmica e hepatite B, para os casos de transmissão através do soro, termos estes, adotados então pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

O passo principal para a descoberta do VHB foi dado por Blumberg *et al.* (1965), ao detectar um novo antígeno presente no soro de um aborígine australiano, então denominado antígeno Austrália, que reagia ao entrar em contato com o soro de hemofílicos transfundidos e de pacientes leucêmicos. Coube a Prince (1968) e a Okochi & Murakami (1968), a associação definitiva entre o antígeno Austrália e a hepatite B.

Dane *et al.* (1970) e Almeida *et al.* (1971) conseguiram caracterizar de maneira mais completa a partícula do VHB, sendo então denominada partícula de Dane. Posteriormente, foi ampliado os conhecimentos sobre novos antígenos virais e identificado o seu material genômico (Magnius & Espmark, 1972; Kaplan *et al.*, 1973; Robinson, 1975).

Após a introdução das técnicas de biologia molecular na década de 1980, como a reação de hibridização e a reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), além de técnicas de sequenciamento genômico, tornaram-se possíveis estudos moleculares detalhados do genoma de DNA do VHB (Seeger & Mason, 2000).

Uma vez infectado pelo VHB, o indivíduo pode apresentar um quadro agudo auto-limitado ou evoluir para cronificação, inclusive indo a óbito pelas complicações graves da doença hepática crônica. As diferentes manifestações clínicas resultam da interação de fatores inerentes ao hospedeiro, ao vírus e as condições ambientais concomitantes, com destaque para a idade e o padrão imunológico do indivíduo infectado (Pungpapong *et al.*, 2007).

1.2 CARACTERÍSTICAS DO VHB

O VHB pertence à família *Hepadnaviridae*, do gênero *Orthohepadnavirus*, no qual se encontram outros membros que compartilham características estruturais e funcionais. Neste gênero estão incluídos os vírus da marmota, *Woodchuck hepatitis virus* – WHV; do esquilo, *Ground Squirrel hepatitis virus* – GSHV; do esquilo do ártico, *Artic ground squirrel hepatitis virus* – ASGHV; e do macaco, *Woolly Monkey hepatitis B virus* – WMHBV. Outros vírus classificados neste gênero encontrados em espécies de macacos, de orangotangos e de gorilas são muito semelhantes ao vírus de humanos, mas filogeneticamente distintos, levando a hipótese de que o VHB tenha surgido após a infecção humana a partir do contato interespecie com outros primatas não humanos (Ganem & Schneider, 2001; Mason *et al.*, 2005).

O outro gênero da família *Hepadnaviridae*, o *Avihepadnavirus*, é composto por vírus hepatotrópicos encontrados em aves, destacando-se os descritos no pato, *Duck hepatitis B virus* – DHBV; na garça, *Heron hepatitis B virus* – HHBV; e no ganso, *Snow goose hepatitis virus* – SGHV (Ganem & Schneider, 2001; Mason *et al.*, 2005).

As características comuns aos hepadnavírus incluem o forte tropismo por células hepáticas, a presença de partículas virais envelopadas, a formação do genoma por DNA de fita dupla incompleta e a utilização da via transcriptase reversa na replicação (Ganem & Schneider, 2001).

No soro do paciente infectado, por meio da microscopia eletrônica, é possível a visualização de dois tipos distintos de partículas virais (Figura 1): uma de 42 nm de tamanho, a partícula viral completa, e outra composta apenas de proteínas do envelope viral, podendo ser de formato circular ou filamentosos (Ganem & Prince, 2004).

A partícula viral completa do VHB (Figura 2) apresenta 40 a 42 nm de diâmetro e é formada por um envelope lipoprotéico contendo em seu interior uma estrutura icosaédrica dita core ou nucleocapsídeo, a qual alberga o material genômico viral (Ganem & Prince, 2004). O genoma viral é composto por 3.200 nucleotídeos (nt), de conformação circular, de fita dupla, parcialmente completa e aberta (Figura 3). O DNA do VHB possui quatro regiões de transcrição (*open reading frame* – ORF): região S, região C, região X e região P; responsáveis pela codificação das principais proteínas virais (Ganem & Prince, 2004). Ainda compondo o genoma, na porção terminal de cada fita, há duas curtas regiões repetitivas de 11 nt, a DR1 e DR2, que servem de iniciadores da síntese do DNA.

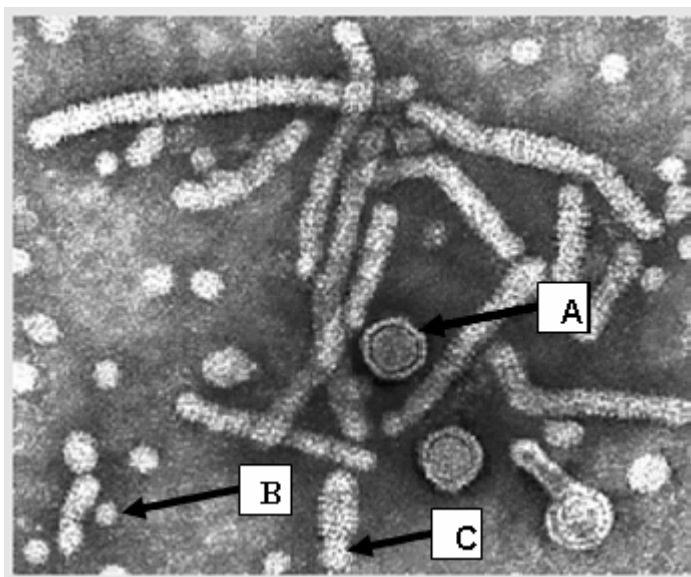


Figura 1 - Visualização das partículas do VHB no soro de paciente infectado pela microscopia eletrônica. (A): partícula viral completa; (B): aglomerados protéicos esféricos; (C): aglomerados protéicos filamentosos do VHB (Fonte: National Center for Infectious Diseases, 2007, adaptado).

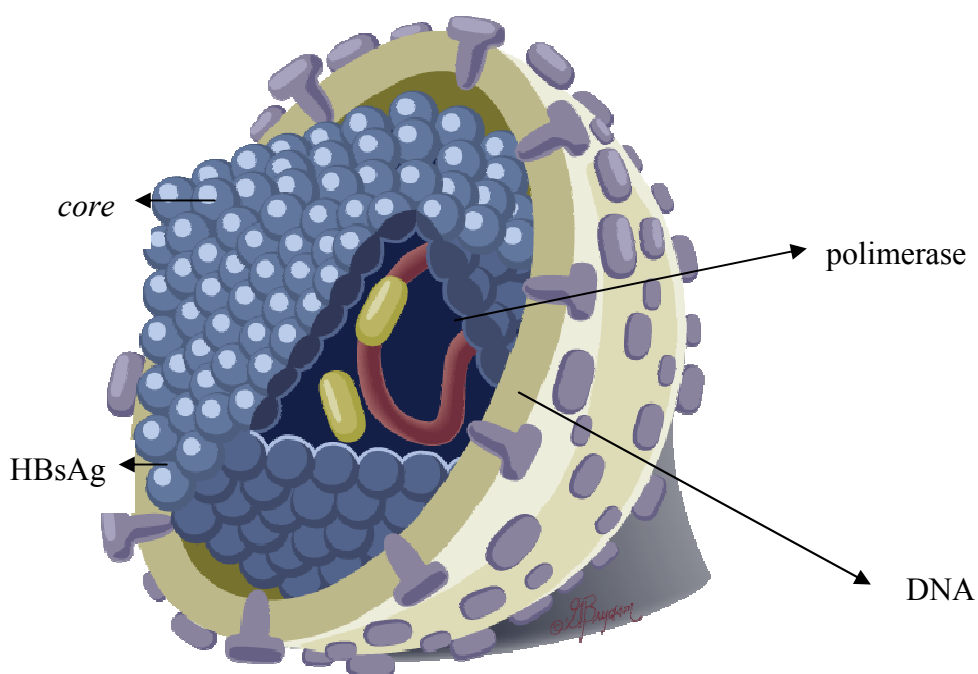


Figura 2 - Representação esquemática da partícula viral completa do VHB (Fonte: Torontoliver.ca).

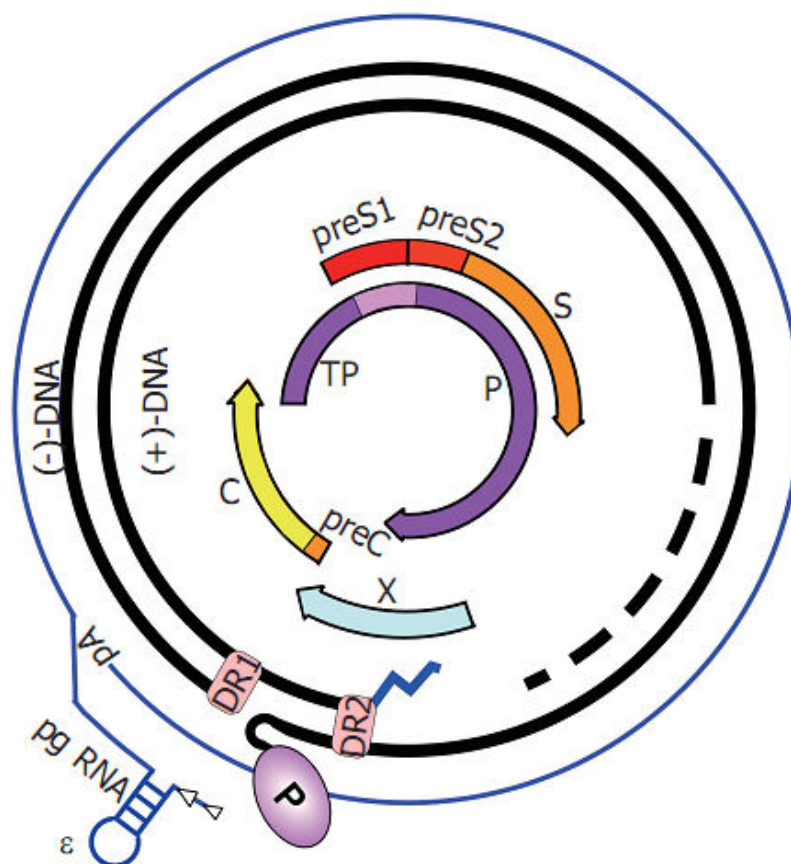


Figura 3 - Representação esquemática do genoma do VHB (Fonte: Beck & Nassal, 2007).

A região S é dividida em região pré-S1, pré-S2 e S, as quais codificam as proteínas do envelope viral. A transcrição simultânea das regiões pré-S1, pré-S2 e S produz a proteína maior, composta de 389 a 400 aminoácidos (aa), conhecida como proteína L (*large*). A segunda proteína do envelope, a M (*middle*), é formada pela transcrição das regiões pré-S2 e S, consistindo em 281 aa. Por fim, a terceira proteína, a qual é a mais abundante e a menor entre elas, é a S (*small*), também conhecida como HBsAg, surge pela transcrição da região S, contendo 226 aa (Bruss, 2007). O envelope viral ao envolver a região do *core* forma a partícula viral completa, caso contrário são

liberadas do hepatócito apenas como partículas subvirais de conformação esférica ou filamentar.

As glicoproteínas do envelope exercem as funções de ligação do vírus aos receptores presentes nas células do hospedeiro, de cobertura da região do nucleocapsídeo e participam da liberação das partículas virais pela célula infectada (Bruss & Ganem, 1991; Klingmuller & Schaeffer, 1993; Bock *et al.*, 1999; Seeger & Mason, 2000).

A proteína HBsAg exibe grande heterogeneidade antigênica que permite classificar o VHB em nove subtipos de acordo com a combinação de três alelos (Couroucé *et al.*, 1978). Todos possuem em comum o determinante *a* e cada um dos outros determinantes mutuamente exclusivos *d/y* e *w/r*, identificando-se os sorotipos *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+* e *adrq-*.

Na atualidade, prefere-se classificar o VHB em genótipos, os quais diferem entre si através de mudanças, de no mínimo 8 %, nas seqüências nucleotídicas da região S e se associa com os subtipos anteriormente descritos, como se observa na Tabela 1 (Locarnini, 2004; Schaefer, 2007). Reconhece-se hoje oito genótipos diferentes (Figura 4), denominados de A a H, além de numerosos subgenótipos, quando ocorrem no mesmo genótipo diferenças no genoma acima de 4 % (Schaefer, 2007).

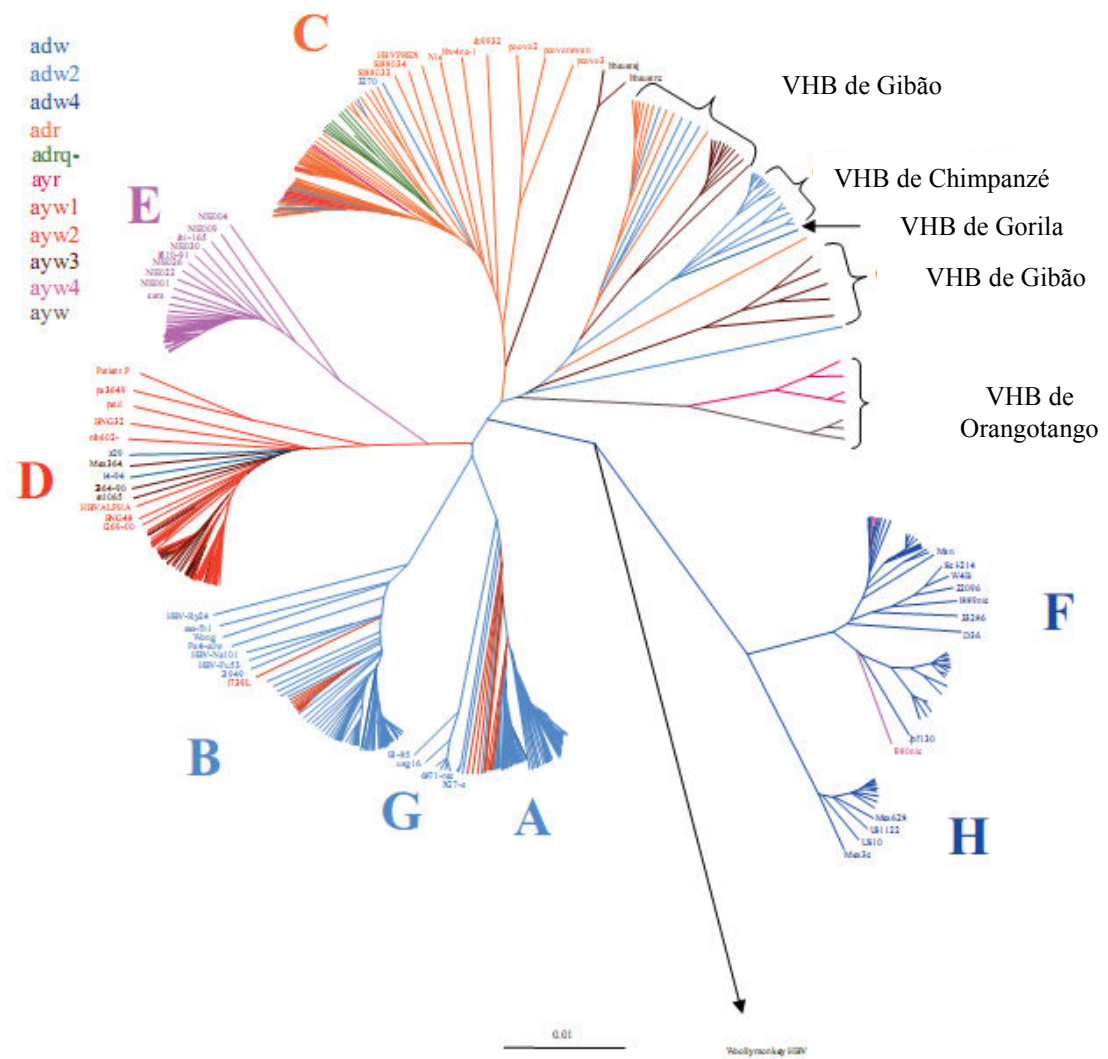


Figura 4 – Árvore filogenética do genoma completo do VHB (Fonte: Norder *et al.*, 2004, adaptado).

O genótipo A é dividido em cinco subgenótipos, A1(Aa), A2(Ae), A3, A4 e A5, assim como os genótipos B, C e D. Os subgenótipos do F são F1 a F4, e ainda não foram descritas subclassificações para os genótipos E, G e H (Schaefer, 2007).

A região C compreende as áreas pré-core e core, as quais codificam a proteína C do VHB, conhecida como HBcAg, composta de 183 a 185 aa (21 kD), de função estrutural,

essencial para replicação viral e principal formadora da região do *core* ou nucleocapsídeo. A montagem de partículas subvirais do *core* requer a formação de dímeros, estabilizados por duas pontes de dissulfeto, que ao final conferem uma conformação icosaédrica a esta estrutura. A principal função do nucleocapsídeo é a proteção do material genômico viral, além de oferecer alvos para a interação com componentes do envelope (Seeger & Mason, 2000; Bruss, 2007).

Outro antígeno associado ao *core* viral é o HBeAg, encontrado em forma solúvel no plasma de indivíduos infectados. A proteína E, de 16 kD, é derivada da proteólise de um precursor com regiões comuns ao HBeAg. Sua função não é totalmente conhecida, admitindo-se participar da cobertura do DNA viral pelo nucleocapsídeo, contudo sabe-se que a mesma não é essencial para a replicação viral (Ganem & Prince, 2004).

A região X codifica o antígeno X, HBxAg, cuja função não está totalmente conhecida. Acredita-se que ela modula o sinal de transdução da célula hospedeira, afetando direta ou indiretamente a expressão de genes virais e do hospedeiro, além de estabilizar os RNA virais (Zoulim *et al.*, 1994; Seeger & Mason, 2000).

A tradução da região P, a maior do genoma viral, ocupando cerca de 80% deste, permite o aparecimento de dois domínios principais. O domínio amino-terminal, chamado de proteína terminal, tendo papel crítico no empacotamento do RNA pré-genômico (pgRNA) e serve como iniciador da transcrição da fita negativa do DNA viral. O segundo domínio, o carboxi-terminal, permite a transcrição da transcriptase reversa, a qual funciona à semelhança da polimerase dos retrovírus (Seeger & Mason, 2000; Ganem & Prince, 2004).

O conhecimento da replicação do VHB se apóia em estudos de transinfecção do DNA viral clonado em linhagens de células e a partir de modelos animais infectados com outros hepadnavirus relacionados, sendo que ainda permanecem várias etapas não totalmente esclarecidas (Figura 5).

Sabe-se que há ligação das partículas virais por meio das proteínas do envelope com receptores celulares nos hepatócitos. Uma vez internalizados, há o transporte do nucleocapsídeo em direção ao núcleo celular, através dos microtúbulos presentes no citoplasma. Ao alcançar a membrana nuclear, ocorre a ligação da região C-terminal da proteína do *core* com receptores de importação α presentes no complexo de poros nucleares (CPN), ativando um sinal de localização intra-nuclear. Posteriormente, há a interação com os receptores β , facilitando a passagem pelo CPN. Neste momento acontece a retenção das proteínas do nucleocapsídeo e a permissão da entrada do DNA viral (Kann *et al.*, 2007).

Neste ambiente, o DNA genômico viral é convertido para uma forma circular fechada, covalente, dita cccDNA, cujo processo de formação não está esclarecido. Além do cccDNA, o genoma viral pode se integrar aos cromossomos hospedeiros durante o curso da infecção, de forma rearranjada ou não. Sugere-se que nesta forma há transcrição preferencial de RNA mensageiro (mRNA) do HBsAg, enquanto que as regiões do *core* e da polimerase são interrompidas (Seeger & Mason, 2000).

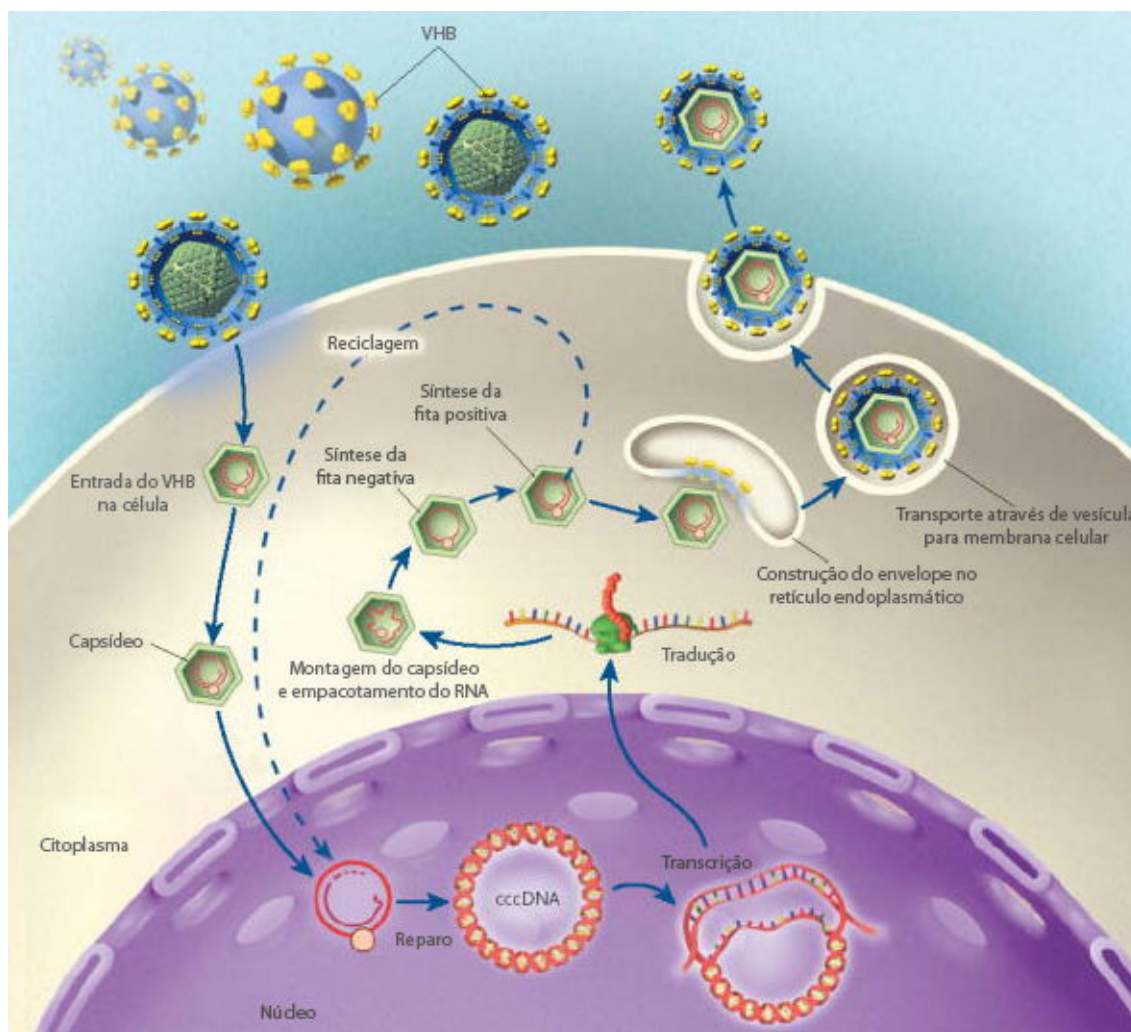


Figura 5 - Representação esquemática do ciclo replicativo do VHB (Fonte: Ganem & Prince, 2004, adaptado).

O cccDNA formado serve de molde para a transcrição de RNA genômicos ou sub-genômicos, através da RNA polimerase II do hospedeiro. Cortes (*splices*) no RNA são regulados pelo elemento regulatório postranscricional. Além das várias fitas de RNA, forma-se também o pgRNA, que compreende o tamanho inteiro do genoma mais uma região redundante terminal de 120 nt, que contém a segunda cópia da região DR1 e o sinal ϵ com uma cauda de poliadenilato (Beck & Nassal, 2007). Todos os mRNA são transportados para o citoplasma, onde são traduzidos em proteínas do

envelope, do *core* e a polimerase, além dos peptídeos X e pré-*core* (Ganem & Prince, 2004; Beck & Nassal, 2007).

A seguir, o nucleocapsídeo assume seu formato icosaédrico e encapsula uma única molécula de RNA genômico, por ação da sinalização emitida quando ocorre a ligação do sinal ϵ com a proteína P (sinal de cobertura). Uma vez dentro do nucleocapsídeo, inicia-se a transcrição reversa. O primeiro nt formado é covalentemente ligado a proteína P, estendendo-se até completar a fita negativa, seguida da síntese parcial da fita positiva do DNA viral (Beck & Nassal, 2007).

Algumas partículas do *core* são transportadas ao núcleo da célula hospedeira, mantendo a concentração estável de cccDNA, enquanto que outras seguem em direção ao retículo endoplasmático, onde recebem as lipoproteínas do envelope viral e, via complexo de Golgi, são levadas à membrana celular e exportada da célula hospedeira (Ganem & Prince, 2004).

O VHB é considerado um vírus oncogênico, sendo realizados vários estudos para o entendimento molecular de tal fenômeno. Até o presente, acredita-se em um efeito multifatorial, incluindo mecanismos diretos e indiretos que agem sinergicamente. A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira ocorre precocemente e tem sido demonstrada uma série de efeitos em genes relacionados à oncogênese. Nos casos de infecção crônica, a inflamação permanente resulta no acúmulo de mutações críticas no genoma do hospedeiro. Adicionalmente, proteínas regulatórias dos ativadores da pré-S2 e da HBxAg poderiam funcionar como promotores de proteínas tumorais (Lupberger & Hildt, 2007)

Durante o processo de replicação, poderão ocorrer mutações no DNA viral, na ordem estimada de 1,4 a $3,2 \times 10^{-5}$ substituições nucleotídicas por sítio por ano,

o que é cerca de 10 vezes maior que qualquer outro vírus de DNA (Locarnini, 2004). Sabe-se, também, que a meia-vida da concentração do VHB no soro é de um a dois dias e a carga viral aproximada é de 10^{11} cópias/mL. Portanto, a alta carga viral e a taxa de substituição de subpopulações do VHB, acompanhadas da baixa fidelidade durante a replicação viral, influenciam na geração de mutantes e quase-espécies do VHB (Locarnini, 2004).

Dentre as mutações estudadas, destaca-se a mutação dos genes da região basal promotora do *core*, da pré-*core* e do *core*. Em todas, há redução ou bloqueio da síntese da proteína “e”, fenotipicamente identificada em pacientes HBeAg negativos, mas com replicação viral contínua.

Na região pré-*core*, a parada da síntese da proteína “e” ocorre por substituição de G (guanina) por A (adenina) na posição 1896 nt, e mais raramente no nt 1899, modificando o códon TGG, específico para o aminoácido triptofano, para um códon de parada precoce TAG (Carman *et al.*, 1989; Brunetto *et al.*, 1990 e Karasawa *et al.*, 1997).

Sabe-se, que no momento da replicação deste mutante, há necessidade da existência da timina (T) na posição 1858 nt, favorecendo a estabilidade do processo (Frias *et al.*, 1995 & Chan *et al.*, 1999). Conseqüentemente, a mutação que previne a síntese do HBeAg é rara nos genótipos A, que contém a citosina (C) no 1858 nt e comum nos B, C, e D, os quais contém a T nesta posição (Tabela 1).

Tabela 1 – Genótipos, subgenótipos e subtipos do VHB e a frequência das mutações pré-*core* e da região basal promotora do *core*.

Genótipos	Subtipos	Sub-genótipos	Mutação pré-<i>core</i> (A1898G)	Mutação da região basal promotora do <i>core</i> (A1765T, G1764A).
A	adw2, ayw1	A1 – A5	incomum (C1858)	Comum
B	adw2, ayw1	B1 – B5	comum (T1858)	comum incomum B1 e B2
C	adw2, adr, ayr	C1 – C5	comum	Comum
D	ayw2, ayw3	D1 – D5	comum	Comum
E	ayw4	não descrito	não descrita	não descrita
F	adw, ayw	F1 – F4	incomum (C1858)	não descrita
G	adw2	não descrito	não descrita	não descrita
H	Adw	não descrito	não descrita	não descrita

Fonte: Locarnnini, 2004; Schaefer, 2007.

A mutação pré-*core* também acontece pela substituição de T para C no nt 2, de G para A no nt 3, da deleção de G nos nt 83 e 86, da inserção de T entre os nt 26 e 27 e de TT entre os nt 12 e 13 (Okamoto *et al.*, 1990).

Pesquisadores japoneses demonstraram o papel das mutações no promotor pré-*core/core* do tipo T-1762, A-1764 (Takahashi *et al.*, 1995), T-1653 e C/A/G-1753 (Takahashi *et al.*, 1999) na redução dos níveis e não no desaparecimento do HBeAg.

Outra mutação de interesse é a presença do gene pré-S/S, intimamente relacionada com estudos de falência da imunoprofilaxia pós-natal contra o VHB (Hsu *et al.*, 1997; Ngui *et al.*, 1998), onde as crianças com cepas dominantes HBsAg negativas não responderiam ao uso de vacinas e imunoglobulinas específicas contra o VHB. A análise do sequenciamento desses casos revelou a presença da adenosina no lugar da guanossina no aa 145 da região determinante *a* da proteína de superfície.

As mutações descritas no gene *P* relacionam-se fortemente com a resistência a terapia antiviral, onde o ponto e o tipo de mutação variam de acordo com o análogo nucleosídeo ou nucleotídeo usado (Angus *et al.*, 2003).

Finalmente, a mutação da região X pode envolver elementos regulatórios que controlam a replicação, como a região basal do promotor do *core* e a Enhance II. Segundo Uchida *et al.* (1997), há dois tipos principais de mutação: deleção do nt 8, levando a supressão da replicação e da expressão do HBV-DNA, e substituição de T por C (nt 1655), de T por A (nt 1764) e de A por G (1766), relacionados aos casos de hepatite fulminante.

Os diferentes genótipos e subgenótipos se correlacionam com os subtipos descritos e apresentam frequências variadas dos tipos de mutações, como demonstrado na Tabela 1 (Locarnini, 2004; Schaefer, 2007).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DO VHB

1.3.1 Vias de Transmissão

O VHB é transmitido mediante a exposição percutânea e das membranas mucosas ao sangue e fluidos corpóreos contaminados, entre eles o soro, sêmen e saliva.

A presença do HBeAg no soro se correlaciona com altas cargas virais, facilitando a transmissibilidade do vírus. Reconhece-se como vias de transmissão a percutânea/parenteral, a sexual, a vertical e a horizontal (Alter, 2003).

A via percutânea está relacionada à transfusão de hemoderivados contaminados, equipamentos de saúde como agulhas e outros aparelhos invasivos, uso de drogas intravenosas (UDIV), acupuntura, *piercings* e tatuagens, assim como qualquer outro instrumento perfuro-cortante. Esta exposição é facilitada pela capacidade do VHB em se manter em natureza por cerca de sete dias em objetos inanimados, explicando inclusive surtos da infecção após acupuntura e colocação de *piercing* ou tatuagens (Mast *et al.*, 2006).

Em pessoas adultas, o maior risco da infecção se dá através de atividade sexual de alto risco. Entre estas atividades destacam-se o homossexualismo masculino, o elevado número de parceiros, os anos de atividade sexual e a história prévia de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST). Parceiros sexuais de pacientes com infecção aguda ou crônica pelo VHB, também são suscetíveis (Alter, 2003).

O risco da transmissão perinatal do VHB tem sido bem estabelecido e está fortemente associado com a presença do HBeAg. Mães portadoras do HBeAg positivo tem de 40 a 70% de chance de transmitir o vírus para seu concepto, enquanto nas mães HBeAg negativas a chance de transmissão é de 10 a 40% (Fattovich *et al.*, 2008). Mesmo as crianças que não foram infectadas no período neonatal, permanecem com o risco de adquirir o VHB na primeira infância, podendo chegar até 40% de infectados em 5 anos (Doganci, 2005).

Contatos não sexuais de pacientes cronicamente infectados pelo VHB, também podem adquirir a infecção, através da convivência prolongada, como o

ambiente familiar. Esta via de transmissão pessoa-a-pessoa se utiliza de uso comum de material de higiene pessoal como escovas de dentes, lâminas de barbear ou contato acidental de soluções de continuidade cutâneas e mucosas com fluidos orgânicos do indivíduo contaminado (Alter, 2003). Em determinados locais da Amazônia, parece ser esta a via de maior importância epidemiológica, resultante das condições sócio-econômicas e por hábitos culturais peculiares da região (Lobato *et al.*, 2006).

1.3.2 Soroepidemiologia

A OMS informa que existem no mundo mais de 2 bilhões de pessoas que entraram em contato com o VHB, permanecendo 350 a 400 milhões cronicamente infectados. Destes, 15 a 40% evoluirão para a descompensação, estimando que a cada ano, 500 mil a um milhão de óbitos estejam relacionados com esta infecção, seja por complicações da cirrose, seja por CHC (Alter, 2003).

De acordo com a prevalência do HBsAg na população (Figura 6), é possível identificar áreas de baixa (< 2%), intermediária (2 a 7 %) e de alta prevalência (> 8%), reconhecendo as regiões da Ásia, do sul do Pacífico, da África sub-saariana, as populações indígenas residentes no Ártico, na Austrália, na Nova Zelândia e as populações da América do Sul e do Oriente Médio como as mais endêmicas (Lok & McMahon, 2007).

O padrão endêmico da hepatite B é diretamente relacionado com a forma e com a idade do contágio (Alter, 2003). Nas regiões de alta endemicidade, a infecção se faz em tenra idade, através das vias verticais e perinatais; enquanto nas intermediárias, o contato é mais tardio, através da via horizontal, sexual e parenteral por UDIV,

ocupacional e nosocomial. Em áreas de baixa prevalência do HBsAg, a transmissão ocorre eminentemente pela atividade sexual e UDIV.

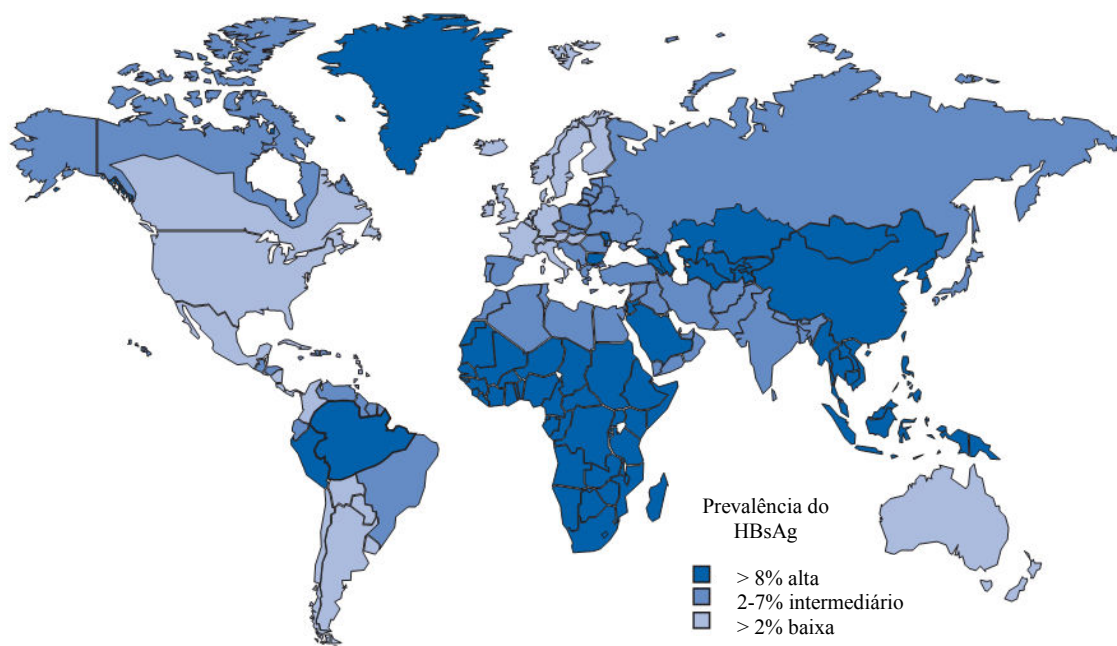


Figura 6 – Distribuição geográfica da infecção crônica pelo VHB (Fonte: CDC, 2008, adaptado).

Na América Latina, áreas de alta prevalência são encontradas na região nordeste e na Bacia Amazônica, contrastando com áreas de baixa endemicidade como a região sudoeste e locais de clima temperado (Paraná & Almeida, 2005). Estas diferenças podem estar correlacionadas as condições sócio-econômicas e culturais, as intensas correntes migratórias, além da susceptibilidade genética (Santos *et al.*, 1995).

Em 1990, Fay *et al.* publicaram uma pesquisa epidemiológica a partir de triagem em bancos de sangue, confirmando que o padrão de endemicidade do VHB é bastante variável: baixo em países de clima temperado da América do Sul, no México e algumas ilhas do Caribe; intermediário no Brasil, países dos Andes, parte da América

Central e do Caribe; e alta na Bacia Amazônica, compreendendo parte do território do Brasil, do Peru, da Venezuela e da Colômbia.

Estudo de Silveira *et al.* (1999), analisando a soroprevalência do anti-HBc total em seis países da América Latina, em indivíduos entre um a 40 anos de idade, encontraram uma prevalência de 21,4% na República Dominicana, 7,9% no Brasil, 3,2% na Venezuela, 2,1 na Argentina, 1,4% no México e 0,6% no Chile.

No Brasil, a prevalência da infecção pelo VHB também tem distribuição heterogênea, aumentando no sentido sul-norte (Figura 7). A Amazônia legal é reconhecidamente uma região de maior endemicidade, observando-se, também, distintas áreas, com predomínio da infecção no lado ocidental. Outros bolsões da infecção são encontrados nas cidades de Cascavel (PR), Chapecó (SC) e Francisco Beltrão (PR), na região Sul, além dos municípios de Carai (MG) e Cachoeira do Itapemirim (ES), no Sudeste (Souto, 1999).

A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS), revela que em 2007 houve notificação de 6,14 / 100.000 de casos novos de hepatite B (Brasil, 2009), com maior número procedente da região Sul (12,89 / 100.000 habitantes) e menor no Nordeste (Figura 8). Mediante a avaliação histórica, desde 1999, observa-se claramente um aumento na incidência da hepatite B até o ano 2005, explicado pelo grande esforço das autoridades de saúde de todos os níveis de se aproximar cada vez mais da verdadeira realidade, permitindo assim melhorar as políticas de prevenção e controle. Por outro lado, desde então, as taxas vêm decaindo, talvez por reflexo das medidas preventivas, não esquecendo a possibilidade de subnotificações.

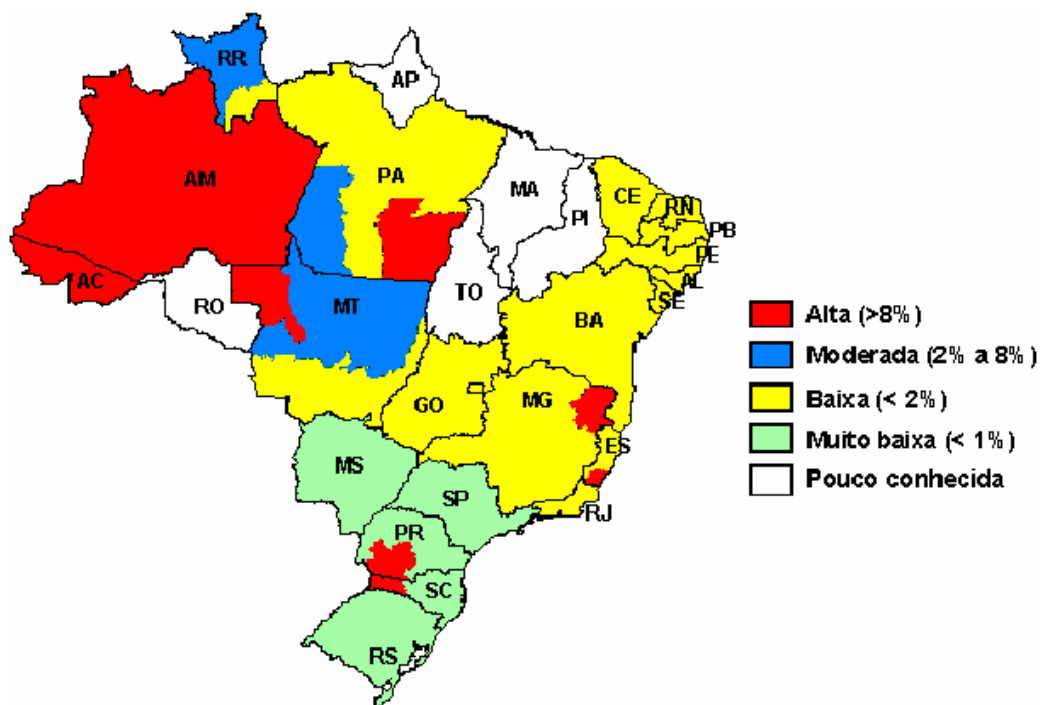


Figura 7 – Distribuição da prevalência do HBsAg no Brasil (Fonte: Souto, 1999, adaptado).

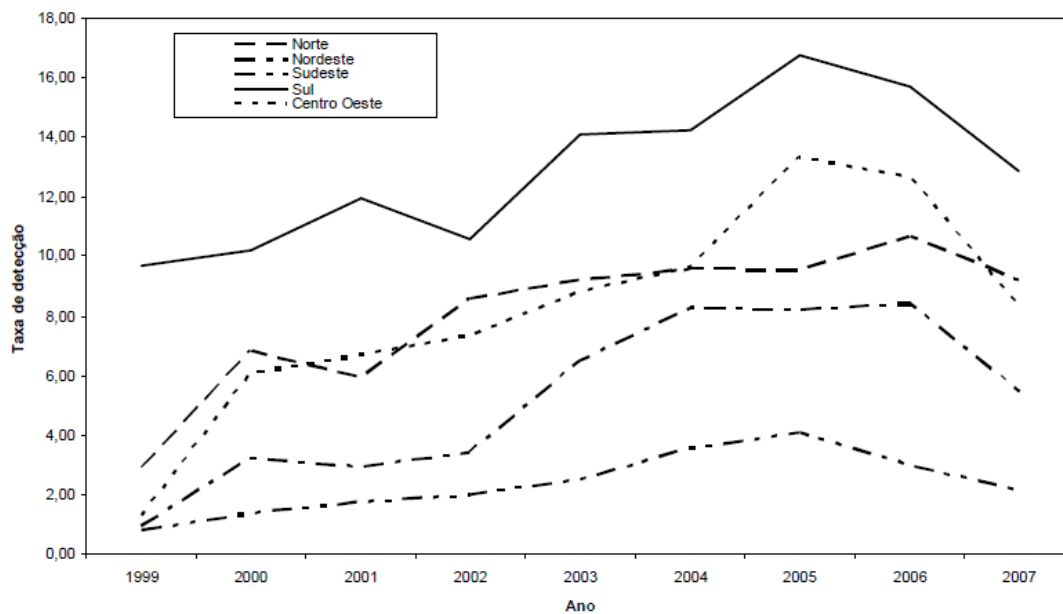


Figura 8 – Taxa de detecção de hepatite B, segundo região e ano, Brasil 1999 a 2007 (Fonte: Brasil, 2009).

Na Amazônia, a hepatite B está mais concentrada no lado ocidental, sendo a transmissão intrafamiliar mais prevalente que a vertical, posto que a maioria das crianças de mães HBsAg positivas, soroconvertem para o anti-HBs antes do primeiro ano de idade (Lobato *et al.*, 2005).

Trabalho de Bensabath & Soares (2004), investigando a prevalência da hepatite B em várias populações da bacia Amazônica, reportaram prevalências que variavam de 0,7 a 7,2%, sendo maior entre indígenas, agricultores e garimpeiros. Achado semelhante foi relatado por Braga *et al.* (2001) ao realizarem estudos de soroprevalência em populações indígenas amazônicas, encontrando uma grande variação de resultados, 0 a 20,3%, sendo maior nas margens do rio Purus e Juruá.

Santos *et al.* (1995) investigaram sete comunidades urbanas e 24 grupos indígenas, no Estado do Pará, detectando positividade do HBsAg entre 0 a 2,1% nos núcleos urbanos, significativamente menor que entre os ameríndios, onde relataram variação de 0 a 14,2%. Em várias localidades do Estado do Acre, Viana *et al.* (2005) encontraram 3,3% de prevalência do HBsAg e 61,5% de anti-HBc, confirmando ser esta uma área de grande importância epidemiológica para o VHB.

Entre os Estados da região norte, o número de notificações da hepatite B, em 2005, por ordem decrescente foi de 263 casos em Rondônia, seguido de 155 no Tocantins, 122 no Pará, 81 no Amazonas, 74 no Acre, 35 no Amapá e 30 em Roraima. No mesmo ano, em toda a região registraram-se apenas 51 óbitos, sendo 21 no Amazonas (Brasil, 2008).

Em associação com a hepatite B, outros vírus também assumem grande interesse epidemiológico, em especial o *Vírus da hepatite Delta* (VHD) e o *Vírus da Imunodeficiência Humana-1* (HIV-1). Na população mundial, estima-se 18 milhões de

co-infecções VHB/VHD, com as maiores prevalências em áreas do Mediterrâneo, pequenas áreas centrais da África e da Amazônia ocidental brasileira, peruana e venezuelana (Fonseca, 2002a).

Desde 1983, na bacia Amazônica, foram relatados casos de hepatite grave, com 70% de evolução para fulminação, na região de Boca do Acre (AM), sendo posteriormente identificados como quadros de VHD (Bensabath *et al.*, 1987). Em trabalhos de revisão sobre a hepatite delta na Amazônia (Braga *et al.*, 2001; Fonseca, 2002b; Paraná *et al.*, 2008), indicam prevalência em torno de 20% em população não indígena e até 7,7% em grupos de ameríndios, com rotas de transmissão semelhante ao do VHB, predominando a intrafamiliar, percutânea e sexual.

Em relação aos pacientes coinfectados VHB/HIV-1, dados epidemiológicos estimam prevalência mundial de 4 milhões de pacientes (McGovern, 2007). Monteiro *et al.* (2004) reportam 7,9% de HBsAg positivos, 45,1% de anti-HBc e 32,3% de anti-HBs em pacientes portadores de HIV/AIDS, na cidade de Belém do Pará. Em população semelhante, outro estudo identificou 30,3% de coinfectados e 2% de infecção tripla VHB/VHC/HIV-1 (Chaves, 2007).

Reconhecendo ser a hepatite B um problema de saúde mundial, várias medidas de prevenção e controle foram implementadas, sendo a imunização de longe a de maior impacto. Os programas de vacinação contra hepatite B se iniciaram na Europa e nos Estados Unidos das Américas (EUA), em 1985, sendo mais tarde recomendado pela OMS, em 1992, que todos os países incluíssem a vacina contra a hepatite B no calendário de imunizações. Dos 190 países existentes, 168 (78%) introduziram esta vacina no seu calendário, 131 (68%) com cobertura acima de 80% da sua população (WHO, 2007).

Dados do *Centers for Disease Control* (CDC) demonstraram claramente a redução da incidência de casos de VHB nos EUA, de 11 casos / 100.000 habitantes para 2,5 / 100.000, a partir da imunização de crianças e adolescentes, além de triagem sorológica em banco de sangue e grávidas (CDC, 2008).

No Brasil, a vacinação foi implementada desde 1988 nas áreas de alta prevalência, em especial na Amazônia. Através de trabalhos realizados nesta região, observa-se uma significativa redução da prevalência desta infecção. Fonseca *et al.* (2002a) reportaram uma diminuição da prevalência de HBsAg de 20% para 3,5%, em um período de 12 anos, após o início da imunização, na região de Lábrea, há muito conhecida como de alta endemicidade (Bensabath *et al.*, 1987).

Avaliando o impacto da vacinação contra o VHB após nove anos, em populações indígenas, de etnia Parakanã, no município de Altamira, Estado do Pará, iniciado em 1995, Nunes *et al.* (2007), publicaram resultados que demonstraram uma mudança no perfil epidemiológico nestas aldeias com redução do HBsAg de 5,3 para 3,9%, aumento do anti-HBs isolado de 0 para 31,4% e nenhum caso de associação com hepatite delta.

Apesar da nítida redução da incidência de hepatite B em nível mundial, ainda há um passivo muito grande de portadores crônicos da infecção, mantendo esta doença como um verdadeiro problema mundial de saúde pública.

O CDC (2009) revela que mesmo depois da melhoria no padrão epidemiológico, ainda em 2007 estimava-se 43.000 novas infecções, 1,2 milhões de pessoas cronicamente infectadas e entre 2.000 a 4.000 óbitos relacionados à doença hepática crônica, nos EUA.

No mundo, a hepatite B é responsável por 30% dos casos de cirrose e 57% dos casos de CHC (Perz *et al.*, 2006). A incidência do CHC é maior nos países asiáticos e na maior parte da África, ultrapassando 80% de casos na China, em Singapura, na Coreia, na Índia e no Vietnã. Nos EUA, em quinze anos, os casos de CHC dobraram e houve aumento de 41% da mortalidade por esta doença (Levanchy, 2005).

De acordo com o descrito no inquérito nacional sobre CHC, Gonçalves *et al.* (1997) reportaram 291 casos de CHC em vários Estados do Brasil, atribuindo-se ao VHB a responsabilidade por 39,4% do total dos casos. Estudos no Pará demonstraram ser o VHB a terceira causa da doença hepática crônica (Moia *et al.*, 2004) e a primeira nos casos de CHC, com 88,9% de positividade para algum marcador do VHB (Miranda *et al.*, 2004).

1.3.3 Epidemiologia Molecular

Os genótipos do VHB possuem uma distribuição geográfica peculiar (Figura 9). Na Ásia, predominam o B2, o C1 e o C2 e em menor proporção o D1, o D2 e o A1, enquanto que no continente australiano o C3, o C4 e o D4 são os mais prevalentes (Locarnini, 2004; Schaefer, 2007).

No norte europeu, prevaleceu o genótipo A2 e no sul o D, o mesmo encontrado no norte da África; diferentemente do A1 e do E, encontrados na região centro-sul africana. No novo mundo, ao norte, predomina o genótipo A; na América Central o G e o F2, assim como no sul, destaca-se também o F2, entre os nativos da região (Locarnini, 2004; Schaefer, 2007).

Ao se pesquisar a epidemiologia molecular do VHB na América Latina, outros dados são reportados. Campos *et al.* (2005) propondo a forte influência das correntes migratórias para as Américas, compilam os dados existentes, identificando os genótipos F1 e F2 como o mais antigo da região, proveniente das migrações dos ancestrais ameríndios, desde a era glacial. Posteriormente, foram introduzidos os genótipos A e D, através dos imigrantes europeus; além do B e C oriundos do sudeste asiático.



Figura 9 – Distribuição geográfica dos genótipos do VHB (Fonte: Campos *et al.*, 2005; Schaefer, 2007).

No Brasil, Sitnik *et al.* (1999) analisaram 84 soros de pacientes portadores de VHB oriundos de diversos Estados do país e encontraram 53,6% de prevalência do genótipo A, 20,2% do C, 16,7% do D, 7,1% do F e 2,4% do B. Trabalhos com populações amazônicas relataram inicialmente um predomínio do genótipo F, especialmente em

comunidades indígenas isoladas, enquanto que nas com alto grau de aculturação, quase a totalidade do VHB circulante pertencia ao genótipo A (Bertolini *et al.*,2000).

Conde *et al.* (2004), pesquisando a prevalência de genótipos entre os hepatopatas crônicos oriundos de várias cidades do Estado do Pará, encontraram que 89,1% das amostras com VHB pertenciam ao genótipo A, 8,7% ao F e 2,25% ao D. No Acre, Viana *et al.* (2005) também descrevem a ocorrência dos genótipos A e D, auxiliando no conhecimento acerca da distribuição dos genótipos no Brasil (Figura 10), como demonstrado no trabalho de Mello *et al.* (2007).

Nos casos de hepatite delta, as pesquisas moleculares iniciais demonstram a associação do genótipo F do VHB e III do VHD. Contudo, estudo recente revelou a circulação de co-infecções do genótipo A do VHB com III do VHD, em população da bacia amazônica (Gomes-Gouvêa *et al.*, 2008).

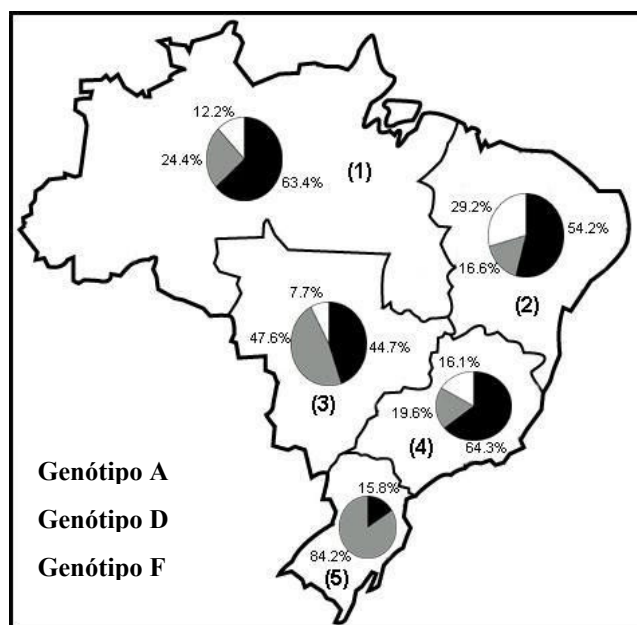


Figura 10 – Distribuição dos genótipos do VHB mais prevalentes no Brasil (Fonte: Mello *et al.*, 2007).

1.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA E HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VHB

As manifestações clínicas decorrentes da infecção pelo VHB são bastante variáveis, indo desde quadros agudos assintomáticos autolimitados até crônicos terminais, com evolução para cirrose hepática descompensada e carcinoma hepatocelular (CHC).

Após o contágio, segue-se um período de incubação que varia de seis semanas a seis meses, seguido do período de estado, de convalescença e de eliminação viral. No período de estado, o paciente poderá se apresentar com um quadro oligo ou assintomático em torno de 50 a 80% dos casos, sintomático em 20 a 50%, ou, raramente, evoluir para formas graves fulminantes em 0,5 a 1% dos quadros. O perfil clínico dependerá, principalmente, da idade e do estado imunológico do hospedeiro (Pungpapong *et al.*, 2007).

Caso não haja eliminação dos antígenos virais em seis meses de doença com normalização dos testes bioquímicos hepáticos, caracterizando a resolução da hepatite B aguda, o paciente passa a ser considerado portador de hepatite B crônica (Lok & McMahon, 2007). Nesta fase, segue-se um curso insidioso, podendo permanecer em estado de portador ou progredir para doença hepática agressiva, cirrose e suas complicações (Lok & McMahon, 2007).

Na hepatite B crônica, reconhecem-se três fases distintas, conhecidas como imunotolerância, imunoatividade e portador inativo do VHB (McMahon, 2008). A fase de imunotolerância é vista quase que exclusivamente nas infecções verticais, onde as crianças apresentam altos níveis de carga viral, geralmente acima de 20.000 UI/mL, HBeAg positivo, transaminases normais e sem lesão hepática significativa. Esta

pode se manter até a fase adulta, porém a maioria evoluirá para a fase imunoativa ainda na infância (Lok & McMahon, 2007; McMahon, 2008).

A partir do momento que o sistema imunológico do hospedeiro reconhece os antígenos virais como estranhos, inicia-se a fase imunoativa, em uma tentativa de erradicar a infecção, apesar de raramente conseguir, face a deficiente resposta empreendida. Neste período, há elevação ou flutuação das enzimas necroinflamatórias, aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT), carga viral acima de 2.000 UI/ml e diversos graus de atividade inflamatória e fibrose hepática (McMahon, 2008).

A imunoatividade se inicia com os indivíduos sendo HBeAg positivos e a partir de então poderão se direcionar para três cenários diferentes. No primeiro deles, entrarão para a fase de portador inativo, após a soroconversão do HBeAg para o anti-HBe, com baixo risco de desenvolvimento de cirrose e CHC. Outros se manterão na fase imunoativa, com persistência do antígeno “e”, da elevação das transaminases e da continuidade da injúria hepatocelular. Em um terceiro cenário, alguns pacientes que evoluíram para a fase de portador inativo, podem apresentar exacerbações com retorno do estado HBeAg positivo, usualmente acompanhado de quadros inflamatórios, ou mesmo se manterem HBeAg negativos e anti-HBe positivos, mas com flutuações de agressão hepática e aumento dos níveis de replicação viral e de transaminases. Portanto, poderão constituir a fase imunoativa, tanto indivíduos HBeAg positivos quanto negativos (Lok & McMahon, 2007; McMahon, 2008).

Para alguns autores, a fase de exacerbação da hepatite naqueles HBeAg negativos, após um período de portador inativo, poderia definir uma quarta fase dita de reativação (Lok & McMahon, 2007; Fattovich *et al.*, 2008). Todavia, a reativação do

VHB é um fenômeno biológico característico dos hepadnavírus, independente da presença ou não do antígeno “e”; e mesmo nos casos de diagnóstico prévio de hepatite B resolvida, pode-se ter retorno da infecção quando os pacientes são submetidos a terapias imunossupressoras (Villeneuve, 2005; Fonseca, 2007).

Como se pode demonstrar, a história natural da infecção pelo VHB é variada, complexa e ainda não totalmente esclarecida (Figura 11), sendo dependente de fatores relacionados ao próprio vírus e, principalmente, ao hospedeiro.

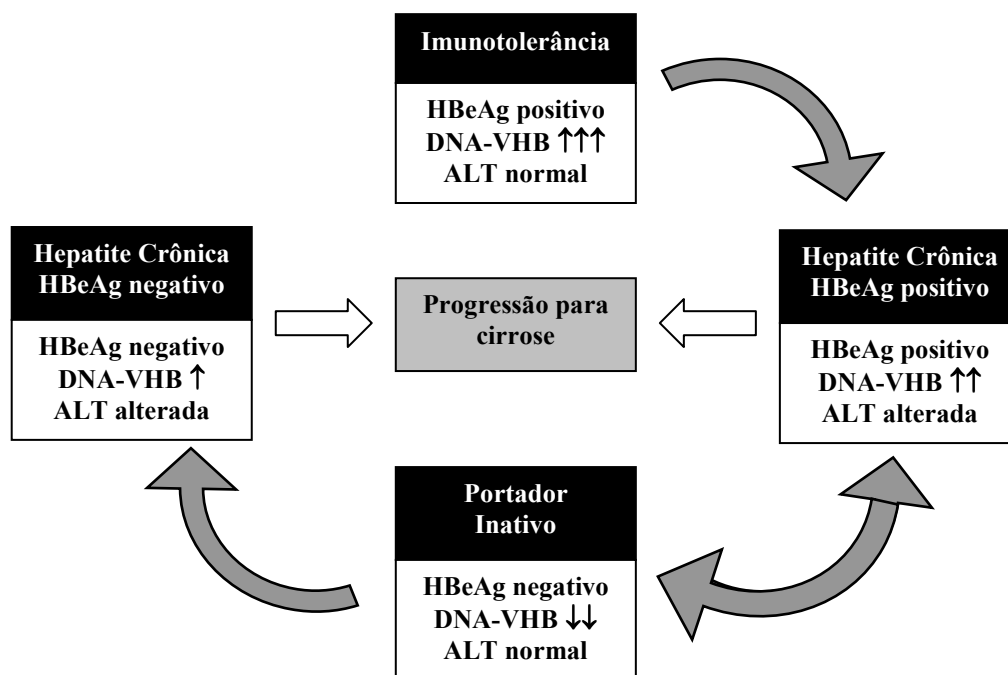


Figura 11 – Representação esquemática da história natural da infecção crônica pelo VHB (Fonte: Pungpapong *et al.*, 2007, adaptado).

Entre as características virais, destacam-se a carga viral, os genótipos, as mutações e as infecções associadas (Fattovich *et al.*, 2008). Em relação à viremia, estudos em asiáticos que adquiriram a infecção em tenra idade demonstraram que altas cargas virais se correlacionam com o risco aumentado de cirrose e de CHC (Chen *et al.*, 2006; Iloeje *et al.*, 2006), apesar de não haver consenso de qual seria este nível, sendo aceito por muitos acima de 2.000 UI/mL (10^4 cópias/mL) para os HBeAg negativos e acima de 20.000 UI/mL (10^5 cópias/mL) para os HBeAg positivos (Lok & McMahon, 2007; Lin & Kao, 2008).

Ao se analisar a influência dos oito genótipos no curso da infecção crônica pelo VHB, os resultados apontam características distintas nas diferentes regiões geográficas pesquisadas. O genótipo A1 se associa ao risco aumentado de CHC em homens jovens, muitos sem cirrose, enquanto o genótipo A2 aumenta a prevalência de cirrose e CHC em indivíduos mais velhos (Norder *et al.*, 2004).

Em áreas onde predominam os genótipos A e D, como na Europa e na América do Norte, este último representa risco de doença mais grave nos indivíduos HBeAg negativo, em relação ao primeiro (Fung & Lok., 2004). Na Ásia, o genótipo C é mais encontrado em pacientes descompensados e com neoplasia, quando comparado ao B. Todavia o genótipo B parece aumentar o risco de CHC em pacientes mais jovens (Kao, *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2004; Chu & Liaw, 2005; Kramvis *et al.*, 2005).

Com relação aos demais genótipos, há trabalhos mais consistentes com o F, demonstrando sua relação positiva com CHC em crianças e adultos jovens residentes no Alaska (Livingstone *et al.*, 2007). Por outro lado, estudo desenvolvido em um grupo de pacientes do estado do Pará, não demonstrou diferenças entre os genótipos e a manifestação clínica da hepatite B crônica (Conde *et al.*, 2004).

Alguns trabalhos apontam o aumento do risco das mutações pré-*core* e na região promotora do *core* para o desenvolvimento da cirrose e CHC, ou exacerbações graves e fulminantes (Kao *et al.*, 2003; Yuen *et al.*, 2005; Chen, C.J. *et al.*, 2006; Liu, C.J. *et al.*, 2006). Tal fenômeno é especialmente visto nas regiões onde predominam os genótipos B, C e D, contudo não se repete naquelas de alta prevalência dos genótipos A e F (Conde *et al.*, 2004; Lin & Kao, 2008).

Associação com outros vírus, como o *Vírus da hepatite C* (VHC), o VHD e o HIV, também pioram o prognóstico dos pacientes infectados pelo VHB, com curso mais rápido e progressivo para as formas terminais da doença (Takamura *et al.*, 1993; Liaw *et al.*, 2004; Raimondo *et al.*, 2006; Puoti *et al.*, 2006).

Lin & Kao (2008) demonstraram, em seu artigo de revisão, as possíveis interações entre os fatores virais conhecidos que atuam na história natural da doença, sendo concluído que haveria um pior prognóstico para os pacientes infectados com o genótipo C do VHB associado à mutação da região promotora do *core*, à deleção pré-S / S, à alta carga viral e com elevação persistente de transaminases.

Por outro lado, é indiscutível a participação das características do hospedeiro no curso da infecção pelo VHB, destacando-se a idade, o sexo, o estado de competência imunológica e o perfil genético (Fattovich *et al.*, 2008).

A idade do indivíduo no momento do contágio é, há muito conhecida, como um evento singular para previsão do risco de cronificação (Jacyna & Thomas, 1993). Portanto, o risco de evolução para a cronicidade é de 5 a 10% em crianças maiores que três anos e adultos, 20 a 30% para crianças menores de 5 anos e de 98% nos neonatos.

A evolução da hepatite B na transmissão vertical cursa invariavelmente para a cronicidade, salvo tenha-se adotado alguma medida preventiva. A cirrose é incomum na infância, sendo mais observada nos indivíduos que cedo soroconverteram para o anti-HBe, inclusive com risco de CHC. Nas crianças infectadas após o parto, a expectativa é de 15% de soroconversão do HBeAg para o anti-HBe, clareamento do HBsAg em apenas 1%, manutenção do estado de portador inativo em 95%, com possibilidade de 3 a 4% ao ano de desenvolver cirrose e 2% de CHC em vinte anos de doença (Bortolotti *et al.*, 1998).

Nos indivíduos adultos HBeAg positivos, 65% soroconvertem para o anti-HBe, diminuindo a progressão da doença. Os melhores prognósticos estão agrupados nos pacientes com genótipo B do VHB e de etnia não asiática (Feld & Heathcote, 2006). Os pacientes adultos HBeAg negativos, com persistência da replicação viral, geralmente são descobertos em idade mais avançada, não raro já com cirrose hepática, níveis flutuantes de ALT e carga viral entre 10^4 a 10^6 cópias/mL. Nos portadores inativos, 1 a 2% ao ano apresentarão clareamento espontâneo do HBsAg - principalmente em caucasianos, e 15 a 24% desenvolverão doença com 1 a 17% de reversão sustentada para o HBeAg (Hsu *et al.*; 2002; Hadziyannis & Papatheodoridis, 2006).

Na população de portadores inativos do VHB, o risco de desenvolvimento de CHC é 223 vezes maior do que na população não infectada, como bem demonstra o trabalho de Beasley *et al.* (1981). Um outro estudo, de caso-controle, realizado no Nordeste do Brasil concluiu que entre portadores de CHC houve uma prevalência de HBsAg de 42,5% e o risco estimado de 33 (*odds ratio*) em relação ao grupo de indivíduos sadios (Cotrim *et al.*, 1992).

Ao analisar os estudos publicados com todos estes grupos, Fattovich *et al.* (2008) encontraram risco para desenvolvimento de cirrose em menos que 0,1%/ano nos portadores inativos, 1,6 a 3,8%/ano nos HBeAg positivos e 2,8 e 9,7%/ano nos HBeAg negativos. Para o CHC, o risco para os inativos é de 0,2% / ano, para os tolerantes sem cirrose é 0,6% / ano e para os com cirrose é de 3,7% / ano. Os óbitos relacionados variam de 0,03% / ano nos portadores sem replicação até 3,3% / ano nos cirróticos compensados, chegando acima de 80% em cinco anos nos descompensados.

A população de maior risco para o desenvolvimento de cirrose seria de pacientes replicantes, HBeAg negativos, portadores de VHB com genótipos C e D, com altos níveis de viremia e de idade mais avançada. Para o grupo com CHC, os fatores mais associados seriam a presença da cirrose, a positividade para o DNA-VHB e o HBeAg, as transaminases elevadas, as co-infecções com o VHC e o VHD, história familiar de neoplasia hepática primária e o genótipo C com mutação na região promotora do core (Pungpapong *et al.*, 2007).

Reconhece-se, também, que o homem tem três a seis vezes mais probabilidade de desenvolver cronicidade do que a mulher. Recente estudo publicado (Shimizu *et al.*, 2007) justifica que na fase pré-menopausa a mulher tem baixo depósito de ferro e, por conseguinte, menor produção de citocinas inflamatórias. Complementa-se com o fato de que o estradiol seria um potente agente anti-oxidante, suprimindo a fibrose hepática, em modelos animais, por meio da atenuação da sensibilidade dos fatores de transcrição de produtos de oxidação e da inibição da geração de espécies reativas do oxigênio que levariam a apoptose hepática e a ativação das células estreladas.

O papel do perfil genético no curso da infecção pelo VHB sempre se constituiu em assunto de interesse, possibilitado agora por novas descobertas e aprimoramento das técnicas de estudo, de ser melhor explorado e compreendido, podendo servir inclusive como uma ferramenta de intervenção terapêutica futura.

A distribuição irregular das prevalências desta infecção no globo terrestre suscita a idéia de que entre as diferentes etnias acometidas, haveria fatores genéticos que levariam a maior ou menor susceptibilidade da infecção e sua evolução para resolução ou cronicidade.

Signh *et al.* (2007) investigaram em diferentes populações a correlação do HLA com a hepatite B e encontraram que o HLA DR13 é, consistentemente, associado com o clareamento da infecção. Demais resultados apontaram os alelos HLADRB1*11/*12 e DQB1*0301 fortemente associados com a persistência do VHB e, por outro lado, com o clareamento do VHC.

Várias pesquisas, oriundas especialmente do continente asiático, têm sido empreendidas na tentativa de avaliar a relação do nível sérico e dos polimorfismos dos genes das citocinas com as manifestações clínicas da hepatite B (Cheong *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2006; Kiki *et al.*, 2006; Liu, M. *et al.*, 2006).

Em uma casuística chinesa, Du *et al.* (2006) estudaram a associação do polimorfismo do TNF- α com a clínica da hepatite B crônica, comparando com grupo controle formado por indivíduos com imunidade natural ao VHB. Vários pontos do gene foram analisados (-238G/A, -308G/A, -857C/T, -863C/A, -103T/C), encontrando o genótipo -238GG como um fator de risco para a cronificação e o -857TT como um de proteção, além dos achados de que a frequência do haplótipo GGCT foi

significativamente maior no grupo controle, enquanto que os *GGCAT* mais frequentes nos pacientes cronicamente infectados.

Estudando os níveis séricos do TNF- α e sua relação com o grau de fibrose hepática e a classificação de Child-Pugh, Kiki *et al.* (2006) encontraram uma associação positiva desta citocina entre o índice de atividade histológica nos pacientes com hepatite B crônica ativa sem cirrose e uma associação negativa com a classificação prognóstica.

Avaliando isoladamente o papel dos polimorfismos nos gene INF- γ , as pesquisas são controversas, ora apontando uma maior influência do alelo +874A (Liu, M. *et al.*, 2006) na maior susceptibilidade a cronificação pelo VHB, ora do alelo +874T (Abbott *et al.*, 2007), ora não sendo encontrado diferença entre estes alelos (Cheong *et al.*, 2006). Ressalta-se que todos estes estudos foram realizados em populações asiáticas.

Na China, pesquisa sobre a associação da diversidade gênica de citocinas com o grau de fibrose hepática na hepatite B crônica identificou o genótipo - 627CC da interleucina 10 (IL-10) foi protetor contra a fibrose mais acentuada, assim como a elevada ou intermediária produção desta citocina nos haplótipos (IL-10 -1117 e IL-10 -627) AC e GC também foram igualmente protetores (Chan *et al.*, 2007).

Migita *et al.* (2005) avaliaram polimorfismos nos genes de várias citocinas (INF- γ , TNF- α , TGF- β , IL-6 e IL-10) em casos de CHC no Japão, encontrando apenas uma associação positiva para o TGF- β 1. No Brasil, Ribeiro *et al.* (2007), pesquisando as mesmas citocinas, não encontraram nenhuma diferença nas freqüências dos polimorfismos no grupo de pacientes infectados pelo VHB e no grupo

controle. Portanto, ainda nenhuma conclusão definitiva pode ser colocada acerca deste tema.

Além dos fatores virais e do hospedeiro, outras condições são relatadas como relacionadas à história natural da infecção pelo VHB. Como influências negativas no curso da doença, citam-se o alcoolismo, o tabagismo, as aflatoxinas e a presença da esteato-hepatite não alcoólica (Fattovich *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2009).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO VHB

1.5.1 Hepatite B Aguda

Os exames hematológicos e bioquímicos podem auxiliar muito na identificação da fase aguda das hepatites, apesar de serem inespecíficos. O hemograma normalmente apresenta poucas modificações na série vermelha e plaquetária nos quadros de hepatite agudas virais. Na série branca, poderá ocorrer habitualmente leucopenia, porém a leucocitose estará presente na necrose maciça hepática ou quando houver associações de patologias (Silva, 2003).

A fase aguda se caracteriza principalmente por elevação das transaminases, normalmente acima de dez vezes o limite superior da normalidade (LSN). As bilirrubinas se elevam após o aumento das transaminases, tanto a fração direta quanto à indireta. A hiperbilirrubinúria antecede o surgimento da icterícia e a persistência da hiperbilirrubinemia denota quadros colestáticos prolongados (Ferraz, 2010).

As enzimas canaliculares, fosfatase alcalina e gamaglutamiltransferase (GGT) se alteram pouco nos quadros agudos, exceto naqueles de evolução colestática; assim como as proteínas totais e frações normalmente não se modificam (Ferraz, 2010).

O tempo e a atividade protrombínica (TAP), nos quadros benignos, não se alteram, contudo nas formas fulminantes e na fase terminal da doença hepática seus níveis vão decrescendo progressivamente, assumindo inclusive valor prognóstico (Silva, 2003).

No diagnóstico sorológico específico (Figura 12), o HBsAg é o primeiro antígeno a ser detectado no soro dos pacientes infectados. Ele aparece entre um a cinco meses após o contato, podendo permanecer por 30 até 180 dias. Após o seu desaparecimento, segue-se um período curto que não se detecta nem o HBsAg e nem o anti-HBs, denominado de período de “janela imunológica” (Bensabath *et al.*, 1997). Após algumas semanas passa-se a detectar o anti-HBs, o qual indica resolução da infecção, na maioria absoluta dos casos.

Durante a fase aguda da hepatite B (Figura 14), poucos dias após o aparecimento do HBsAg, surgem anticorpos contra o HBcAg, chamados de anti-HBc IgM que perduram de dois a três meses após o início do quadro clínico. Segue-se ao seu desaparecimento, a detecção do anti-HBc IgG em níveis progressivamente crescentes até atingir a estabilização e perdurar pelo resto da vida (Silva, 2003).

O HBeAg aparece nos primeiros dias da fase clínica, tem duração efêmera e desaparece a seguir. Pode haver ou não o período de “janela imunológica”, sendo este extremamente variável, em torno de um a quatro semanas, antes de surgir o anti-HBe. Acredita-se que se houver persistência do HBeAg por mais de oito a dez semanas do início dos sintomas clínicos sugere-se a evolução para cronicidade (Silva, 2003).

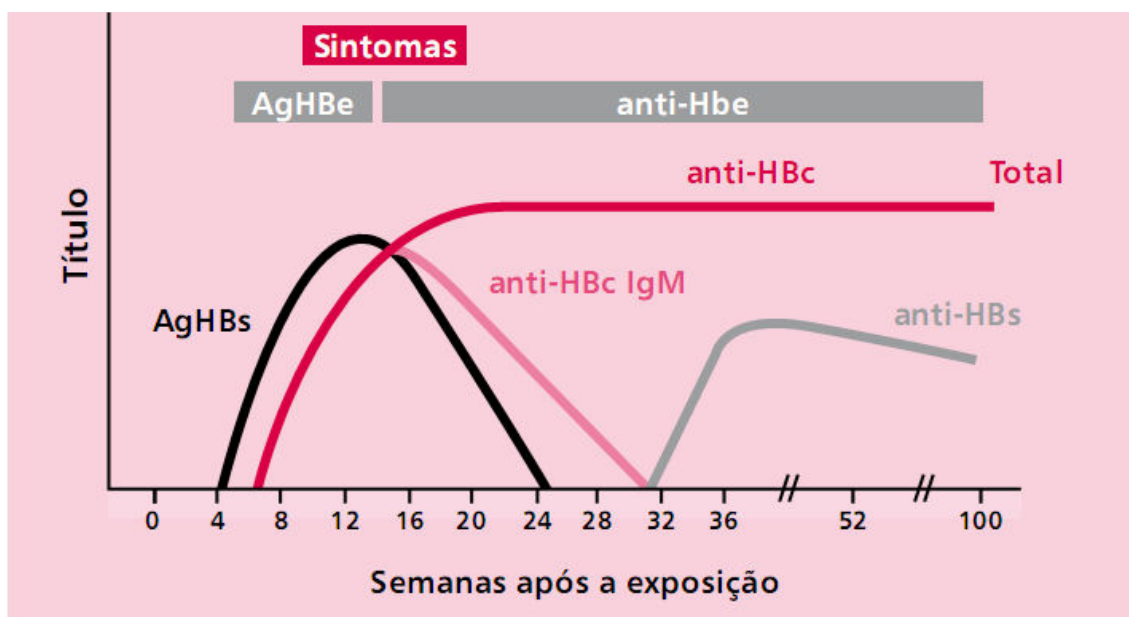


Figura 12 – Padrão sorológico da hepatite B aguda com evolução para cura (Fonte: Brasil, 2008).

1.5.2 Hepatite B Crônica

Os exames laboratoriais inespecíficos estão mais alterados nas fases mais progressivas e finais da doença (Ferraz, 2010).

Durante a fase crônica, o VHB poderá ser responsável por quadros de hipoplasia medular, e na doença hepática terminal, em razão da própria hipertensão portal com hiperesplenismo, ocorre a pancitopenia (Ferraz, 2010).

As transaminases podem estar normais ou moderadamente elevadas, geralmente não ultrapassando 2 a 3 vezes o LSN, podendo ser o único exame sugestivo de doença hepática nos assintomáticos ou oligossintomáticos (Silva, 2003).

Nos casos de cirrose hepática descompensada, há elevação das bilirrubinas, à custa da fração direta e aumento das enzimas canaliculares. O

comprometimento da síntese hepática se traduz por hipoalbuminemia e diminuição da atividade protrombínica (Silva, 2003).

A dosagem de alfafetoproteína é utilizada para o acompanhamento dos pacientes com hepatite crônica e cirrose, como valor preditivo de desenvolvimento de hepatocarcinoma.

Além dos exames laboratoriais, pode-se lançar mão dos métodos de imagem, endoscópicos e quando indicada a biópsia hepática para exame histopatológico (Silva, 2003).

Define-se como hepatite crônica B, do ponto de vista sorológico, a persistência por mais de seis meses do HBsAg (Figura 13). Nas fases iniciais do período crônico, detecta-se, em níveis altos, o HBsAg, o HBeAg e o anti-HBc IgG, além da DNA polimerase e do DNA viral (Silva, 2003).

Com o passar do tempo, haverá tendência de redução da expressão do HBcAg e do HBeAg. Portanto, nas fases mais tardias, normalmente, não se detectará mais o HBeAg no soro e haverá o aparecimento progressivo do anti-HBe (Mazo & Pessoa, 2010).

Nesta fase, o emprego de técnicas para detecção e quantificação do DNA viral é extremamente útil, principalmente nos casos de pacientes HBeAg negativos, auxiliando na identificação do portador inativo e do portador de hepatite crônica “e” negativa (Mazo & Pessoa, 2010).

A genotipagem do VHB ainda não faz parte dos exames de rotina, recomendando-se a pesquisa das mutações da DNA polimerase para o acompanhamento do paciente em uso de análogos nucleos(t)ídeos para identificação precoce da resistência viral, associando-se a quantificação da viremia. Contudo, no Brasil, há

grande dificuldade no acesso destes exames e ainda não há padronização da melhor técnica a ser empregada, candidatando-se o PCR em tempo real PCR-RT (Mazo & Pessoa, 2010).

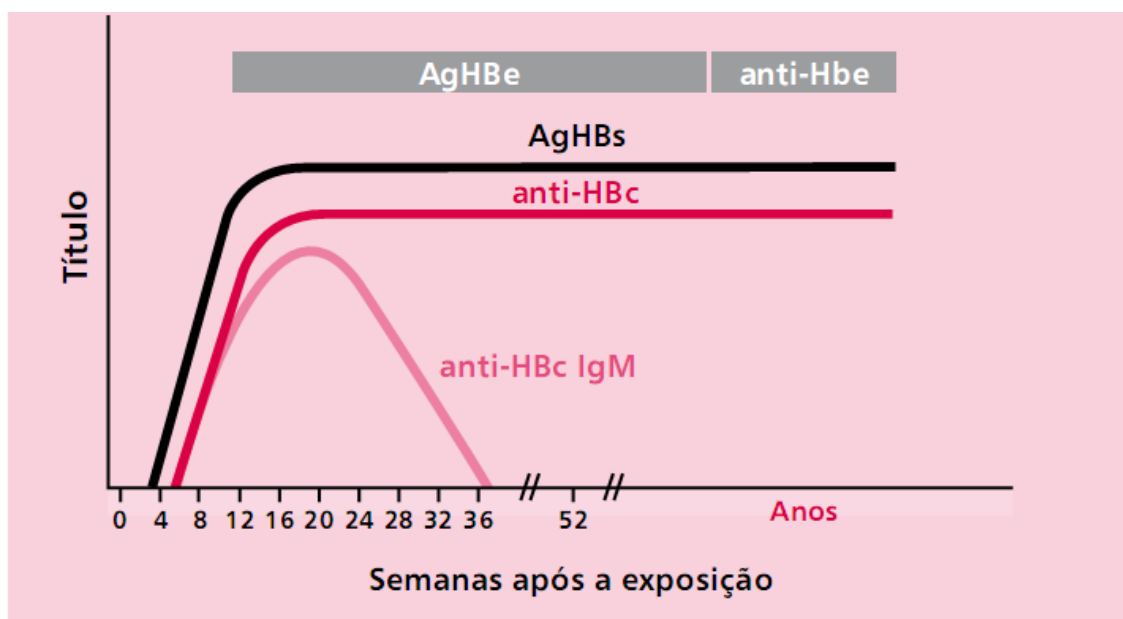


Figura 13 - Padrão sorológico da hepatite B crônica (Fonte: Brasil, 2008).

1.6 PATOLOGIA E IMUNOPATOGENIA DA INFECÇÃO PELO VHB

1.6.1 Patologia da Hepatite B

Os aspectos histopatológicos das hepatites agudas virais são comuns a todos os vírus das hepatites A, B, C, D ou E, com poucas variações mais específicas a cada um deles. As lesões que compõem a fase aguda são as de cunho degenerativo, a necrose e a atividade regenerativa dos hepatócitos, conferindo um desarranjo trabecular dos mesmos (Gayotto & Alves, 2003).

Do ponto de vista laboratorial, conceitua-se a hepatite crônica quando se consegue demonstrar a presença do HBsAg por mais de seis meses, desde o início da

infecção. Adicionalmente, existe também o critério anatomopatológico, o qual é igualmente importante para o diagnóstico das formas crônicas.

Atualmente, seguindo orientações de uniformização da *International Association for the Study of the Liver* (IASL), o estadiamento das hepatites crônicas segue um sistema de pontuação que inclui critérios referentes às alterações estruturais, à atividade portal e peri-portal, à atividade lobular e aos marcadores etiológicos. Entre os vários sistemas conhecidos, está a classificação francesa METAVIR, na qual pontua o grau de fibrose (F), dito estadiamento, de 0- ausência de septos, 1- fibrose portal sem septos, 2- fibrose portal com raro septos, 3- numerosos septos, mas sem cirrose e 4- cirrose. O grau de inflamação (A), nesta classificação, é avaliada quanto à atividade inflamatória lobular e presença de *piecema*, interpretando-se o zero como a ausência de atividade e o 1, 2 e 3 como mínima, moderada e intensa atividade, respectivamente (Bedossa & Poynard, 1996).

O Comitê da Sociedade Brasileira de Patologia e da Sociedade Brasileira de Hepatologia apresentaram o consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas (Gayotto, 2000). Neste, abordam-se critérios básicos para o espectro etiológico, relação graduação/ integração anátomo-clínica, de aplicabilidade de classificação, critérios de semiquantificação, conceito de fígado reacional e recomendações técnicas adicionais. Nos critérios de semiquantificação, há, também, um sistema de pontuação envolvendo alterações estruturais, presença de infiltrado inflamatório portal/septal, atividade periportal/peri-septal e atividade parenquimatosa.

A semelhança da classificação METAVIR, a brasileira faz o estadiamento histopatológico através das alterações estruturais, considerando zero

quando se encontra a normalidade, o 1 na expansão fibrosa do espaço porta, o 2 na expansão do espaço porta e presença de septos porta-porta, o 3 quando ocorrem esboços de nódulos e o 4 na presença de nódulos, caracterizando a cirrose (Gayotto, 2000).

O grau de inflamação é medido pela atividade peri-portal/perisseptal, conferindo zero quando há ausência de lesões de interface, 1 na presença do extravasamento linfócitos para a interface, 2 na ocorrência de necrose em saca-bocados discreta, 3 na necrose moderada e 4 na necrose me extensas áreas (Gayotto, 2000).

O aspecto morfológico mais sugestivo da hepatite B é o encontro, às colorações habituais, do hepatócito com citoplasma “em vidro fosco”, correspondendo a grandes acúmulos de envelope do vírus na célula hepática. A identificação etiológica pode ser feita de modo específico pela detecção do HBsAg, no citoplasma ou na membrana do hepatócito, por meio de métodos imuno-histoquímicos com diversos sistemas de identificação (peroxidase-antiperoxidase ou avidina-biotina peroxidase). Este antígeno não é habitualmente detectado no hepatócito nas formas agudas, exceto nas fases de transição à cronicidade. Nas hepatites crônicas, seu achado pode chegar até 80% dos casos (Gayotto & Alves, 2003).

Outro antígeno encontrado de bastante utilidade é o HBcAg. Sua expressão é primariamente nuclear, sendo, juntamente com a detecção do DNA viral, um marcador fidedigno de replicação do VHB (Gayotto & Alves, 2003).

1.6.2 Imunopatogenia da Infecção pelo VHB

O estado atual de conhecimento da imunopatogenia da infecção pelo VHB resulta de estudos em humanos e chimpanzés, através das análises virológicas e

imunobiológicas de infecções por hepadnavírus relacionados, de análises bioquímicas, moleculares e imunológicas em linhagens de células e de estudos em modelos animais que expressam genes ou reproduzem o ciclo de replicação viral (Dandri *et al.*, 2005; Wieland & Chisari, 2005).

Após a infecção do hepatócito, inicia-se um período relativamente longo, entre quatro a sete semanas, em que não há detecção plasmática de antígenos virais, seguido da fase de expansão logarítmica e pico da carga viral do VHB no tecido e no soro, atingindo níveis de 10^9 a 10^{10} cópias/mL (Figura 14). Admite-se também que, apesar de lentamente, haverá a infecção de 100% das células hepáticas (Hui & Lau, 2005 ;Wieland & Chisari,2005).

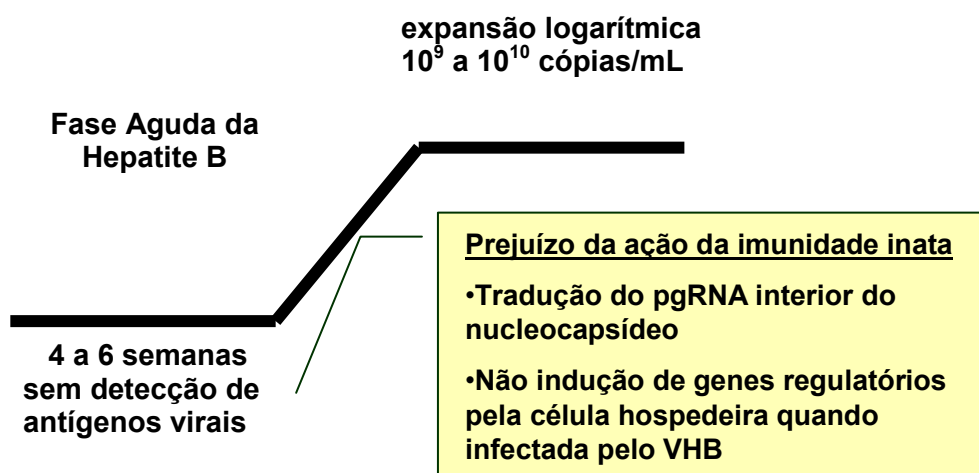


Figura 14 – Representação esquemática da fase aguda da hepatite B.

Nas fases iniciais da infecção pelo VHB, há prejuízo da ação da imunidade inata do hospedeiro. Este fato pode ser explicado pela dificuldade do reconhecimento das proteínas virais pelo sistema imunológico, pelo processo de

tradução do pgRNA se realizar no interior do nucleocapsídeo e pela não expressão de genes regulatórios pela célula hospedeira quando infectada pelo VHB (Wieland *et al.*, 2004). Portanto, estes fatores funcionam como escapes do sistema imune que é altamente sensível à produção de mRNA virais (Hui & Lau, 2005).

Mesmo assim, reconhece-se a participação da imunidade natural com a produção de interferon (INF) tipo 1, α / β , pelas células infectadas e a ativação de células *natural killers* (NK) e células T *natural killers* (NKT) pelo INF- γ . O INF- α / β direciona o alvo da resposta para os produtos de replicação viral, enquanto que as células NK são ativadas pelo reconhecimento de moléculas indutoras de *stress* celular ou modulação do MHC classe I nas células infectadas (Bertoletti & Gerhing, 2006).

Ainda na fase não logarítmica, reconhece-se o aumento dos níveis de INF- γ , de interleucina 2 (IL-2) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), além do recrutamento intra-hepático de células inflamatórias, que se mantém após a expansão da infecção com a liberação e ativação mais robusta destes elementos (Guidotti *et al.*, 1999).

A participação da imunidade adaptativa é fundamental para o clareamento viral e término da infecção pelo VHB. Os linfócitos T CD4⁺ ativam os linfócitos T CD8⁺ e promovem a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos para a produção de anticorpos. A resposta de LT auxiliares (LTh) é ativada com o reconhecimento de epítopes, principalmente das proteínas do nucleocapsídeo, apresentadas por MHC-II (Bertoletti & Gerhing, 2006).

Uma vez ativados, os LT CD8⁺ participam da eliminação viral através de mecanismos citolíticos e não-citolíticos (Figura 15), diminuindo os níveis de vírus

circulantes, enquanto os anticorpos neutralizam partículas virais livres e podem prevenir a reinfeção. Na fase aguda da hepatite B, portanto, há grande predomínio da resposta de linfócitos T citotóxicos (LTc), inicialmente pela via não citolítica que envolve a produção de citocinas inflamatórias, agindo na eliminação de partículas do nucleocapsídeo e do genoma viral replicante em seu interior, além de retardar a regulação pós-transcricional do mRNA viral (Guidotti *et al.*, 1999).

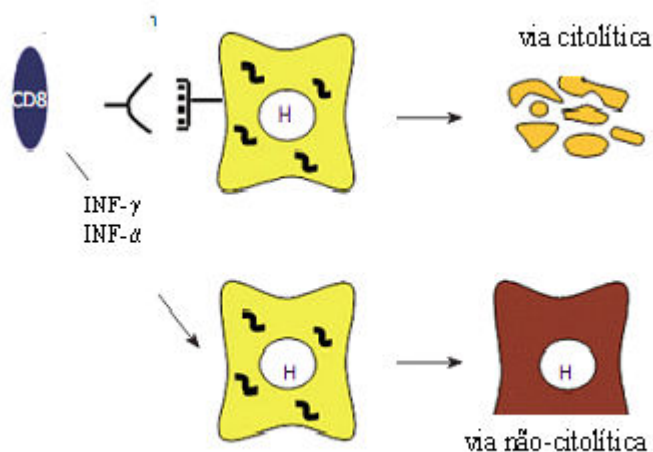


Figura 15 – Representação esquemática dos mecanismos citolíticos e não-citolíticos dos LT CD8+ contra o VHB (Fonte: Baumert *et al.*, 2007, adaptado).

A ação dos LTc se inicia após o reconhecimento de epítopes específicos do VHB, relacionados com as proteínas do *core*, do envelope, da polimerase e da região X (Webster *et al.*, 2000). As células NK e NKT podem abolir a expressão e a replicação

do VHB sem destruição do hepatócito, promovendo, ao invés, um efeito antiviral mediado por $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ (Guidotti *et al.*, 1996; Thimme *et al.*, 2003).

As células infectadas remanescentes recebem ação dos LT CD8^+ que agora, pela via citolítica, promovem a apoptose dos hepatócitos e a eliminação do restante da população viral (Baumert *et al.*, 2007). Sabe-se, também, que apesar do papel fundamental dos LTc, deverá haver uma ativação coordenada entre os LT CD4^+ e LT CD8^+ para o clareamento viral completo, o que está presente apenas nos sujeitos que controlam a infecção (Webster *et al.*, 2000; Thimme *et al.*, 2003).

A representação esquemática resumida de algumas fases da imunopatogênese da infecção pelo VHB está descrita na Figura 16 abaixo:

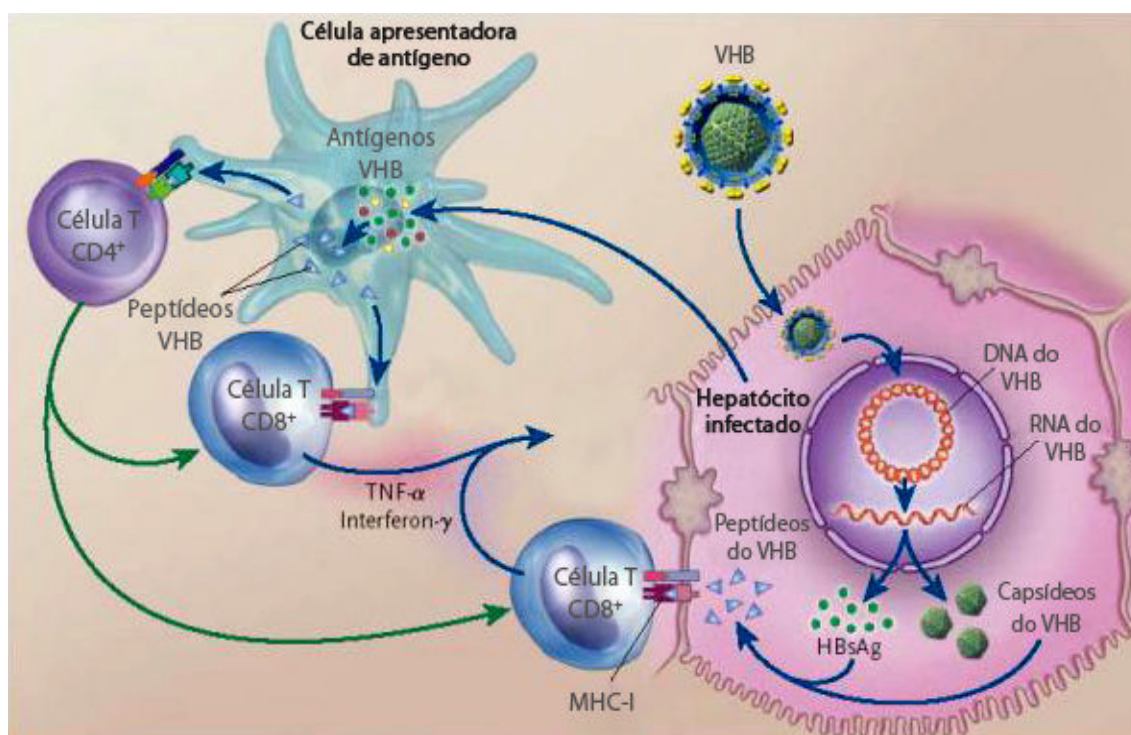


Figura 16 – Representação esquemática da resposta imunológica à infecção pelo VHB (Ganem & Prince, 2004, adaptado).

Ao contrário da resposta eficiente e multiespecífica dos LT na hepatite aguda autolimitada, há nos pacientes com evolução crônica uma reação imunológica reduzida e frágil. Os mecanismos que contribuem para a falência de resposta imunológica são pouco conhecidos, podendo incluir a disfunção e deleção de linfócitos T, a anergia clonal e a imunotolerância (Baumert *et al.*, 2007).

Encontra-se bem estabelecido o conceito de imunotolerância na transmissão vertical do VHB, induzida pelo HBeAg, cujo o pequeno tamanho desta proteína permite sua passagem pela circulação placentária, bloqueando seu reconhecimento como uma partícula imunogênica pelo sistema imunológico do feto em formação. Este fato é sugerido como responsável pela cronificação acima de 90% quando a infecção ocorre nas fases tenras de vida (Wieland & Chisari, 2005).

A infecção pelo VHB, adquirida na fase adulta é, geralmente, autolimitada, mas 5 a 10% dos pacientes desenvolvem infecção crônica. A causa não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que o comportamento da resposta imunológica precoce exerça influência profunda no padrão da doença.

Enquanto que a elevação exponencial do DNA do VHB é seguida rapidamente por vigorosa resposta dos LT CD4⁺ e LT CD8⁺ nas infecções autolimitadas, na persistência viral haveria defeito qualitativo e quantitativo da resposta de células T-VHB específicas na fase aguda.

Em adultos, o mecanismo de tolerância pode ser originário de mutações virais, principalmente as mutações do HBcAg, do HBeAg e do HBsAg, as quais servem de escape viral do sistema imunológicos, pois epítopes mutantes dificultam o reconhecimento por linfócitos T e B (Bertoletti & Gehring, 2006; Kondo *et al.*, 2006).

A hiporresponsividade de LT CD4⁺ e LT CD8⁺ em pacientes com hepatite crônica também surge na elevação dos níveis do HBeAg e do HBsAg, na supressão pelos LT regulatórios (LTreg), nas altas cargas virais e nos defeitos funcionais das células dendríticas (Seeger & Mason, 2000; Milich & Liang, 2003; Chen *et al.*, 2005; Franzese *et al.*, 2005).

O nível de viremia se correlaciona positivamente com o nível de inibição de LT (Kao & Chen, 2002). Recentemente, You *et al.*, (2008) conseguiram demonstrar um efeito forte e independente do nível de VHB-DNA sobre a ação das sub-populações dos LT. Neste estudo, quanto maior a carga viral, menor concentração periférica de LT CD4⁺, maior de LT CD8⁺ e maior desequilíbrio no balanço entre LT CD4⁺ / LT CD8⁺, com grande impacto na persistência da infecção viral.

As CD são necessárias para a indução da resposta adaptativa, portanto, variações funcionais poderiam explicar o estado de hiporresponsividade de LT em pacientes cronicamente infectados (Shi *et al.*, 2008), apesar da existência de estudos que demonstram resultados controversos em modelos animais (Shimizu *et al.*, 1998).

Os LTreg regulam a resposta imune, onde os LT CD4⁺ CD25⁺ suprimem a resposta contra antígenos próprios e estranhos, através da inibição da síntese de citocinas ou pelo contato direto celular, em que pese esta ação não ser muito bem estudada na infecção pelo VHB (Franzese *et al.*, 2005).

Kondo *et al.* (2006) conseguiram demonstrar que em pacientes cronicamente infectados pelo VHB há supressão da resposta Th1 pelo aumento da produção de IL-10 pelos LTreg, em resposta ao estímulo do HBcAg. Contudo, também neste estudo, a ação do HBcAg contribuiu igualmente para a produção de IL-18 e INF- γ

tanto em pacientes quanto em controles saudáveis, deixando lacunas no entendimento de como se processa a ação inibitória da resposta imune em pacientes portadores crônicos do VHB.

Uma outra explicação para a cronicidade das infecções pelo VHB é o conhecimento de que os hepatócitos expressam baixos níveis de moléculas de MHC-I, requerendo uma grande concentração de peptídeos, quando comparados a outras células, para estimular um número equivalente de LT CD8+. As células hepáticas são mais sensíveis ao controle de infecção mediado por citocinas, sendo mais resistentes à ação das perforinas/granzimas que levam à apoptose, responsabilizando este ambiente celular pela persistência viral (Betoletti & Gehring, 2006).

Destaca-se, também, que no curso crônico da infecção pelo VHB, são observados períodos de exacerbação, caracterizados por elevação da carga viral, por injúria hepatocelular e aumento sérico das enzimas inflamatórias hepáticas, as transaminases. Esta situação surge por quebra do equilíbrio do sistema imunológico e da persistência viral, induzindo ao fenômeno de tolerância, podendo ocorrer de forma espontânea ou induzida por terapia antiviral específica (Hui & Lau, 2005).

Nos quadros de exacerbações, há aumento de resposta de LT específicos contra os antígenos do VHB, particularmente LT-HBcAg, LT-HBeAg e LT-HBsAg específicos, em resposta ao desenvolvimento de mutações da região do *core*, promotora do *core* ou dos genes da polimerase. A cada exacerbação pode ocorrer aceleração da doença hepática ou desencadear quadros necroinflamatórios graves (Hui & Lau, 2005).

Yuen *et al.* (2007), pesquisando as diferentes respostas de LTh durante os *flares* na hepatite crônica HBeAg positiva em indivíduos asiáticos, observaram que

os infectados com o genótipo B possuíam maior secreção de INF- γ e maior chance de soroconversão enquanto que os infectados pelo genótipo C se associaram com elevados níveis de IL-10 em resposta ao HBcAg e ao HBeAg e menor percentual de soroconversão. Estes achados confirmam as teorias que a resposta eficiente Th1 se correlaciona com a eliminação viral ou de parte de seus antígenos e, no sentido inverso, a resposta Th2 com a persistência, assim como aponta a interação de fatores virais e do hospedeiro para o tipo de manifestação clínica da infecção pelo VHB.

Na fase crônica, demonstra-se o importante papel do fator de transformação do crescimento celular beta 1 (*transforming growth factor beta 1* - TGF- β 1) na indução da fibrogênese hepática. Esta citocina está envolvida na síntese e deposição dos componentes da matrix extracelular, como a fibronectina, o colágeno tipo I, III e IV, a elastina, a osteonectina, os bioglicanos, por meio das células estreladas ativadas. Tem sido demonstrado que os níveis de RNAm para TGF- β 1 e procolágeno I estão altamente relacionados com o grau de fibrose encontrada nas biópsias hepáticas de modelos animais portadores de hepatite crônica (Kanzler *et al.*, 1999).

Difícilmente, nas fases de exacerbação, o VHB poderá ser eliminado espontaneamente. Segue-se a este período, uma fase de pouca ou nenhuma replicação viral, normalidade das transaminases e ausência de lesão tecidual hepática significativa, conhecido como estado de portador inativo. Os indivíduos nesta fase possuem células T mais eficientes, resultando no controle da replicação viral, porém não o suficiente para o clareamento total da infecção (Kao & Chen, 2002).

Em todas as fases da resposta imune, seja inata ou adaptativa, o papel das citocinas é fundamental. Sua secreção surge em resposta a antígenos variados,

estimulando o desenvolvimento da imunidade e da inflamação. Entre as suas funções, destaca-se o estímulo para a diferenciação e crescimento de linfócitos, ativação de diferentes células efetoras para eliminação de antígenos e estimulação do crescimento das células hematopoiéticas (Abbas & Lichtmann, 2007). No contexto da infecção pelo VHB, o TNF- α , o INF- γ , a TGF- β 1 e a IL-10 exercem papel de destaque.

1.6.2.1 Características e funções do TNF- α

O TNF- α se constitui em uma citocina da imunidade inata, proinflamatória, cujas células que a excretam são as NK, os mastócitos, os macrófagos e os LTh. Os receptores celulares para o TNF- α são o TNF-RI, TNF-RII e TNF-p55 que estão presentes em quase todos os tipos celulares examinados (Abbas *et al.*, 2007). O gene do TNF- α se localiza no cromossomo 6, dentro da região de classe II do MHC, na região 6p21.3, com comprimento total de 702 nt, composto por 4 éxons e 3 íntrons (Posch *et al.*, 2003).

O TNF- α executa as funções de recrutar neutrófilos e mastócitos para o ambiente infectado e exerce ações sobre as células do endotélio vascular e leucócitos, promovendo a inflamação e apoptose. Sua constante estimulação leva a processos de caquexia, choque por diminuição dos tónus vascular e trombose (Abbas *et al.*, 2007).

Inúmeras são as referências sobre os possíveis polimorfismos no gene do TNF- α , com mais de dez na região promotora, interferindo na sua produção. A posição – 308 da região promotora (figura 17) apresenta como alelo normal a guanina (G), que quando substituída pela adenina (A) resulta no mutante heterozigoto *AG* ou homozigoto

AA. A mutação na posição -308 aumenta os níveis plasmáticos desta citocina, especulando-se ser responsável pelo desenvolvimento de doenças mais agressivas (Wilson *et. al.*, 1997; Migita *et. al.*, 2005).

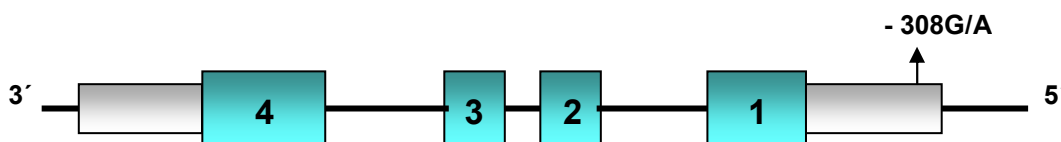


Figura 17 – Representação esquemática do gene do TNF- α .

1.6.2.2 Características e funções do INF- γ

O INF- γ , único representante da classe de citocinas do INF tipo II, é considerado uma citocina efetora da resposta imune inata e adaptativa. É produzido e secretado por células NK, LTh1 CD4⁺ e LT CD8⁺ e possui receptores celulares do tipo II (Abbas *et al.*, 2007). O gene humano do INF- γ está localizado no cromossomo 12 (12q24.1), consistindo em quatro éxons e três íntrons, que codificam um polipeptídeo de 166 aa e outro que serve como sinal de 20 aa (Baron *et. al.*, 2002).

Esta citocina exerce papel crítico na imunidade inata e adaptativa contra infecções intracelulares virais e bacterianas e no controle da transformação tumoral. Entre as ações biológicas está a ativação de macrófagos, facilitando a ação dos LTc e NK na eliminação dos microorganismos fagocitados. Também, reconhece-se sua função de estimular: (i) a síntese de espécies reativas de O₂ e óxido nítrico; (ii) a expressão de moléculas MHC-I e II e co-estimuladores nas células apresentadoras de antígenos (APC); (iii) a diferenciação de LT CD4⁺ para Th1 e inibição do Th2; (iv) os linfócitos B para mudança de classe, especialmente para IgG 2a e inibe a IgE sob a ação da IL-4;

(v) a ativação do complemento permitindo a fagocitose de microorganismos opsonizados; (vi) a ativação de neutrófilos e; (vii) a atividade citolítica das células NK (Schoenborn & Wilson, 2007).

Entre os vários polimorfismos descritos no gene do INF- γ , destaca-se o da região +874 do íntron 1 (Figura 18), coincidindo com a área de ligação do fator nuclear - κ B (NF- κ B). O alelo selvagem desta região é a timina (T), que poderá sofrer mutação para A, resultando em menores níveis séricos do INF- γ , o que segundo alguns estudos tornariam alguns hospedeiros mais suscetíveis a determinadas infecções, como a tuberculose (Pravica *et al.*, 2000; Natividad *et al.*, 2005; Liu, M. *et al.*, 2006).

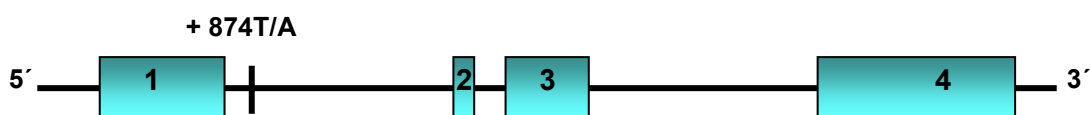


Figura 18- Representação esquemática do gene do INF- γ .

1.6.2.3 Características e funções do TGF- β 1.

O TGF- β pertence a uma família de moléculas intimamente relacionadas codificadas por genes distintos, ditas TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, sendo a primeira a principal delas. O gene responsável pela codificação do TGF- β 1 está no cromossomo 19 (19q13.1), constituído de sete éxons e seis íntrons (Tzakas *et al.*, 2005). É dita uma citocina predominantemente anti-inflamatória da imunidade adaptativa, sendo produzida principalmente por LT e por fagócitos ativados (Abbas *et al.*, 2007).

Possuem ações de inibição da proliferação e da diferenciação de LT e da ativação de macrófagos, além de estimular a produção de IgA e a síntese da matriz

extracelular, como o colágeno, as metaloproteinases, os receptores celulares para a matriz e as integrinas. Com isto executa sua principal função que é de promover o reparo tecidual depois que as reações imunes ou inflamatórias tenham sido controladas (Wells, 2000; Abbas *et al.*, 2007).

O polimorfismo na posição -509 com a substituição de C por T (Figura 19) se relaciona com aumento de produção desta citocina e se associa com elevação do risco e da gravidade de determinadas doenças (Sugiura *et al.*, 2002; Vidigal *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2005).

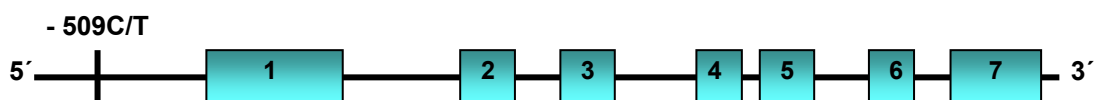


Figura 19- Representação esquemática do gene do TGF- β 1.

1.6.2.3 Características e funções da IL-10.

A IL-10 pertence ao grupo de citocinas da imunidade inata, sendo secretada por macrófagos ativados, por LTc e por outros tipos celulares não-linfóides (Abbas *et al.*, 2007). O gene responsável pela síntese se encontra no braço longo do cromossomo 1 na posição 1q31-q32, composto por cinco éxons e quatro íntrons (Figura 20).

Possui ação inibitória da resposta imune Th1 vista na supressão dos macrófagos, retornando-os ao estado de repouso à medida que a infecção é controlada, através da supressão da produção da IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativadas e da inibição da expressão de co-estimuladores e de moléculas MHC II nestas células

(Abbas *et al.*, 2007). A IL-10 também aumenta a sobrevivência de linfócitos B e a produção de anticorpos. Esta citocina pode bloquear a atividade NF- κ B e está envolvida na regulação padrão de sinalização do JAK-STAT. A região promotora da IL-10 contém vários polimorfismos (Rees *et al.*, 2002), algumas conferindo diminuição da produção da IL-10, como observado na substituição da C pela A na posição 627 pb ou na presença do haplótipo *ATA* (-1082, -819 e -592) e outras associadas com aumento dos níveis séricos desta citocina, como no haplótipo *GCC* (-1082, -819 e -592) ou nos casos de monozigose -1082*GG* (Zhang & Wang, 2006).

A correlação dos níveis da IL-10 com as manifestações clínicas das **-1082A/G** atáticas é alvo de várias pesquisas. Em artigo de revisão, Zhang & Wang (2006) relatam que pacientes com polimorfismos que aumentam a produção da IL-10 tendem a ter uma evolução mais progressiva, enquanto que pacientes com baixa produção desta citocina cursam de forma mais benigna e assintomática. Este fato poderia ser explicado pelo equilíbrio ou elo de equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, uma vez que a menor produção de citocinas do tipo Th2, como a IL-10, permite resposta Th1 pró-inflamatória mais vigorosa (Chan *et al.*, 2008). Neste sentido, Tang *et al.* (2006) observaram que as concentrações séricas da IL-10 estavam significativamente mais elevadas nos pacientes com cirrose hepática inativa pelo VHB do que no grupo controle e no grupo de cirrose em atividade.



Figura 20 - Representação esquemática do gene da IL-10.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Descrever os níveis séricos e os polimorfismos nos genes do TNF- α , INF- γ , TGF- β 1 e IL-10 em pacientes portadores de hepatite B crônica, buscando identificar possíveis marcadores imunogenéticos associados à infecção crônica pelo VHB.

1.7.2 Específicos

i) Comparar os níveis séricos do TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10 em portadores da hepatite B crônica e em indivíduos com imunidade adquirida ao VHB;

ii) Correlacionar os níveis séricos do TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10 em portadores do VHB com:

- a apresentação clínica da infecção crônica pelo VHB;
- os níveis de ALT, AST e GGT;
- a positividade do HBeAg;
- as alterações de atividade necroinflamatórias;
- as alterações de fibrose;
- os níveis de VHB-DNA quantitativo.

iii) Comparar a frequência dos polimorfismos nos genes do TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10 em portadores de hepatite B crônica e em indivíduos com imunidade adquirida ao VHB;

iv) Correlacionar a frequência dos polimorfismos nos genes do TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10 entre portadores do VHB com:

- a apresentação clínica da infecção crônica pelo VHB;
- os níveis de ALT, AST e GGT;
- a positividade do HBeAg;
- as alterações de atividade necroinflamatórias;
- as alterações de fibrose;
- os níveis de VHB-DNA quantitativo.

v) Descrever a correlação entre os polimorfismos dos genes do TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10 com o nível sérico destas citocinas;

vi) Correlacionar os genótipos do VHB-DNA com a apresentação clínica da hepatite B crônica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O presente estudo é do tipo transversal e analítico, realizado em um ambulatório de doenças hepáticas do hospital da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPA), selecionando-se casos consecutivos de pacientes portadores crônicos do VHB atendidos no período de abril de 2006 a junho de 2008.

Como critérios de inclusão, foram utilizados pacientes portadores do HBsAg por mais de seis meses, de ambos os sexos e com idade superior a 12 anos. Foram excluídos, os pacientes com co-infecção pelo VHD, VHC e/ou HIV e pacientes que utilizaram ou que estivessem em uso de terapia antiviral específica contra o VHB.

Todos os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente, por meio da anamnese e exame físico, e submetidos à investigação complementar constando de exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos, virológicos, ultrassonográficos e endoscópicos, além da biópsia hepática, quando possível, sendo os dados transcritos para o protocolo de pesquisa específico (Anexo A). Após esta investigação, os pacientes foram divididos em dois grupos:

i) Grupo A (N= 30) – composto por portadores inativos do VHB, caracterizados por transaminases (ALT e AST) persistentemente normais em um período mínimo de um ano, HBeAg negativo, anti-HBe positivo, VHB-DNA menor que 2.000 UI/mL e/ou histopatológico com ausência de lesão significativa ($A \leq 1$ e $F \leq 1$, classificação de METAVIR);

ii) Grupo B (N= 23) – composto por pacientes portadores de hepatite crônica com ou sem cirrose, caracterizados por alterações clínicas, dos testes hepáticos, HBeAg positivo ou negativo, VHB-DNA acima de 2.000 UI/mL e histopatológico com

fibrose ≥ 2 e < 4 , pela METAVIR. O diagnóstico de cirrose hepática compreendeu a presença de sinais de insuficiência hepatocelular e hipertensão portal e/ou histopatologia hepática com fibrose igual a 4, pelo METAVIR.

Os casos de CHC foram diagnosticados pela presença de imagem nodular em dois exames de imagem e dosagem de alfafetoproteína (AFP) maior de 200 ng/mL.

O grupo controle consistiu em 100 indivíduos oriundos do ambulatório de doenças hepáticas, de militares das forças armadas e de profissionais do sexo portadores de imunidade natural ao VHB, ou seja, anti-HBc IgG e anti-HBs positivos, além de negatividade para o anti-HCV e anti-HIV.

O grupo controle procedente do ambulatório de doenças hepáticas foi selecionado no período de estudo, enquanto que o grupo de militares e de profissionais do sexo procedeu do banco de amostras existente no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

2.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

2.2.1 Exames hematológicos e bioquímicos

Os exames hematológicos e bioquímicos foram realizados no laboratório de análises clínicas da FSCMPA, utilizando metodologia padrão de rotina do laboratório. Tais exames eram constituídos de hemograma, testes hepáticos (ALT, AST, bilirrubinas totais e frações, proteínas totais e frações; tempo e atividade protrombínica - TAP, fosfatase alcalina, GGT e AFP), uréia, creatinina, glicemia, colesterol e frações, triglicerídeos, TSH e T4 livre.

2.2.2 Sorologia e Dosagem Quantitativa do DNA do VHB

Os exames sorológicos e quantificação da carga viral do VHB-DNA foram realizados no Laboratório da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas/Serviço de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS).

O sangue venoso de cada paciente foi coletado em tubos a vácuo sem anticoagulante. Após a retração do coágulo em temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado a 1500g por 20 minutos, para separação do soro, o qual foi dividido em duas alíquotas, sendo uma destinada para as dosagens sorológicas e a outra mantida congelada a -70°C para a pesquisa do ácido nucléico viral.

Os testes diagnósticos das infecções pelo VHB, VHC e VHD foram realizados por meio de ensaios imunoenziáticos (EIE), tipo ELISA, com *kits* comerciais. Todos os soros foram examinados para a presença de HBsAg (Organon Teknika[®], Holanda), anti-HBc (Organon Teknika[®], Holanda), anti-HBs (Abbott[®], EUA) e anti-VHC (Ortho Clinical Diagnostics[®], Alemanha). Nas amostras positivas para o HBsAg efetuou-se a pesquisa do HBeAg, anti-HBe, anti-HBc IgM e anti-HD (Organon Teknika[®], Holanda).

O DNA-VHB foi pesquisado do modo qualitativo e quantitativo utilizando-se *kits* comerciais do laboratório Roche[®] (Cobas AmpliCor HBV Monitor Test[™], Suíça) que se baseia na amplificação e hibridização do DNA viral.

2.2.3 Genotipagem do DNA do VHB

Os dados de genotipagem foram obtidos mediante resultados de outra pesquisa paralela, igualmente aprovada por Comitê de Ética em Pesquisa, realizada para fins de doutoramento a qual incluía em sua casuística amostras dos pacientes cronicamente infectados pelo VHB, também selecionados no presente estudo.

A genotipagem do DNA do VHB foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Fundação HEMOPA e no Laboratório de Virologia do ICB/UFPA, através do sequenciamento dos genes S, *pré-core* e *core* do VHB (Pinheiro, 2010).

2.2.4 Dosagem dos níveis séricos do TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10.

A determinação quantitativa das concentrações plasmáticas de TNF- α , do INF- γ , do TGF- β 1 e da IL-10 foi realizada no Laboratório de Virologia do ICB/UFPA, utilizando-se EIE (Human ELISA Ready-SET-Go, EBioscience, Inc. *California, San Diego, USA*). Este teste se baseia na utilização de um anticorpo monoclonal específico para cada um dos marcadores acima, obedecendo aos protocolos dos mesmos.

Foram utilizados anticorpos monoclonais de captura (250x), fornecidos pelo fabricante, diluídos em uma solução tamponada (tampão de cobertura), para a sensibilização prévia dos micropoços durante um período de 12h (*over-night*), a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com aproximadamente 300 μ l de PBS 1x + 0.05% Tween-20, sendo adicionado posteriormente 200 μ L de solução diluente de teste, com a finalidade de preencher espaços não ocupados com o anticorpo de captura.

Após 1 hora, as placas foram novamente lavadas e então foram aplicadas as amostras de plasma (100 μ L). Nesta etapa também foram utilizadas diluições seriadas a partir de uma solução padrão (*standard*) para a formação de uma curva padrão. As amostras incubaram por um período de 2 horas a temperatura ambiente. Na detecção e quantificação da citocina TGF- β 1, as amostras de plasma foram previamente diluídas em PBS 1x (1:10) e foi adicionado 20 μ L de HCl [1N] para que as formas latentes desta citocina fossem ativadas em formas imunorreativas. Após a incubação, uma nova etapa de lavagem foi realizada para que fosse adicionado aos poços um segundo anticorpo

(anticorpo de detecção). Após 1 hora e novas lavagens, foi adicionada uma solução de avidina-HRP, incubando-se durante 30 minutos. A penúltima etapa do teste consistiu na aplicação de 100 µL de uma solução substrato 1x (Tetrametilbenzidina). Após aproximadamente 15 minutos foi adicionado aos poços 50 µL do reagente de parada da reação (H₂SO₄ [2N]) realizando-se, então, a leitura em filtro de 450nm.

As sensibilidades dos testes foram de 4 a 500 pg/mL para o TNF-α, 4 a 500 pg/mL para o INF-γ, 60 a 8.000 pg/mL para o TGF-β1 e de 2 a 300 pg/mL para a IL-10, de acordo com os padrões pré-estabelecidos dos *kits* da ebioscience®.

2.2.5 Avaliação dos polimorfismos nos genes do TNF-α, INF-γ, TGF-β1 e IL-10.

A avaliação dos polimorfismos foi realizada no Laboratório de Virologia do ICB/UPFA, por meio da amplificação gênica, utilizando-se PCR seguida da análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) ou por meio de amplificação usando iniciadores alelo específicos (Tabela 3), cuja metodologia será descrita a seguir.

2.2.5.1 Extração do DNA

Utilizou-se método de extração de DNA total a partir de células do sangue total periférico das amostras, de acordo com o protocolo do *kit* de isolamento de ácido nucléico da *Puregene (Gentra Systems, Inc., USA)*, seguindo as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

2.2.5.2 Polimorfismo do TNF- α

O polimorfismo -308G/A na região promotora do gene do TNF- α foi investigado utilizando-se um volume final de 25 μ L, contendo 50 ng de DNA total extraído, 0,2 μ M de cada dNTP, 5 pmol/ μ L de cada iniciador, MgCl₂ 1,5 μ M, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores empregados nesta reação foram: TNF-FW 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' e TNF-R 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC ATT CG-3', os quais amplificam um segmento de 107 pb (Allen *et al.*, 2000).

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 1 minuto à 94°C (desnaturação), 1 minuto à 58°C (hibridização), 1 minuto à 72°C (extensão) e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

O produto da amplificação foi digerido pela enzima de restrição *Nco*I (Invitrogen, USA) a 37°C por 5 horas, em uma reação contendo 7 μ L do produto amplificado, 5 U da enzima, 2,5 μ L de tampão 10X e 8 μ L de água estéril.

Durante a PCR é amplificado um fragmento de 107pb que pode ou não conter um sítio de restrição para a enzima *Nco*I. Em portadores do alelo *G*, esse sítio de restrição é mantido, o que resulta após digestão na formação de dois fragmentos menores, um de 87bp e outro de 20bp. Nos portadores do alelo *A*, o sítio de restrição é perdido, mantendo-se assim o fragmento íntegro com 107bp.

Os produtos das amplificações e digestão enzimática foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 3%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000

mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), por meio de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

2.2.5.3 Polimorfismo do INF- γ

O polimorfismo do INF- γ na posição +874T/A, no primeiro íntron, foi investigado através da técnica da PCR (Pravica *et al.*, 2000).

A reação utilizou um volume final de 30 µL, contendo 50 ng de DNA total extraído, 0,2 µM de cada dNTP, 5 pmol/µL de cada iniciador, MgCl₂ 2,0 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. Os iniciadores desta reação foram o INF- γ (+874) PC 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3'; INF- γ (+874) T 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3' ou INF- γ (+874) A 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3', os quais amplificam um segmento de 262 pb (Pravica *et al.*, 2000).

A reação de amplificação consistiu em: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 40 segundos à 94°C (desnaturação), 40 segundos à 56°C (hibridização), 50 segundos à 72°C (extensão) e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

A interpretação do resultado foi determinada pela presença ou ausência do produto amplificado conforme o iniciador alelo-específico utilizado.

Os produtos das amplificações foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 2,5%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL) com uso do transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

2.2.5.4 Polimorfismo do TGF- β 1

A identificação do polimorfismo da região -509C/T do TGF- β 1 obedeceu à técnica proposta por Hsieh *et al* (2005), utilizando a PCR para amplificação da região citada seguida da análise de RFLP.

A PCR conteve um volume final de 25 μ L com 50 ng de DNA total extraído, 10 pmol de cada iniciador, 10 nM de Tris-HCl pH 8,3, KCl, 2,0 nM de MgCl₂, 0,2 μ M de cada dNTP e 1 U de *Taq* DNA polimerase, além dos seguintes iniciadores: TGF- β 1-FW 5'-GGA GAG CAA TTC TTA TAG GTG -3' e TGF- β 1-R 5'-TAG GAG AAG GAG GGT CTG TC-3', os quais amplificaram um fragmento de 120 pb.

A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 30 segundos à 95°C (desnaturação), 30 segundos à 60°C (hibridização), 30 segundos à 72°C (extensão) e uma extensão final de 5 minutos à 72°C.

O produto da amplificação foi digerido pela enzima de restrição *DdeI* (Invitrogen, USA) a 37°C por 3 horas, em uma reação contendo 15 μ L do produto amplificado, 0,5 U da enzima, 2 μ L de tampão 10X e 3 μ L de água estéril. A presença de um fragmento não digerido de 120 pb identifica o alelo *T* e a presença de dois fragmentos digeridos de 74 e 46 pb, o alelo *C*.

Os produtos das amplificações e da análise de RFLP foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 4% revelados pelo brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.2.5.5 Polimorfismo da IL-10

A identificação dos polimorfismos da IL-10 -1082A/G obedeceu à metodologia proposta por Lee *et al.* (2005), a qual se utilizou a análise da RFLP para a identificação dos alelos *C* e *G*.

A reação de PCR conteve um volume final de 50µL com 50 ng de DNA total extraído, 10 pmol de cada iniciador, 10 nM de Tris-HCl pH 8,3, KCl, 1,5 nM de MgCl₂, 0,2 µM de cada dNTP e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase, além dos seguintes iniciadores: IL-10 FW 5'- TCT GAA GAA GTC CTG ATG TC-3' e IL-10 R 5'- CTC TTA CCT ATC CCT ACT TCC-3', os quais amplificaram um fragmento de 190 pb.

As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 1 min segundos à 94°C, 1 min à 58°C, 1 min à 72°C e uma extensão final de 10 minutos à 72°C.

O produto da amplificação foi digerido pela enzima de restrição *MnII* (Invitrogen, USA) a 37°C por 4 horas, em uma reação contendo 15 µL do produto amplificado, 0,5 U da enzima, 3 µL de tampão 10X e 11 µL de água estéril.

Identifica-se o alelo *A* após a digestão, quando se obtém duas bandas na eletroforese, uma de 125 e outra de 65 pb. O alelo *G* é identificado na presença de três bandas de 93, 65 e 32 pb.

Os produtos das amplificações e da análise de RFLP foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 4% revelados pelo brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

Tabela 2 – Relação dos polimorfismos nos genes das citocinas estudadas.

Polimorfismo	Técnica	Iniciadores	Alelos
TNF- α -308G/A	RFLP (<i>NcoI</i>)	TNF-α FW 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' TNF-α R 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC ATT CG-3'	G: 87 pb 20 pb A: 107 pb
INF- γ +874T/A	SSP-PCR	INF-γ PC 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3' INF-γ T 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3' INF-γ A 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3	T: 262 pb A: 262 pb
TGF- β 1 -509C/T	RFLP (<i>DdeI</i>)	TGF-β1FW 5'-GGA GAG CAA TTC TTA TAG GTG -3' TGF-β1 R 5'-TAG GAG AAG GAG GGT CTG TC-3'	C: 74 pb 46 pb T: 120 pb
IL-10 -1082A/G	RFLP (<i>MnII</i>)	IL-10 FW 5'- TCT GAA GAA GTC CTG ATG TC-3' IL-10 R 5'- CTC TTA CCT ATC CCT ACT TCC-3'	A: 125 pb 65 pb G: 93 pb 65 pb 32 pb

2.3 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

Os pacientes submetidos à biópsia hepática encontravam-se de acordo com a mesma (incluindo-se a assinatura do termo de consentimento) e possuíam TAP igual ou superior a 65 % e plaquetas acima de 100.000 / mm³.

As biópsias foram realizadas com agulha de Trucut e marcadas pela ultrassonografia. Cada espécime foi examinado no Laboratório da Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina/UFPA, obedecendo às rotinas do serviço, submetida às colorações de hematoxilina-eosina (HE), cromotrope azul de anilina (CAB), reticulina de Gomori e orceína de Shikata.

O diagnóstico histopatológico obedeceu a classificação francesa de METAVIR (Bedossa & Poynard, 1996), pontuando o grau de atividade inflamatória de 0 a 3 e o estadiamento da fibrose de 0 a 4.

2.4 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Para a análise estatística foram utilizados os programas EPIINFO 6.04 b e BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2008). Para a análise de dados paramétricos utilizaram-se os testes estatísticos ANOVA de um e de dois critérios e o teste T de Student. Os dados não paramétricos foram analisados pelos testes de χ^2 , de Kruskal-Wallis H e correlação de Spearman. Nos casos de análise de variância, utilizou análise multivariada de Hotelling. Estabeleceu-se em 0,05 (5 %) o nível de rejeição da hipótese de nulidade (valor de $p \leq 0,05$).

2.5 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FSCMPA, conforme prevê a resolução no. 196/96 do CNS/MS, que trata de pesquisa em seres humanos (Anexo B).

Os pacientes selecionados foram informados sobre os objetivos da pesquisa e deram seu consentimento, após todos os esclarecimentos, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C). A permissão para a utilização das amostras oriundas do banco de amostras do Laboratório de Virologia do ICB/UFPA foi dada pela chefia do laboratório com a anuência do CEP/FSCMPA (Anexo D), reconhecendo que não se poderia entrar em contato direto com estes indivíduos, assim como respeitando os TCLE assinados por estes, no

momento de sua pesquisa original, autorizando a utilização do material biológico em outros projetos desde que devidamente aprovados por órgão competentes.

3 RESULTADOS

Foram selecionados 53 casos consecutivos de pacientes portadores de hepatite B crônica, obedecendo aos critérios de inclusão. Destes, 30 foram diagnosticados como portadores inativos (grupo A) e 23 como portadores de hepatite crônica com ou sem cirrose (grupo B).

Os dados demográficos dos grupos de pacientes e do grupo controle estão demonstrados nas Tabelas 3 e 4. Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis sexo e idade entre o grupo de pacientes e controle. O sexo masculino se apresentou como fator de risco para a cronificação do VHB, em torno de 3,3 vezes ($p= 0,001$; IC 95% 1,639-6,689).

Dividindo-se o grupo B, em portadores de hepatite crônica com e sem cirrose hepática, identificou-se maior prevalência de homens em ambos os grupos (80% vs. 69,3%), contudo os cirróticos possuíam maior média de idade, $54,12 \pm 13,2$ vs. $33 \pm 13,7$ anos, respectivamente ($p= 0,03$).

Tabela 3 – Distribuição por sexo e média de idade dos pacientes portadores de hepatite B crônica e do grupo controle.

Variáveis	Portadores de hepatite B crônica N= 53	Grupo Controle N= 100	<i>p</i>
Sexo			
Masculino	36 (67,9 %)	39 (39,0 %)	0,0006*
Feminino	17 (30,1 %)	61 (61,0 %)	
Média de Idade (anos \pm DP)	$42,05 \pm 15,51$	$36,83 \pm 14,13$	0,015**

* χ^2 ; ** Teste T de Student; N= número de indivíduos.

Tabela 4 – Características demográficas dos grupos A e B dos pacientes portadores de hepatite B crônica.

Variáveis	Grupo A N: 30	Grupo B N: 23	<i>p</i>
Sexo			
Masculino	19 (63,3 %)	17 (73,9 %)	0,6024*
Feminino	11 (36,7 %)	6 (26,1 %)	
Média de Idade (anos ± DP)	44,27 ± 15,17	41,48 ± 16,16	0,4037**
Procedência†			
RMB	25	10	0,7898***
Nordeste	1	2	
Sudeste	1	5	
Tocantins/Marajó	2	3	
Sudoeste	1	3	
Cor da Pele			
Pardo	28	16	0,0556*
Negro	2	7	
Estado Civil			
Solteiro	3	10	0,8019***
Casado/União Consensual	26	11	
Separado/Divorciado	1	2	

† Macroregiões do Estado do Pará; RMB- região metropolitana de Belém; * χ^2 ; ** Teste Kruskal-Wallis H; *** Análise multivariada – Hotteling; N= número de indivíduos.

Os resultados das possíveis vias de aquisição da infecção e da prevalência do etilismo estão destacados na Tabela 5. Nota-se que não houve relatos de tatuagem, *piercing* ou acupuntura.

Tabela 5 – Ocorrência de etilismo e possíveis rotas de aquisição do VHB nos grupos A e B.

Variáveis	Grupo A N: 30	Grupo B N: 23	P
Etilismo *	12 (40%)	7 (30,4%)	0,294
Cirurgia Prévia **	12 (40%)	6 (26,1%)	> 0.05
Comportamento Sexual de Risco **			
Heterossexual promíscuo	4 (13,3%)	5 (21,7%)	> 0.05
Homossexual	0	1 (2,3%)	
Hemotransusão **	2 (6,7%)	2 (4,6%)	> 0.05
Portadores de VHB na família **	3 (10%)	5 (21,7%)	> 0.05
Uso de drogas ilícitas **	2 (6,7%)	2 (4,6%)	> 0.05

* Teste T de Student ; ** Análise Mutivariada - Hotteling ; N= número de indivíduos.

3.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E SOROLÓGICA

Entre os 23 pacientes do grupo B, treze foram classificados como portadores de hepatite crônica sem cirrose e dez como portadores de cirrose hepática. Os sinais e sintomas mais prevalentes (Figura 21) foram dor abdominal (26%); esplenomegalia (26%), astenia (17,3%), edema de membros inferiores (17,3%) e telangiectasias (17,3%).

Diagnosticou-se CHC em três pacientes, sendo dois homens e uma mulher. Dois casos foram detectados desde as primeiras avaliações e o terceiro durante o seguimento com triagem para o CHC em pacientes cirróticos. Nos três casos, o HBeAg era negativo, carga viral abaixo de 10^4 cópias/mL e o tumor diagnosticado por exames de imagem (ultrassonografia e ressonância nuclear magnética) e elevação da AFP acima de 200 ng/dL, tendo todos evoluídos ao óbito.

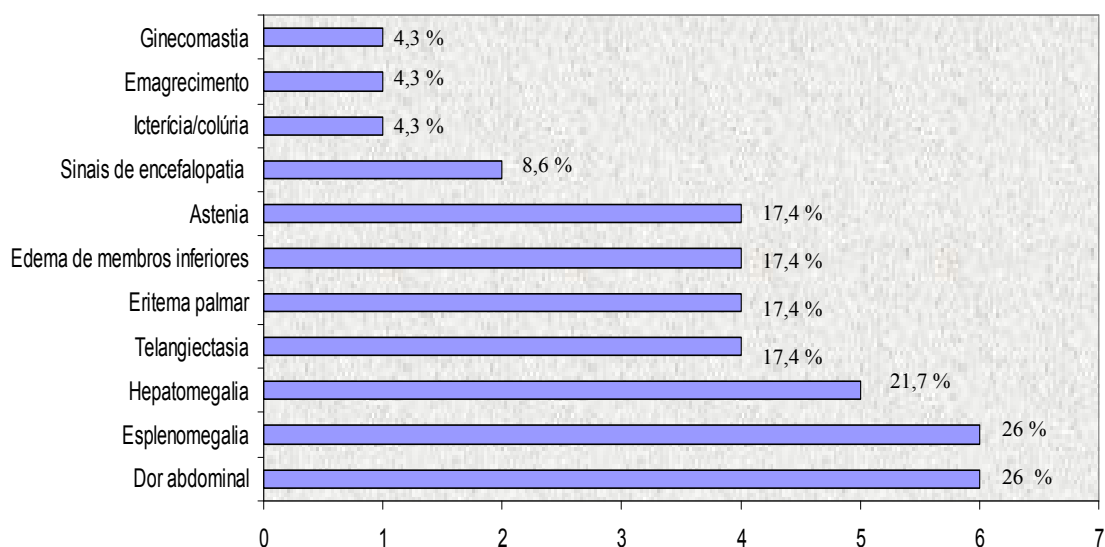


Figura 21 - Sinais e sintomas prevalentes entre os pacientes portadores de hepatite B crônica, grupo B.

A comparação dos resultados dos testes hematológicos e bioquímicos entre os grupos A e B encontra-se na Tabela 6. Os valores médios de AST, ALT, GGT e fosfatase alcalina mostraram diferenças significativas entre os dois grupos.

A positividade do HBeAg ocorreu em 43,5% (10/23) no grupo B, significativamente maior do que no grupo A (Tabela 6). Analisando o grupo B em separado, encontrou-se este antígeno em 53,8% (7/13) entre os não cirróticos e em 30% (3/10) dos cirróticos, diferença percentual estatisticamente não significativa ($\chi^2 = 2,6$; $p = 0,226$).

Tabela 6 – Resultados de testes hematológicos, bioquímicos e sorológicos dos pacientes portadores de hepatite B crônica dos grupos A e B.

Variáveis	Grupo A N= 30	Grupo B N= 23	<i>p</i> *	
Hematócrito (13 – 16 g%)	41,90 ± 2,81	39,47 ± 5,0	0,0694	
Leucócitos (6.000 – 8.000 / mm3)	6.215 ± 1.706	7.953 ± 11.566	0,6413	
Plaquetas (200.000-400.000 / mm3)	163.739 ± 79.130	128.583 ± 89.359	0,1232	
AST (16 – 40 IU/L)	29,53 ± 15,5	90,33 ± 80,97	0,001	
ALT (08 – 54 IU/L)	31,76 ± 17,54	100, 19 ± 118,4	0,001	
Albumina (3,5 – 5,5 g/dl)	4,52 ± 0,79	4,19 ± 0,69	0,042	
Atividade Protrombínica (> 70%)	94,76 ± 19,68	87,38 ± 27,01	0,247	
Bilirrubinas totais (0,4 – 1,4 mg/dl)	0,71 ± 0,25	1,10 ± 0,66	0,075	
GGT (08 – 63 IU/L)	35,16 ± 21,99	113,40 ± 159,42	0,001	
Fosfatase alcalina (36 – 96 IU/L)	90,64 ± 28,66	153,20 ± 77,85	0,002	
HBeAg				
	Positivo	0	10	0,003**
	Negativo	30	13	

* Teste Kruskal-Wallis H; ** $\chi^2 = 16,077$; N = número de indivíduos.

Entre os 53 pacientes, 32 se submeteram a biópsia hepática. Para a análise da atividade necroinflamatória, os resultados foram agrupados nos escores 0/1 e 2/3. Da mesma forma, os escores de fibrose foram agrupados em 0/1 e 2/3/4 (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição de resultados histopatológicos, de acordo com a atividade e com o estadiamento de fibrose, segundo a classificação METAVIR.

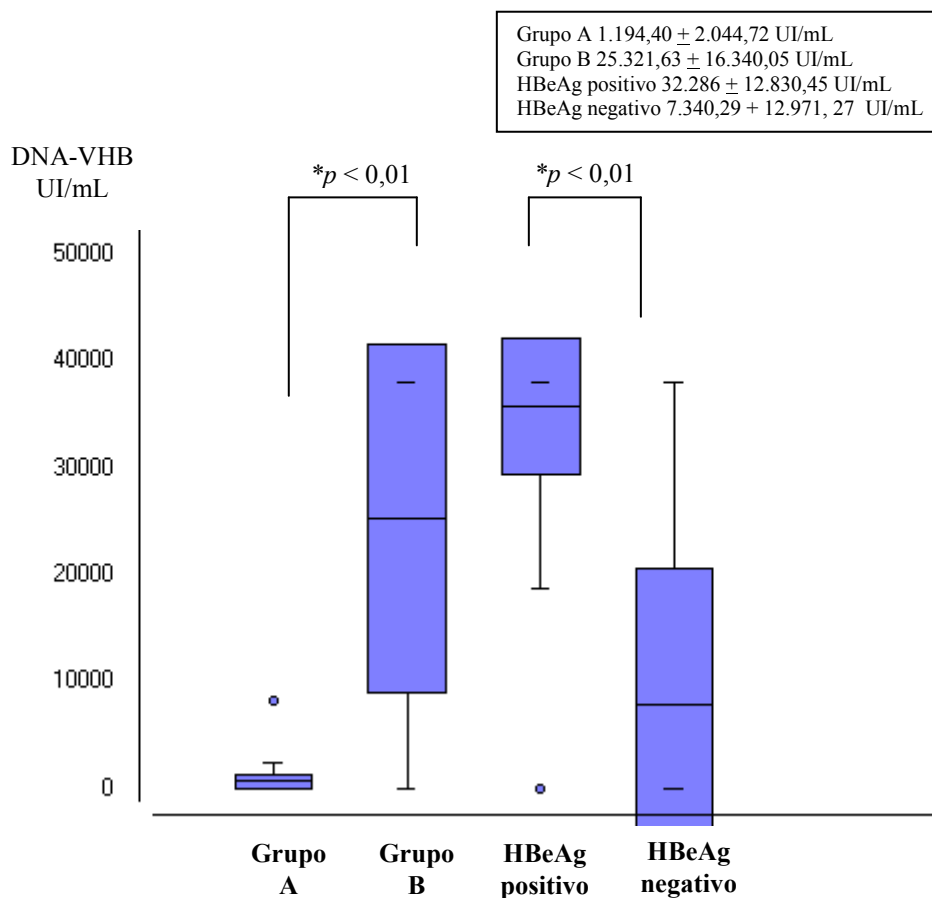
Atividade Metavir		Fibrose Metavir	
0/1 N (%)	2/3 N (%)	0/1 N (%)	2/3/4 N (%)
26 (81,25)	6 (8,75)	22 (68,75)	10 (31,25)

N= número de indivíduos.

3.2 ANÁLISES MOLECULARES

A análise dos resultados moleculares obtidos nos grupos A e B, demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as médias das cargas virais (Figura 22), encontrando-se valores de $1.194,40 \pm 2.044,72$ UI/mL para o grupo A e $25.321,63 \pm 16.340,05$ UI/mL para o B.

A associação entre a carga viral e a presença do HBeAg identificou maiores níveis de DNA-VHB nos positivos do que nos negativos para este antígeno ($32.286 \pm 12.830,45$ UI/mL vs. $7.340,29 \pm 12.971,27$ UI/mL), com $p < 0,001$ (Figura 22).



* Teste Anova

Figura 22 – Associação da carga viral do VHB entre os grupos A e B e entre os HBeAg positivos e negativos.

Em 40 amostras, foi possível identificar o genótipo do DNA-VHB (Tabela 8), sendo 95% (38/40) pertencente ao genótipo A e 5% (2/40) ao D. Entre os pacientes com genótipos A, encontrou-se 92,1 % (35/38) de subgenótipo A1 e 7,9% (3/38) de A2.

Os subtipos relacionados ao subgenótipo A1 foram o ayw1 (18/35) e o adw2 (17/35), enquanto os relacionados ao A2 e D foram o adw2 e o ayw3, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 – Genótipos, subgenótipos e subtipos do DNA-VHB de 40 amostras de pacientes portadores de hepatite B crônica, distribuídos nos grupos A e B.

Características virológicas	Grupo A N (%)	Grupo B N(%)	Total N(%)
<i>Genótipos*</i>			
A	19 (90,5)	19 (100)	38 (95)
D	2 (09,5)	0	2 (05)
Total	21 (100)	19 (100)	40 (100)
<i>Subgenótipos**</i>			
A1	17 (89,5)	18 (94,7)	35 (92,1)
A2	2 (10,5)	1 (05,3)	3 (07,9)
Total	19 (100)	19 (100)	38 (100)
<i>Subtipos***</i>			
ayw1/genótipo A1	8 (38,1)	10 (52,6)	18 (45,0)
adw2/genótipo A1	9 (42,9)	8 (42,1)	17 (42,5)
adw2/genótipo A2	2 (09,5)	1 (05,3)	3 (07,5)
ayw3/ genótipo D	2 (09,5)	0	2 (05,0)
Total	21 (100)	19 (100)	40 (100)

* χ^2 correção Yates $p= 0,5133$; ** χ^2 correção Yates $p= 0,5475$; *** Análise multivariada de Hotteling $p= 0,3797$; N= número de indivíduos.

A análise da associação entre os subgenótipos A1 e A2 com a apresentação clínica, portador inativo, hepatite crônica sem cirrose e com cirrose hepática, não demonstrou diferenças significativas (Tabela 9).

Não foram observadas associações entre os genótipos e a carga viral, assim como não se encontrou associação dos genótipos com a presença ou não do HBeAg (Tabela 10).

Tabela 9 – Associação dos genótipos e subgenótipos do DNA-VHB com a apresentação clínica da hepatite B crônica.

Genótipos e Subgenótipos	Portador Inativo N=21	Hepatite crônica N=12	Cirrose Hepática N=7
A1 (N= 35)	17	12	6
A2 (N= 3)	2	0	1
D (N=2)	2	0	0

Teste Anova $p= 0,074$; N= número de indivíduos.

Tabela 10 – Associação dos genótipos do DNA-VHB com a positividade do HBeAg e nível sérico do DNA-VHB.

Variáveis	Genótipo A1 N=35	Genótipo A2 N=3	Genótipo D N=2
HBeAg*			
Positivo	7	1	0
Negativo	28	2	2
Carga Viral** UI/mL	17.616,24 ± 17.691,41	19.438,50 ± 26.249,92	103,0 ± 60,81

* $\chi^2 = 0,296$, $p= 0,846$; ** Teste Anova A1 e A2 $p= 0,4076$; N= número de indivíduos.

3.3 – RESULTADOS DOS NÍVEIS SÉRICOS E DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DE CITOCINAS

3.3.1 – TNF- α

A distribuição dos polimorfismos do TNF- α -308G/A no grupo de pacientes portadores de hepatite B crônica e no grupo controle foi semelhante (Tabela 11). Por outro lado, a comparação entre o grupo B e controle demonstrou maior

prevalência do genótipo *GA* no grupo B, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,019$). Também foi observada diferença estatística na proporção do alelo *A* entre o grupo B e controle ($p=0,001$). Observou-se ainda um risco 2,6 vezes maior de infecção crônica pelo VHB em portadores do alelo *A* (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição do polimorfismo TNF- α -308G/A nos grupos de portadores de hepatite B e grupo controle.

TNF- α -308	Grupo Controle N (%)	Hepatite B Crônica N (%)	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)	Odds Ratio	<i>p</i>
Genótipos						0,019 ^c
<i>GG</i>	82 (84,5)	41 (77,3)	23 (76,6)	12 (51,2)		
<i>GA</i>	14 (14,4)	10 (18,9)	6 (20,0)	10 (43,3)		
<i>AA</i>	1 (1,1)	2 (3,8)	1 (3,4)	1 (4,5)		
Total	97 (100)	53 (100)	30 (100)	23 (100)		
Alelos						
<i>G</i>	178 (91,7)	92 (86,8)	52 (86,7)	34 (73,9)	2,587 ^a	0,001 ^d
<i>A</i>	16 (08,3)	14 (13,2)	8 (13,3)	12 (26,1)	2,294 ^b	
Total	194 (100)	106 (100)	60 (100)	46 (100)		

^a Grupo controle e Hepatite B crônica ($p=0,011$, IC 95% 1,277-5,241); ^b Grupo A e Grupo B ($p=0,157$, IC 95% 0,849-6,196); ^c $\chi^2 = 11,703$ grupo B vs. grupo controle; ^d $\chi^2 = 11,332$ grupo B vs. grupo controle; N= número de cromossomos.

A análise da associação dos resultados de testes bioquímicos, da viremia e da presença do HBeAg com os genótipos do TNF- α -308G/A não mostrou diferenças estatísticas entre si (Tabela 12).

O nível sérico médio de TNF- α nos portadores de hepatite B crônica e no grupo controle foi de $20,04 \pm 9,44$ pg/mL e $21,44 \pm 15,79$ pg/mL, respectivamente ($p=0,574$). Quando se avaliou estes níveis nos grupos A ($20,55 \pm 9,99$ pg/mL), B ($19,34 \pm$

8,81 pg/mL) e controle ($21,44 \pm 15,78$ pg/mL), as médias também se apresentaram semelhantes, com $p > 0,05$ (Figura 23).

Tabela 12 – Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, da carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos do TNF- α -308G/A.

Variáveis	TNF-α -308GG N=41	TNF-α -308AG N=10	TNF-α -308AA N=2
Média de AST (UI/L)*	72,42 \pm 97,85	32,5 \pm 14,89	35,0 \pm 31,11
Média de ALT (UI/L)*	60,28 \pm 63,25	48,6 \pm 14,89	34,5 \pm 9,19
Média de GGT (UI/L)*	59,41 \pm 68,90	55,12 \pm 33,59	32,50 \pm 13,43
DNA-VHB (UI/mL)*	17.692 \pm 47.718	9.042 \pm 16.423	19.035 \pm 26.819
HBeAg positivo**	9	2	0

*Teste Kruskal-Wallis H ($p > 0,05$); ** $\chi^2 = 0,563$, $p = 0,754$; N= número de indivíduos.

Não houve diferença entre os níveis séricos do TNF- α com os polimorfismos do TNF- α -308G/A (Tabela 13), assim como também não entre as concentrações séricas e a positividade ou não do HBeAg ($p = 0,643$), onde os níveis foram de $22,21 \pm 11,96$ e $19,55 \pm 8,94$ pg/mL, respectivamente.

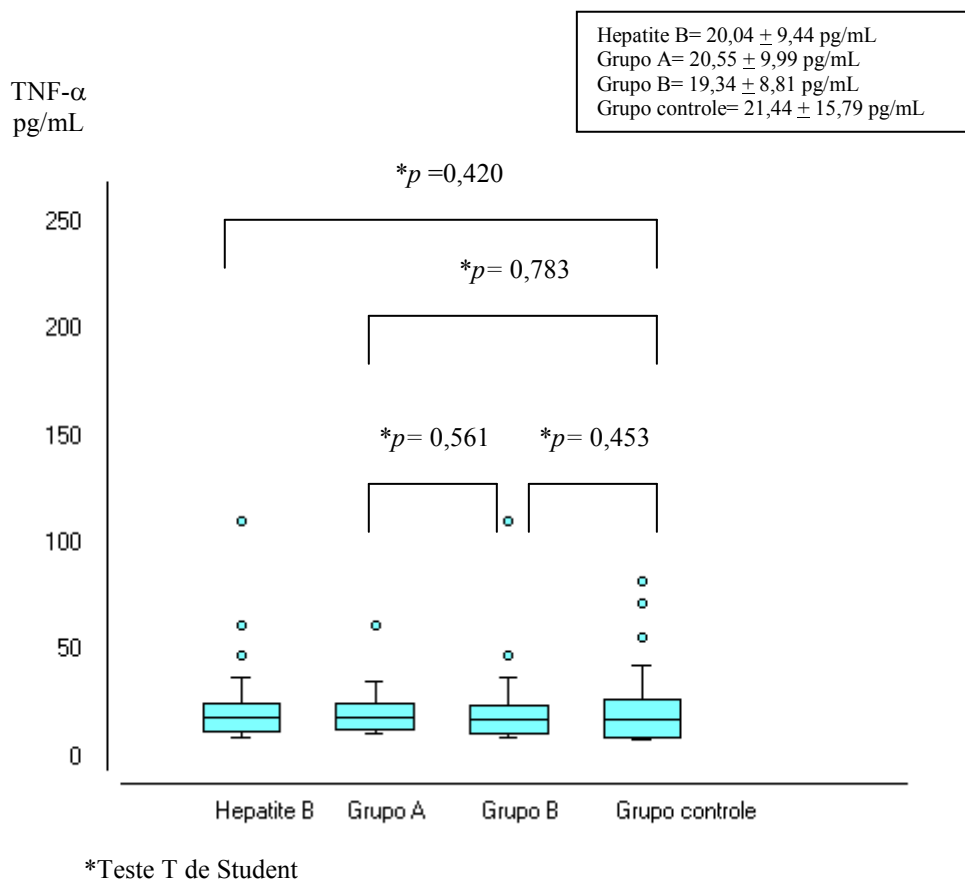


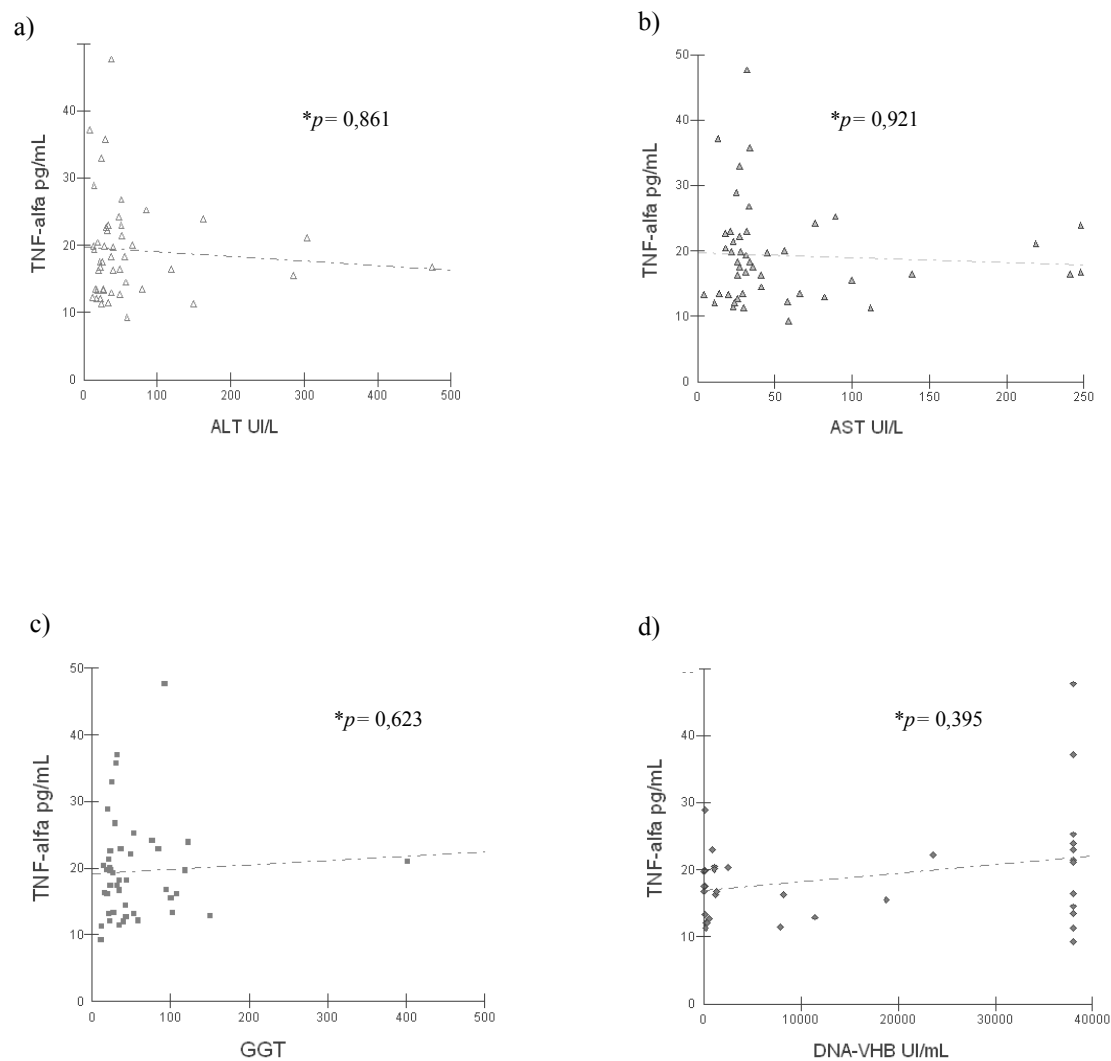
Figura 23 – Nível sérico médio do TNF- α nos portadores de hepatite B, grupo A, grupo B e grupo controle.

Tabela 13 – Associação do nível sérico do TNF- α com os polimorfismos do TNF- α - 308G/A.

Variável	TNF- α -308GG N=123	TNF- α -308AG N=24	TNF- α -308AA N=3
Nível sérico TNF- α (pg/mL)	24,24 \pm 22,93	20,74 \pm 14,42	18.30 \pm 3,31

Teste Kruskal-Wallis H $p=0,833$; N= número de indivíduos.

A avaliação do nível sérico do TNF- α com os níveis de ALT, AST, GGT e carga viral não mostraram ocorrência de correlações entre estas variáveis (Figura 24).

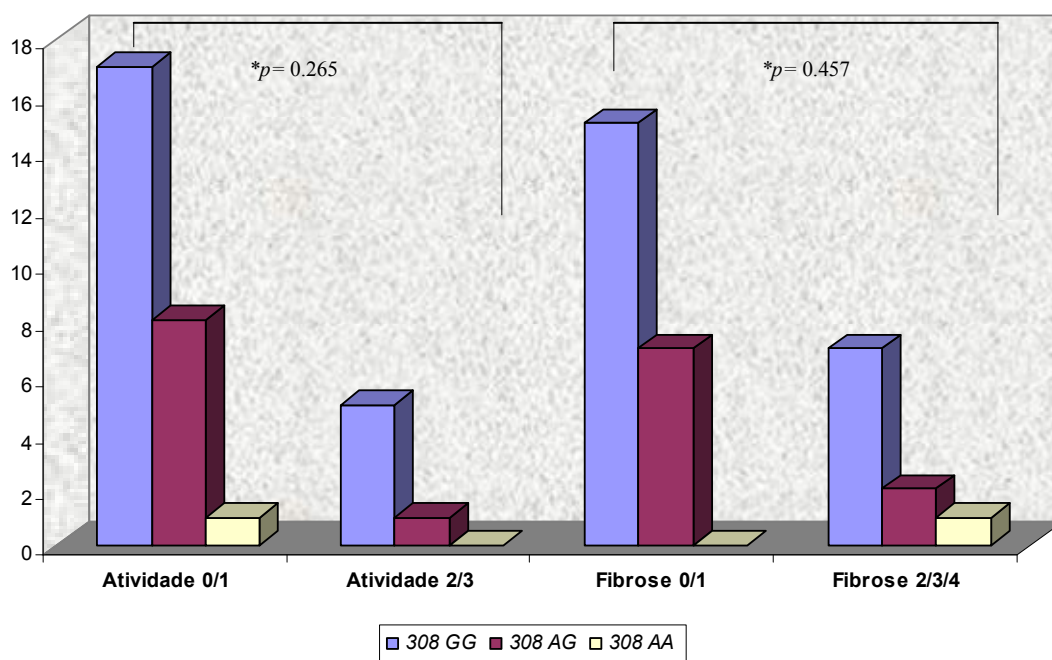


*Correlação linear de Spearman

Figura 24 – Correlação dos níveis séricos do TNF- α com ALT (a), AST (b), GGT (c) e da carga viral do VHB (d).

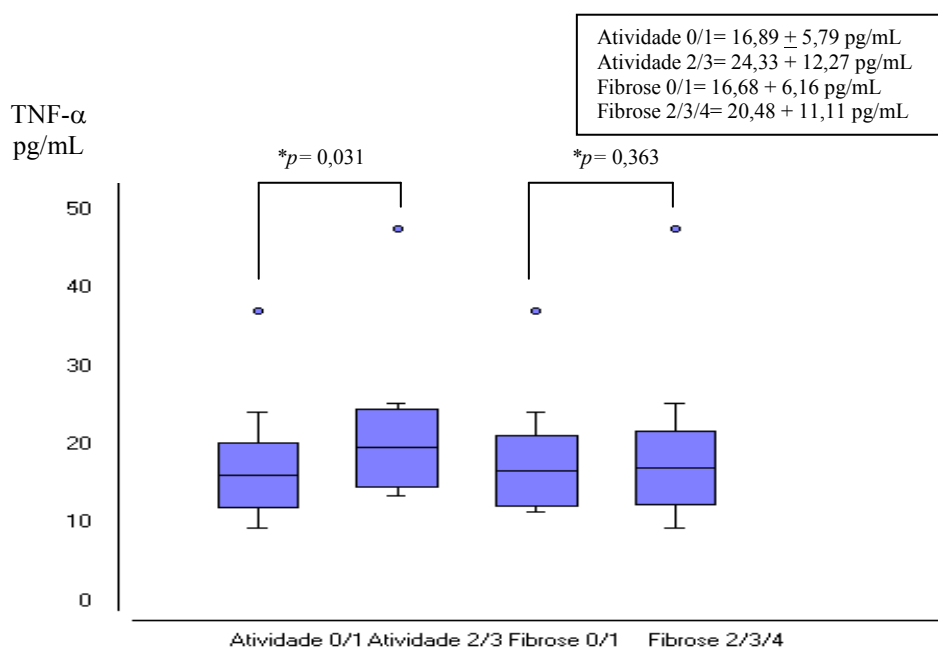
A avaliação da histopatologia hepática revelou que não houve diferença estatisticamente significativa na correlação do polimorfismo do TNF- α -308A/G com a

atividade inflamatória ou com a fibrose (Figura 25), porém os níveis séricos do TNF- α foram significativamente maiores na atividade moderada e intensa (2/3), como demonstrado na Figura 26.



* Análise Multivariada - Hotteling

Figura 25 – Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo do TNF- α - 308G/A, segundo a classificação histopatológica METAVIR.



* Teste T de Student

Figura 26 – Associação dos níveis séricos do TNF- α com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR.

3.3.2 Interferon- γ

A distribuição genotípica para o polimorfismo INF- γ +874T/A no grupo controle e nos pacientes com hepatite B crônica foi similar, com maior prevalência do genótipo AA em ambos os grupos (Tabela 14). A análise desta distribuição entre o grupo controle e os grupos A e B identificou maior frequência do genótipo TA no grupo A do que nos demais, sem que as diferenças fossem significantes (Tabela 14).

Em todos os grupos estudados, o alelo mutante A foi o mais prevalente e sua ocorrência parece não influenciar o risco de desenvolvimento da doença crônica (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição do polimorfismo INF- γ +874T/A no grupo de portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle.

INF- γ +874	Grupo Controle N (%)	Hepatite B Crônica N (%)	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)	Odds Ratio	<i>p</i>
Genótipos						0,364 ^c
<i>TT</i>	9 (9,4)	7 (13,2)	4 (13,3)	3 (13,0)		
<i>TA</i>	37 (28,1)	19 (35,8)	14 (46,7)	5 (21,8)		
<i>AA</i>	51 (52,5)	27 (50,9)	12 (40,0)	15 (65,2)		
Total	97 (100)	53 (100)	30 (100)	23 (100)		
Alelos						0,372 ^d
<i>T</i>	55 (28,4)	33 (31,1)	22 (36,7)	11 (23,9)	0,875 ^a	
<i>A</i>	139 (71,6)	73 (68,9)	38 (63,3)	35 (76,1)	0,533 ^b	
Total	194 (100)	106 (100)	60 (100)	46 (100)		

^a Grupo controle e Hepatite B crônica ($p=0,709$, IC 95% 0,522-1,466); ^b Grupo A e Grupo B ($p=0,109$, IC 95% 0,265-1,071); ^c $\chi^2=4,322$; ^d $\chi^2=1,975$; N= número de cromossomos.

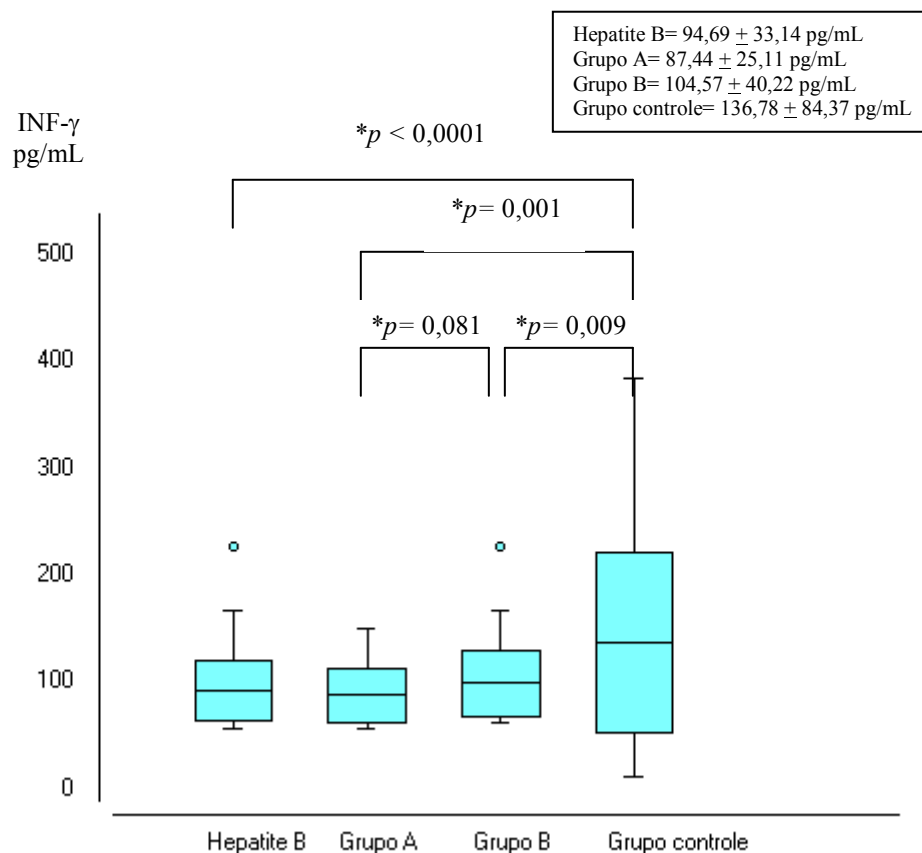
Nos 53 pacientes portadores de hepatite B crônica, a associação dos testes bioquímicos, da carga viral e da presença do HBeAg com o polimorfismo do INF- γ +874T/A revelou que a presença do genótipo *AA* estava significativamente relacionado com maiores níveis de GGT, conforme se demonstra na Tabela 15.

Tabela 15 – Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, da carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos do INF- γ +874T/A.

Variáveis	INF- γ +874TT N=7	INF- γ +874TA N=19	INF- γ +874AA N=27
Média de AST (UI/L)*	35,67 \pm 17,99	46,58 \pm 48,61	71,18 \pm 77,68
Média de ALT (UI/L)*	34,17 \pm 19,98	53,84 \pm 68,37	77,36 \pm 108,06
Média de GGT (UI/L)**	30,83 \pm 13,88	57,78 \pm 90,48	93,43 \pm 143,41
DNA-VHB (UI/mL)*	13.060 \pm 21.603	13.178 \pm 17.442	16.029 \pm 17.302
HBeAg positivo***	0	3	7

* Teste de Kruskal-Wallis H $p > 0,05$; ** Teste de Kruskal-Wallis H $p = 0,008$; *** $\chi^2 = 2,624$, $p = 0,269$; N= número de indivíduos.

O nível sérico médio do INF- γ nos portadores de hepatite B crônica foi significativamente menor do que no grupo controle (Figura 27), com valores médios de 94,69 \pm 33,14 pg/mL e 136,78 \pm 84,37 pg/mL, respectivamente ($p < 0,0001$). Quando se avaliou estes níveis nos grupos A (87,44 \pm 25,11 pg/mL), B (104,57 \pm 40,22 pg/mL) e controle (136,79 \pm 84,38 pg/mL), observou-se diferença estatística significativa (Figura 27) com maiores médias no grupo controle em relação aos grupos A e B ($p < 0,01$).



*Teste T de Student

Figura 27 – Nível sérico médio do INF- γ nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle.

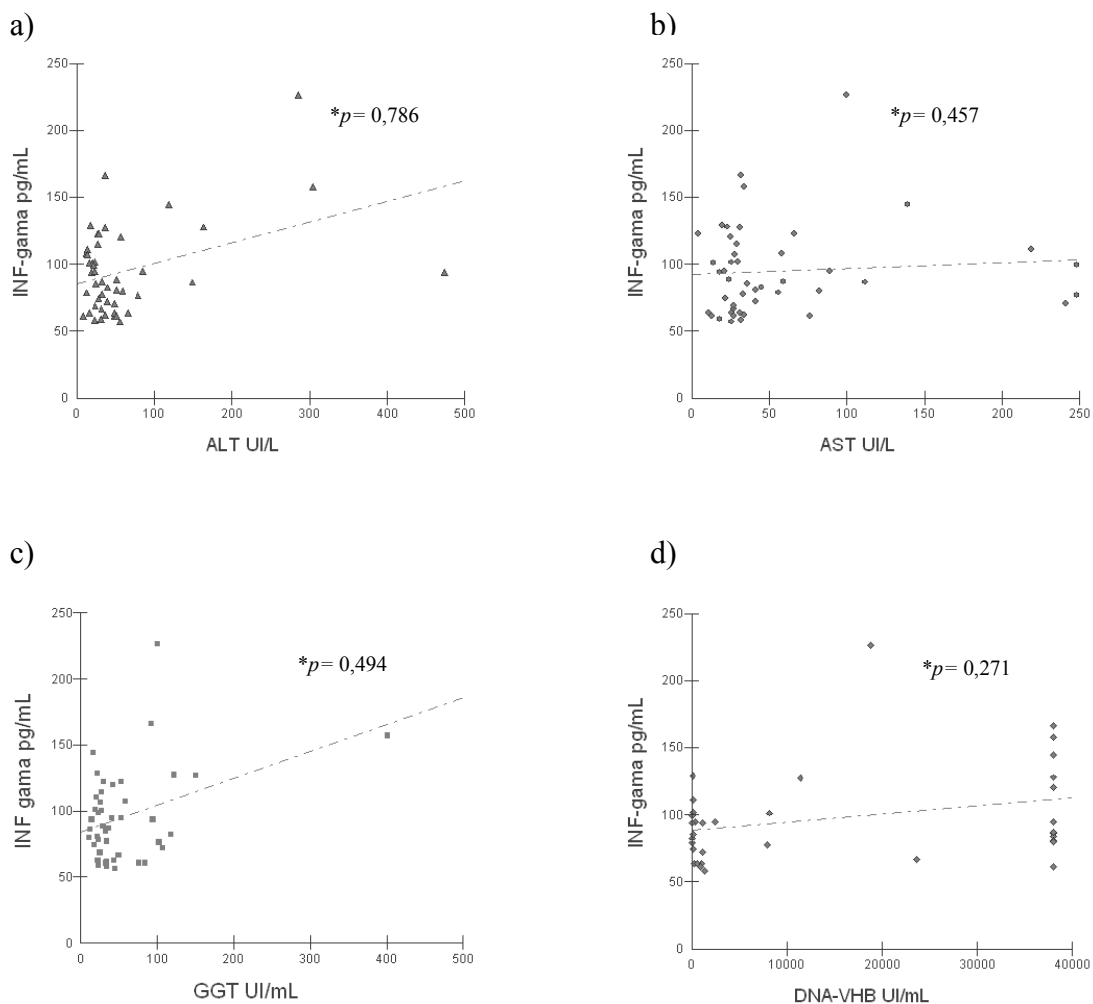
Não se observou diferença estatística significativa nos níveis séricos de INF- γ de acordo com o polimorfismo estudado (Tabela 16) e nem com a presença do HBeAg, encontrando-se níveis médios de $115,94 \pm 2,49$ pg/mL nos HBeAg positivos e de $90,31 \pm 24,91$ pg/mL nos negativos ($p = 0,1838$).

A análise da correlação dos níveis séricos do INF- γ com as dosagens bioquímicas e de carga viral (figura 28), não demonstrou associações com significância estatística.

Tabela 16 - Associação do nível sérico do INF- γ com os polimorfismos do INF- γ +874 T/A.

Variável	INF- γ +874TT N=15	INF- γ +874TA N=55	INF- γ +874AA N=76
Nível sérico INF- γ (pg/mL)	104.58 \pm 64.74	127.21 \pm 74.64	122,94 \pm 74,84

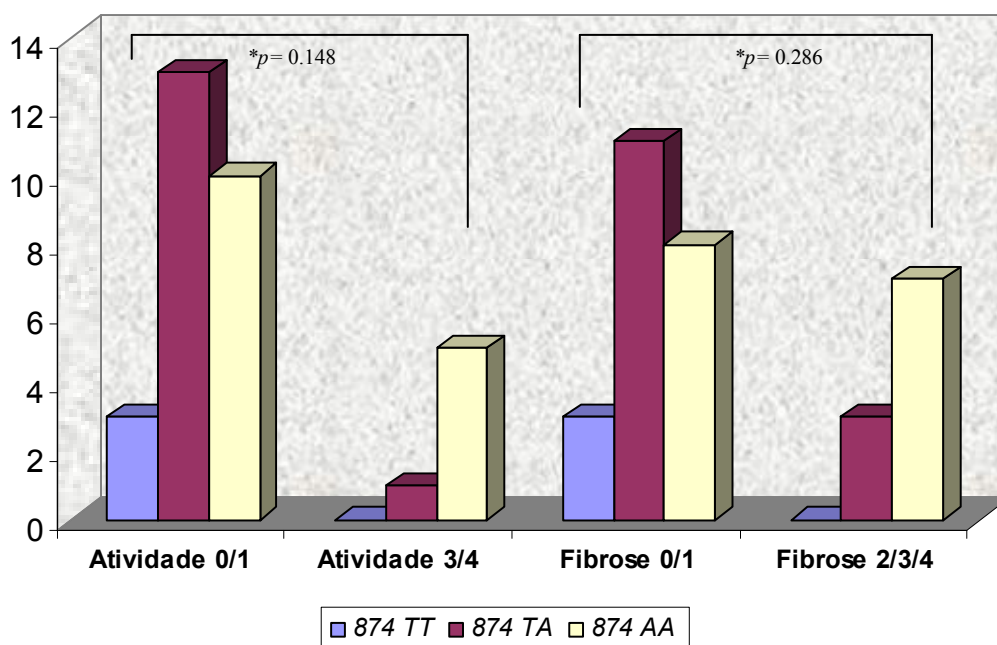
Teste Kruskal-Wallis H $p=0,488$; N= número de indivíduos.



* Correlação Linear de Spearman

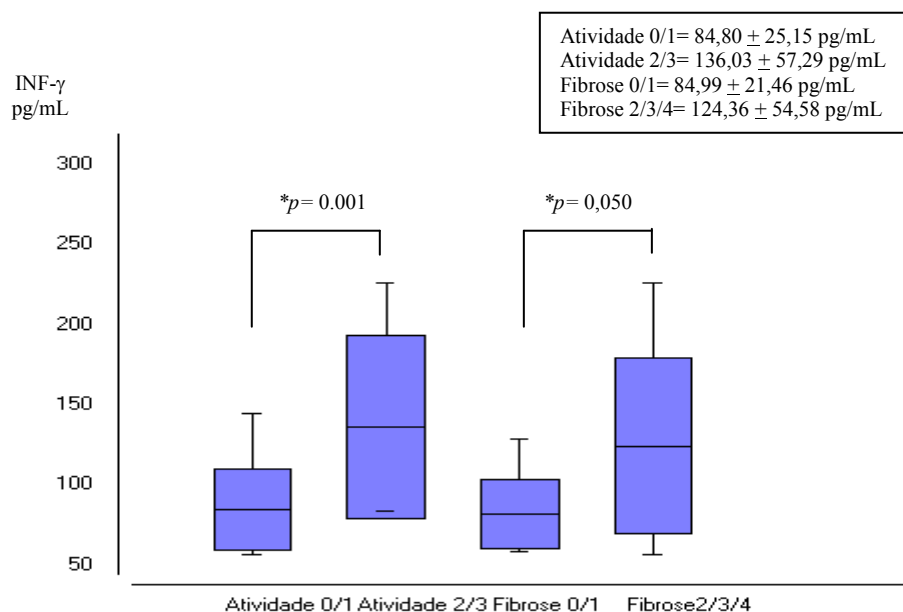
Figura 28 – Correlação dos níveis séricos do INF- γ com ALT (a), AST (b), GGT (c) e carga viral do VHB (d).

Não houve diferença na atividade inflamatória e no grau de fibrose em relação aos genótipos do INF- γ +874T/A (Figura 29). Por outro lado, os níveis séricos de INF- γ foram significativamente maiores (Figura 30) na presença da inflamação moderada e intensa (2/3) do que na ausente e leve ($136,03 \pm 57,29$ vs. $84,80 \pm 25,15$ pg/mL) e, também, no estadiamento da fibrose maior ou igual a 2 ($124,36 \pm 54,58$ vs. $81,99 \pm 21,46$ pg/mL).



** Análise Multivariada - Hotteling

Figura 29 – Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo do INF- γ +874T/A, segundo a classificação histopatológica METAVIR.



* Teste T de Student

Figura 30 – Associação dos níveis séricos do INF- γ com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR.

3.3.3 TGF- β 1

A distribuição genotípica TGF- β 1 -509C/T foi semelhante entre os controles e os pacientes, com predomínio do genótipo *CT* em ambos os grupos (Tabela 17). Ao se analisar esta distribuição entre os grupos A, B e controle (Tabela 17), observou-se maior proporção do genótipo *TT* no grupo A (40%) do que nos grupos B (21,9%) e controle (35,1%), sem alcançar significância estatística ($p > 0,05$).

Não foi encontrada diferença com significância estatística na distribuição alélica entre os grupos e, por conseguinte, não se observou risco de evolução para cronicidade de acordo com a presença dos alelos *C* ou *T* (Tabela 17).

Tabela 17 - Distribuição do polimorfismo do gene TGF- β 1 -509C/T no grupo de portadores de hepatite B, grupo A, grupo B e grupo controle.

TGF- β 1 -309	Grupo Controle N (%)	Hepatite B Crônica N (%)	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)	Odds Ratio	P
Genótipos						0,569 ^c
CC	24 (24,7)	17 (32,0)	9 (30,0)	8 (34,7)		
CT	39 (40,2)	19 (36,0)	9 (30,0)	10 (43,4)		
TT	34 (35,1)	17 (32,0)	12 (40,0)	5 (21,9)		
Total	97 (100)	53 (100)	30 (100)	23 (100)		
Alelos						0,346 ^d
C	87 (44,8)	53 (50,0)	27 (45,0)	26 (56,2)	0,813 ^a	
T	107 (55,2)	53 (50,0)	33 (55,0)	20 (43,8)	0,629 ^b	
Total	194 (100)	106 (100)	60 (100)	46 (100)		

^a Grupo controle vs. Hepatite B crônica ($p=0,462$, IC 95% 0,506-1,306); ^b Grupo A vs. Grupo B ($p=0,327$, IC 95% 0,290-1,364); ^c $\chi^2=2,929$; ^d $\chi^2=2,121$; N= número de cromossomos.

Não foram observadas diferenças significantes entre os níveis séricos da AST, ALT, GGT, da viremia e da presença do HBeAg com o polimorfismo TGF- β 1 -509C/T (Tabela 18).

A análise da associação dos níveis séricos do TGF- β 1 revelou maiores valores no grupo de pacientes, $1.163 \pm 1.084,11$ pg/mL, do que nos controles, $422,39 \pm 210,54$ pg/mL ($p < 0,0001$); assim como houve diferença significativa entre os valores dos controles e os dos grupos A ($1.201,77 \pm 1.207,58$ pg/mL) e B ($1.108,09 \pm 777,44$ pg/mL), como demonstrados na Figuras 31.

Tabela 18 - Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos do TGF- β 1 -509C/T.

Variáveis	TGF- β 1 -509CC N=17	TGF- β 1 -509CT N=19	TGF- β 1 -509TT N=17
Média de AST (UI/L)*	41,66 \pm 52,28	57,68 \pm 52,35	72,61 \pm 84,54
Média de ALT (UI/L)*	49,26 \pm 52,28	57,68 \pm 62,85	83,53 \pm 125,62
Média de GGT (UI/L)*	59,43 \pm 92,94	52,52 \pm 38,88	61,61 \pm 42,05
DNA-VHB (UI/mL)*	20.201 \pm 18.304	17.222 \pm 17.915	5.292 \pm 11.743
HBeAg positivo**	4	4	2

* Teste Kruskal-Wallis H $p > 0,05$; ** $\chi^2 = 0,861$, $p = 0,650$; N= número de indivíduos.

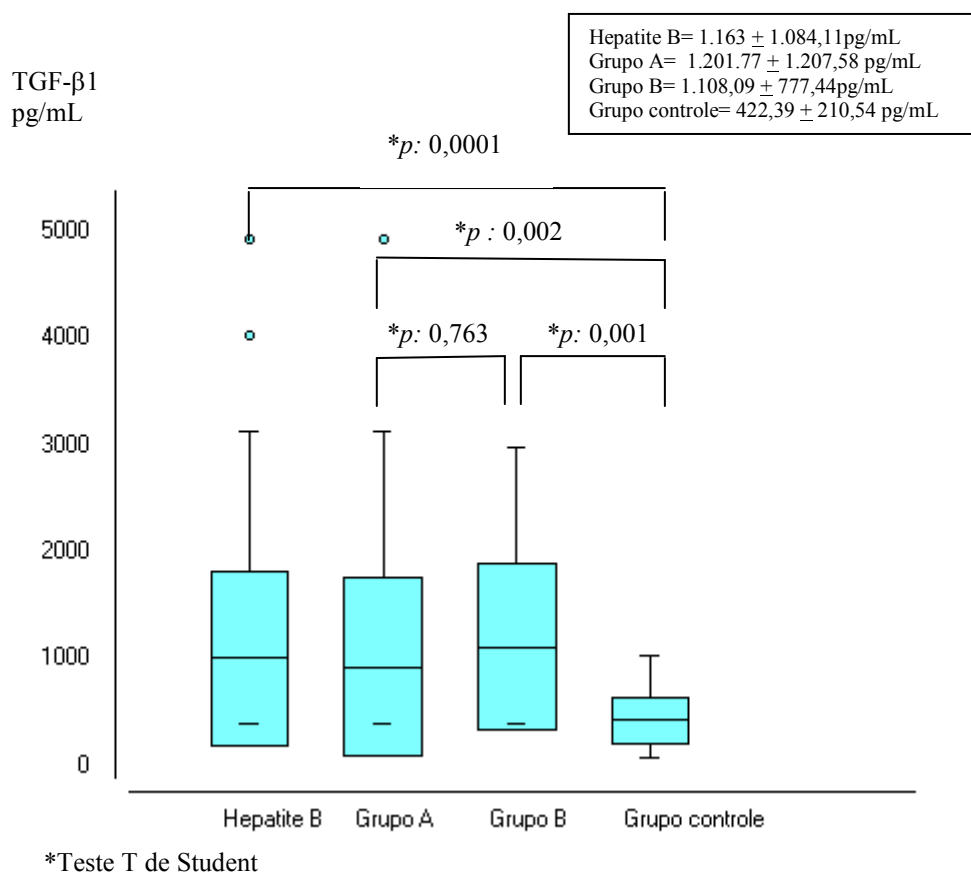


Figura 31 - Nível sérico médio do TGF- β 1 nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle.

A média dos níveis séricos de TGF- β 1 não se alterou em relação ao polimorfismo estudado (Tabela 19). Do mesmo modo, os níveis se assemelharam nos pacientes HBeAg positivo (1.879,25 pg/mL) e negativos (1.611,99 pg/mL).

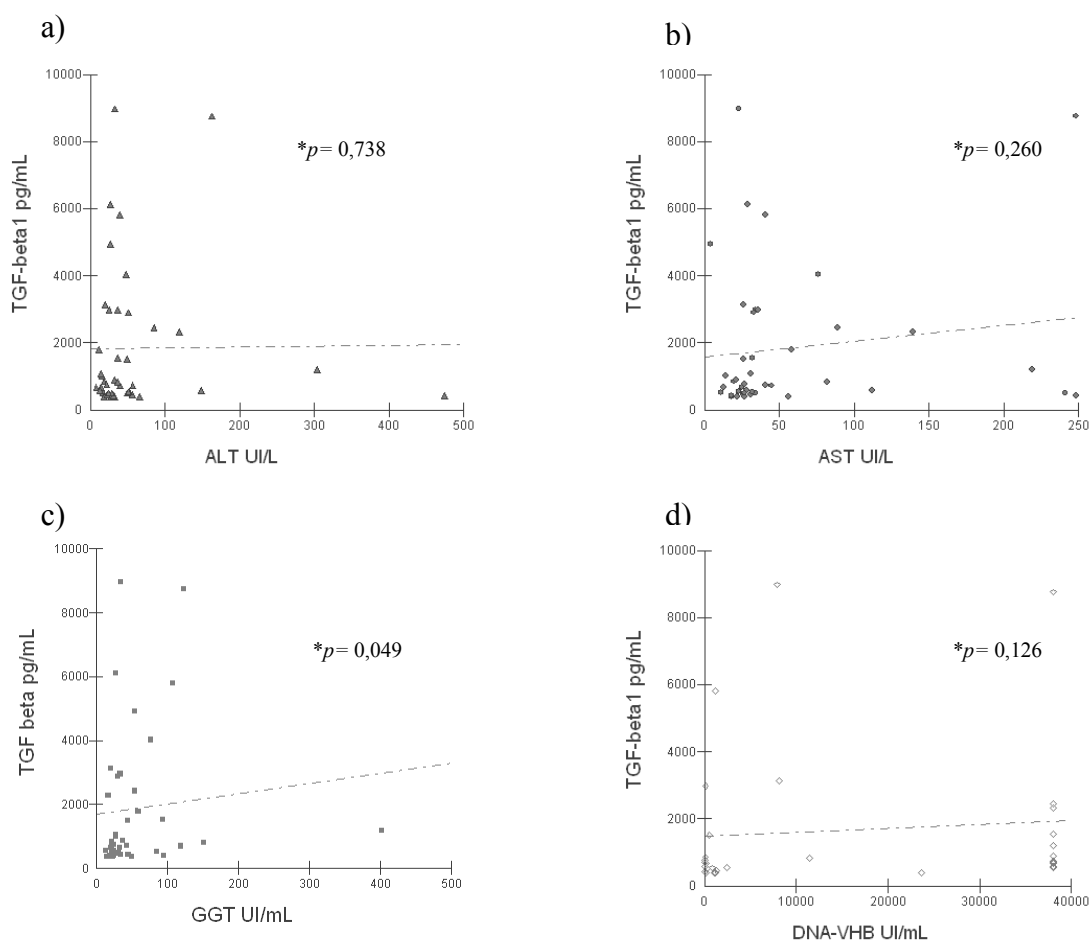
Tabela 19 – Associação do nível sérico do TGF- β 1 com os polimorfismos do TGF- β 1 - 509A/G.

Variável	TGF- β 1 -509CC N=41	TGF- β 1 -509CT N=58	TGF- β 1 -509TT N=51
Nível sérico TGF- β 1 (pg/mL)	1.094,27 \pm 1.834,47	674,69 \pm 759,80	1.013,18 \pm 1.599,17

Teste Kruskal-Wallis H $p= 0,834$; N= número de indivíduos.

A análise da correlação dos níveis séricos dos marcadores bioquímicos e de carga viral com os níveis de TGF- β 1 (figura 32), identificou associação positiva com significância estatística com os níveis de GGT.

A distribuição dos polimorfismos do TGF- β 1 revelou uma tendência de associação do genótipo *TT* com menor grau de atividade inflamatória e fibrose, apesar de não ter alcançado significância estatística (Figura 33). Os níveis séricos desta citocina (Figuras 34) não se modificaram com o grau de atividade inflamatória 0/1 (1.273,57 pg/mL) ou 2/3 (1.351,18 pg/mL) e com o estadiamento da fibrose 0/1 (1.364,65 pg/mL) ou 2/3/4 (1.182,44 pg/mL).



* Correlação linear de Spearman

Figura 32 - Correlação dos níveis séricos do TGF- β 1 com ALT (a), AST (b), GGT (c) e DNA-VHB (d).

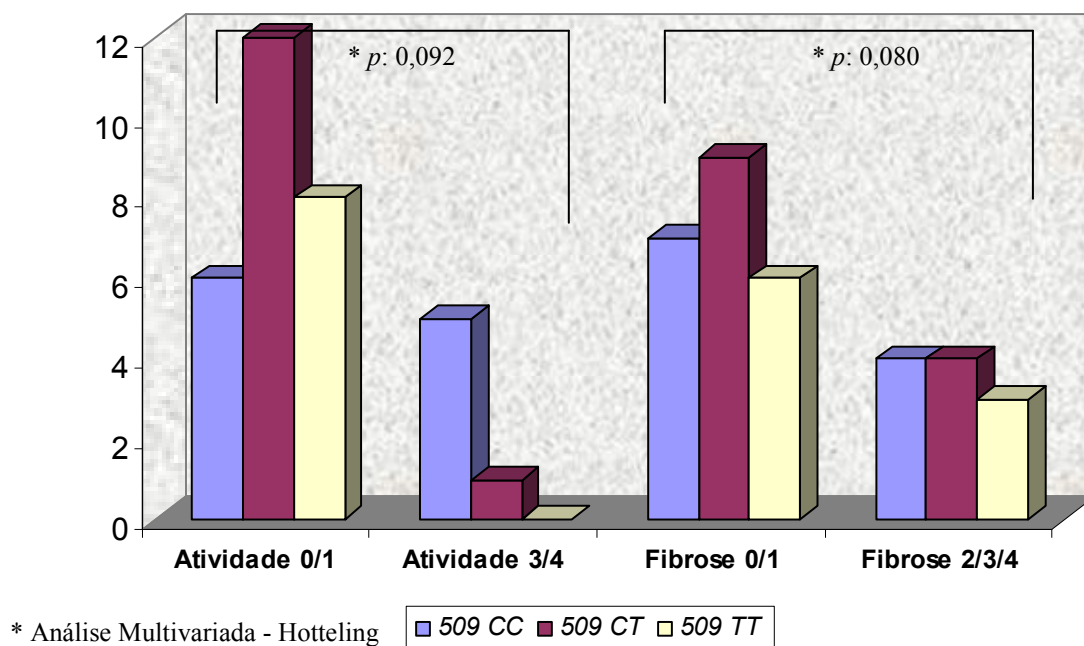


Figura 33 - Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo do TGF-β1 - 509C/T, segundo a classificação histopatológica METAVIR.

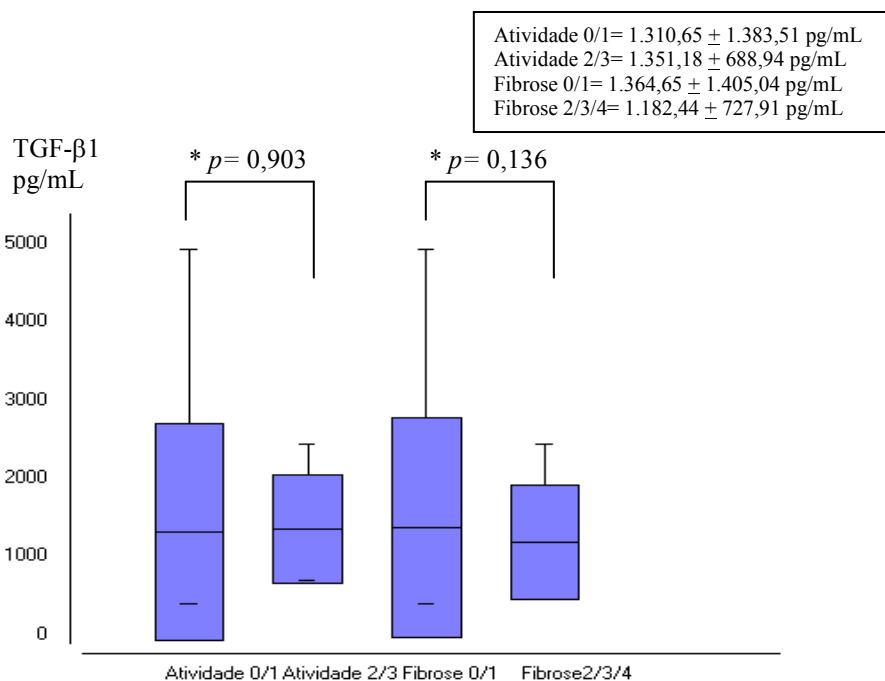


Figura 34 – Associação dos níveis séricos do TGF-β1 com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR.

3.3.4 IL-10

A análise do polimorfismo IL-10 -1082A/G revelou distribuição semelhante no grupo controle e nos pacientes com hepatite B crônica (Tabela 20). A análise da distribuição entre os controles, o grupo A e o grupo B também se observou predomínio do genótipo *AA* em todos os grupos (Tabela 20).

A distribuição dos alelos nos grupos analisados foi estatisticamente semelhante, predominando o alelo selvagem *A* (Tabela 20).

Tabela 20 - Distribuição do polimorfismo do gene IL-10 -1082A/G nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e grupo controle.

IL-10 -1082	Grupo Controle N (%)	Hepatite B Crônica N (%)	Grupo A N (%)	Grupo B N (%)	Odds Ratio	<i>p</i>
Genótipos						0,866 ^c
<i>AA</i>	47 (48,4)	27 (50,9)	17 (56,7)	10 (43,5)		
<i>AG</i>	41 (42,3)	20 (37,7)	10 (33,3)	10 (43,5)		
<i>GG</i>	9 (9,3)	6 (11,4)	3 (10,0)	3 (13,0)		
Total	97 (100)	53 (100)	30 (100)	23 (100)		
Alelos						0,665 ^d
<i>A</i>	135 (69,6)	74 (69,8)	44 (73,3)	30 (65,2)	0,982 ^a	
<i>G</i>	59 (31,4)	32 (30,2)	16 (26,7)	16 (34,8)	1,466 ^b	
Total	194 (100)	106 (100)	60 (100)	46 (100)		

^a Grupo controle vs. Hepatite B crônica ($p= 0,982$, IC 95% 0,586-1,644); ^b Grupo A vs. Grupo B ($p= 0,491$, IC 95% 0,637-3,377); ^c $\chi^2= 1,268$; ^d $\chi^2= 0,813$; N= número de cromossomos.

As variações dos níveis séricos de AST, de ALT, de GGT e de carga viral do VHB não obtiveram significância estatística quando relacionadas aos

polimorfismos -1082A/G (Tabela 21). A positividade do HBeAg foi semelhante nos três genótipos encontrados (Tabela 21).

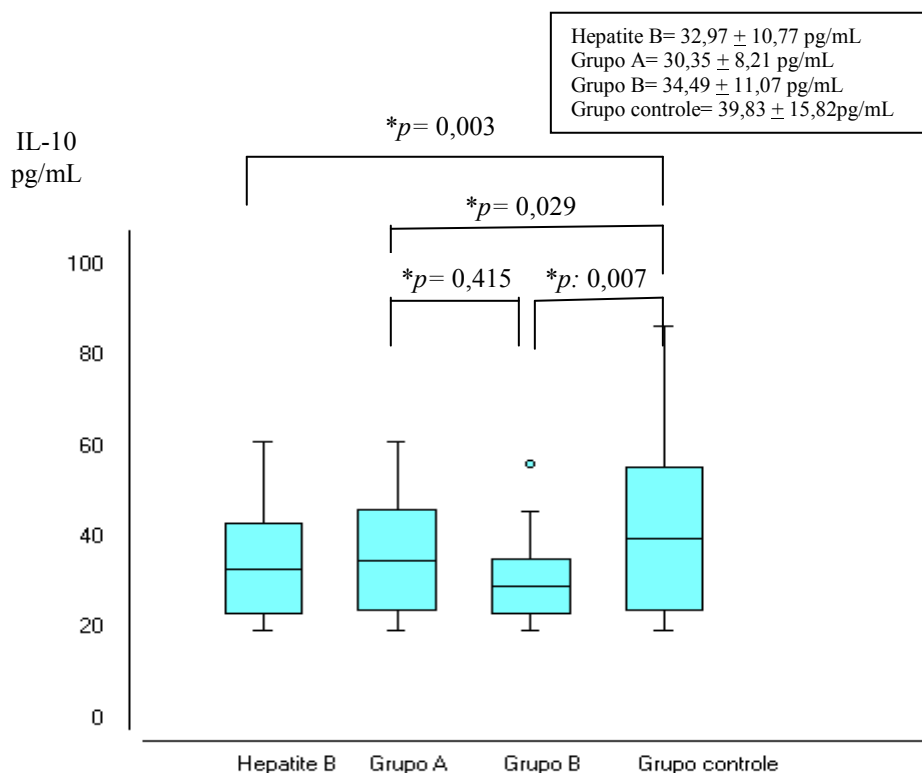
Tabela 21 - Associação dos níveis séricos da ALT, AST, GGT, da carga viral do VHB e da presença do HBeAg com os polimorfismos IL-10 -1082A/G.

Variáveis	IL-10 -1082AA N= 27	IL-10 -1082AG N= 20	IL-10 -1082GG N= 6
Média de AST (UI/L)*	50,17 ± 53,5	70,47 ± 77,86	34,4 ± 14,15
Média de ALT (UI/L)*	53,77 ± 64,32	80,42 ± 115,81	30,0 ± 17,98
Média de GGT (UI/L)*	48,21 ± 32,76	74,88 ± 90,26	37,6 ± 32,22
DNA-VHB (UI/mL)*	9.244 ± 15.036	17.581 ± 18.009	24.510 ± 18.674
HBeAg positivo**	4	3	3

* Teste Kruskal-Wallis H $p > 0,05$; ** $\chi^2 = 4,284$, $p = 0,126$; N= número de indivíduos.

Por outro lado, os níveis séricos da IL-10 (Figura 35) foram significativamente maiores no grupo controle ($39,83 \pm 15,82$ pg/mL) quando comparado com o grupo de pacientes ($32,97 \pm 10,77$ pg/mL), com o grupo A ($30,35 \pm 8,21$ pg/mL) e com o grupo B ($34,49 \pm 11,07$ pg/mL).

Os níveis médios de IL-10 não diferiram de acordo com os genótipos A/G -1082 (Tabela 22) e, também, não foi observado associação das concentrações desta citocina com a positividade ou não do HBeAg, as quais foram $32,36$ pg/mL e $38,14$ pg/mL, respectivamente ($p > 0,05$).



* Teste T de Student

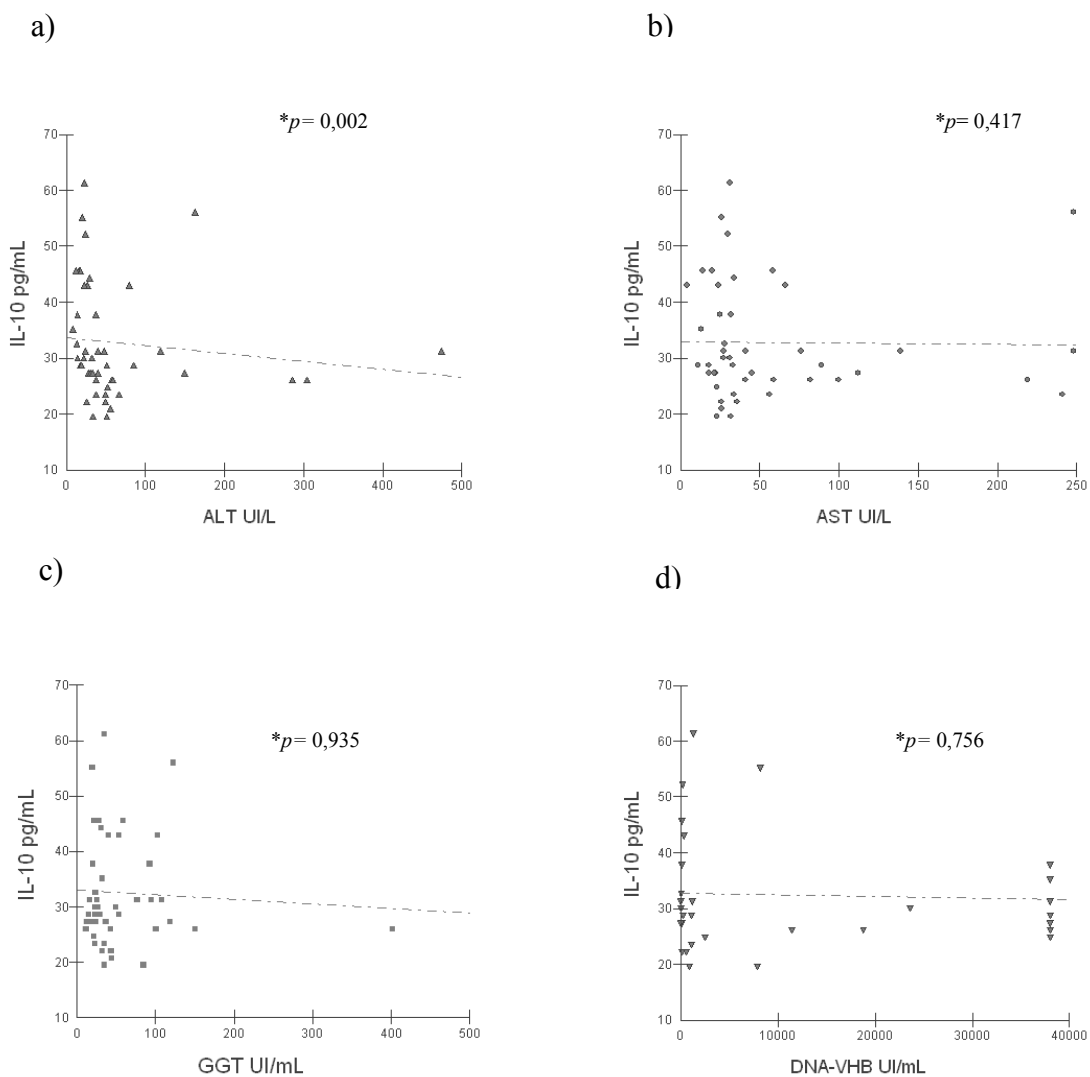
Figura 35 - Nível sérico médio da IL-10 nos portadores de hepatite B crônica, grupo A, grupo B e controle.

Tabela 22 - Associação do nível sérico da IL-10 com os polimorfismos do IL-10 -1082 A/G.

Variáveis	IL-10 -1082AA N=71	IL-10 -1082AG N=58	IL-10 -1082GG N=14
Nível sérico IL-10 (pg/mL)	1.094,27 ± 1.834,47	674,69 ± 759,80	1.013,18 ± 1.599,17

Teste Kruskal-Wallis H $p=0,142$; N= número de indivíduos.

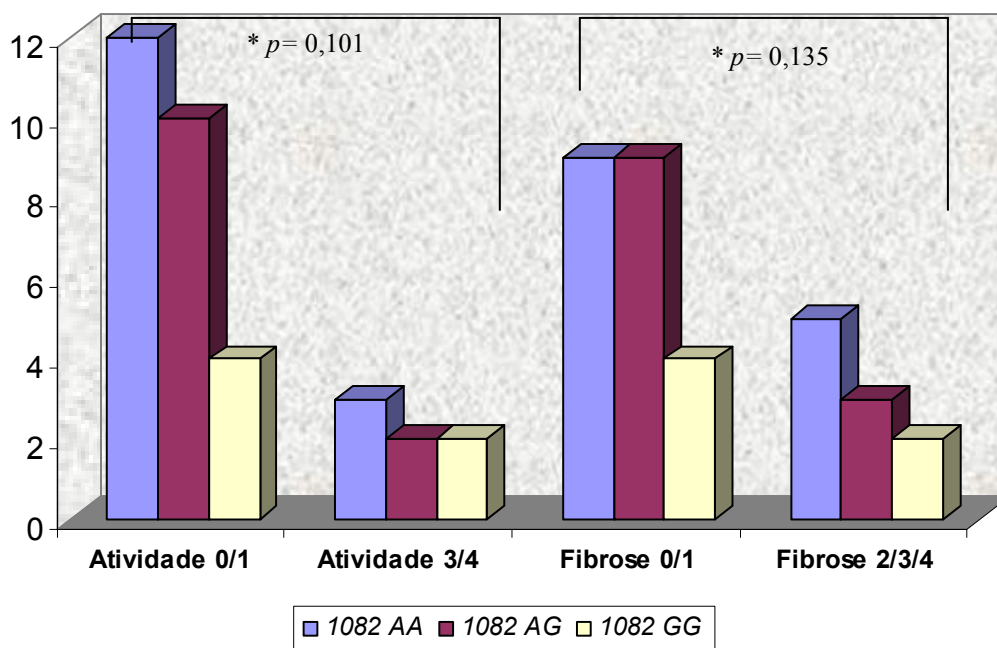
A correlação dos níveis de IL-10 com as transaminases, GGT e viremia identificou associação inversa com os níveis de ALT, alcançando significância estatística (Figura 36).



* Correlação linear de Spearman

Figura 36 - Correlação dos níveis séricos da IL-10 com ALT (a), AST (b), GGT (c) e carga viral do VHB (d).

Não foram observados resultados estatisticamente significantes de acordo com o polimorfismo da IL-10 -1082A/G em relação ao grau de atividade inflamatória e estadiamento de fibrose (Figura 37). As concentrações séricas da IL-10 não diferiram em seus valores médios quanto ao grau da atividade inflamatória 0/1 ou 2/3 (32,76 vs. 31,56 pg/mL) e à fibrose 0/1 ou 2/3/4 (34,26 vs. 29,7 pg/mL), segundo a classificação de METAVIR (Figura 38).



* Análise Multivariada de Hotteling

Figura 37 - Associação da atividade e da fibrose com o polimorfismo da IL-10 - 1082A/G, segundo a classificação histopatológica METAVIR.

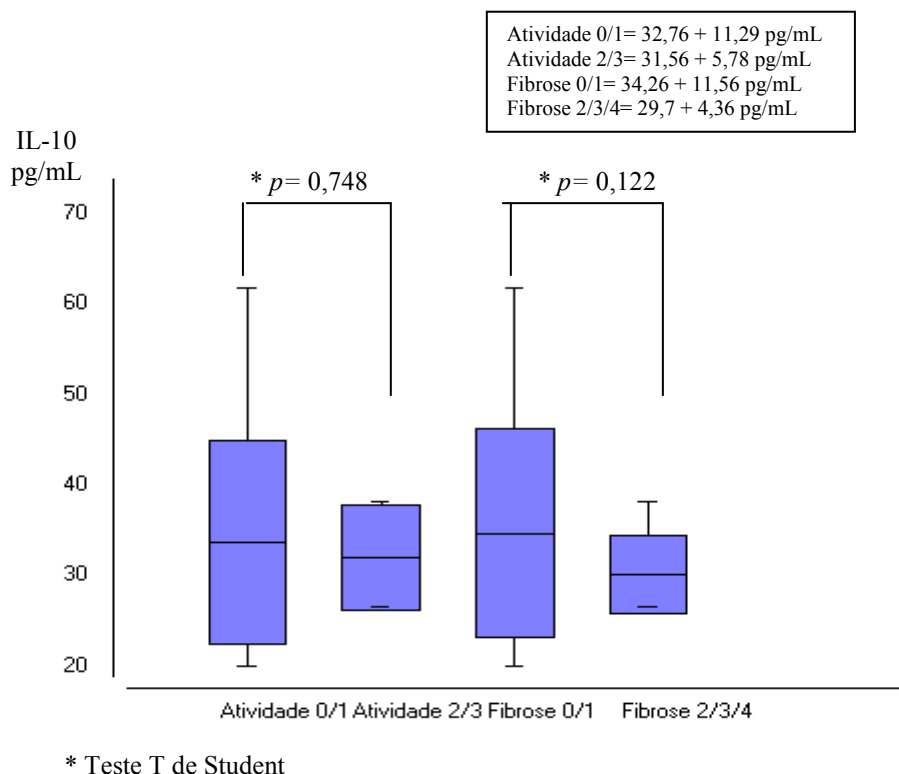


Figura 38 - Associação dos níveis séricos da IL-10 com a atividade e com a fibrose, segundo a classificação histopatológica METAVIR.

Analisando os genótipos combinados das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e INF- γ) e anti-inflamatórias (TGF- β 1 e IL-10), não se observou associação destes com o tipo de apresentação clínica da hepatite B crônica (tabela 23).

A combinação dos quatro *loci* (TNF -308G/A, INF- γ +874T/A, TGF- β 1 -509C/T, IL-10 -1082A/G) demonstra um percentual maior da combinação *GGAATCAA*, associada a menores níveis séricos destas citocinas, no grupo controle do que nos portadores crônicos do VHB, 15,6% (15/97) vs. 5,6% (3/53), respectivamente; porém não alcançando significância estatística ($\chi^2= 2,520$, $p= 0,1859$).

Tabela 23 – Associação dos genótipos combinados de citocinas com a apresentação clínica da hepatite B crônica.

Genótipos combinados	Grupo Controle	Hepatite B crônica	Grupo A	Grupo B	<i>p</i>
TNF- α -308 / INF- γ +874					
<i>GGTT</i>	6	7	4	3	0,390*
<i>GGTA</i>	31	15	11	4	
<i>GGAA</i>	45	19	8	11	
<i>GATT</i>	3	0	0	0	
<i>GATA</i>	6	3	3	0	
<i>GAAA</i>	5	7	3	4	
<i>AAAA</i>	0	1	1	0	
<i>AATA</i>	1	1	0	1	
TGF- β 1 -309 / IL-10 -1082					
<i>CCAA</i>	9	8	5	3	0,859**
<i>CCAG</i>	14	5	2	3	
<i>CCGG</i>	1	4	2	2	
<i>CTAA</i>	22	8	4	4	
<i>CTAG</i>	13	10	5	5	
<i>CTGG</i>	4	1	0	1	
<i>TTAA</i>	16	11	8	3	
<i>TTAG</i>	14	5	3	2	
<i>TTGG</i>	4	1	1	0	

* $\chi^2 = 22,162$; ** $\chi^2 = 16,737$

4 DISCUSSÃO

A hepatite B crônica possui amplo espectro de manifestações, indo desde quadros agudos autolimitados com resolução para cura até formas evolutivas para cronicidade com vários estágios e, progressivamente, podendo culminar com cirrose hepática e CHC (Pungpapong *et al.*, 2007; McMahon, 2008).

Alguns fatores inerentes ao hospedeiro contribuem para direcionar o curso natural da infecção, sendo detectado neste estudo maior prevalência do sexo masculino e maior média de idade entre aqueles que cronificaram do que os de resolução espontânea. Dados da literatura confirmam aumento de três a seis vezes da propensão dos homens para cronicidade, hipoteticamente explicado pelo efeito protetor do estradiol, o qual induz a produção do INF- γ , auxiliando na soroconversão para o anti-HBs e anti-HBe nos casos agudos, além do seu efeito antioxidante, na fase crônica, promovendo um curso mais benigno nas mulheres premenopausadas. Nesta fase também, há diminuição dos depósitos de ferro no tecido hepático, diminuindo a liberação de citocinas inflamatórias (Shimizu *et al.*, 2007). Contudo, outras explicações são necessárias para o esclarecimento deste fenômeno.

Vale ressaltar que, nesta pesquisa, utilizou-se como grupo controle pessoas oriundas de bancos de sangue, militares e profissionais do sexo, populações normalmente formada por adultos jovens, fato que poderá ter contribuído para a diferença de médias de idade encontrada.

Sabe-se que a transmissão vertical do VHB resulta em mais de 90% de cronicidade, com risco de 4% ao ano de desenvolvimento de cirrose e aparecimento de CHC em idades precoces (Feld & Heathcote, 2006). Por outro lado, nas transmissões horizontais, comum da faixa etária adulta característica deste estudo, o risco de

cronificação é menor (5 a 20%) e 60 % são diagnosticados como portadores inativos (Hadziyannis & Papatheodoridis, 2006), o que no atual estudo ficou em 56,6% (30/53).

Hadziyannis & Papatheodoridis (2006) relatam que na população adulta cronicamente infectada pelo VHB, há soroconversão do HBeAg em cerca de 70% em dez anos de doença. Nos HBeAg negativos, um terço dos casos persistem com replicação, caracterizados por carga viral entre 10^4 a 10^8 cópias/mL, elevação das transaminases, histopatologia hepática com diversos graus de inflamação e fibrose e, geralmente, possuem idade mais avançada e, não raro, já são descobertos como portadores de cirrose hepática (Pungpapong *et al.*, 2008). Não houve diferença em relação à faixa etária entre os portadores inativos (grupo A) e os replicantes, porém os cirróticos eram mais idosos que os portadores de hepatite crônica ($54,1 \pm 13,2$ vs. $33,0 \pm 13,7$ anos) e com maior prevalência de HBeAg negativo (70% vs. 47,2%), à semelhança dos dados da literatura.

A presença do etilismo não se correlacionou com evolução mais desfavorável da hepatite B crônica, contrariando resultados de Donato *et al.* (2006) que associam fatores metabólicos, como o consumo de etanol acima de 60 g/dia estaria associado com curso mais grave, inclusive com o CHC, assim como com a presença de esteatose, de obesidade e de diabetes mellitus. Contudo, em uma casuística chinesa, o antecedente de etilismo não foi maior nos hepatopatas mais graves (Du *et al.*, 2006).

As vias de aquisição do VHB foram semelhantes nos dois grupos, destacando-se a história de cirurgia prévia, comportamento sexual de risco e familiares portadores crônicos do vírus. Após a implementação da vacinação, as vias de transmissão do VHB mais prevalentes são a sexual e uso de drogas ilícitas, na idade adulta (McMahon, 2008). Porém, em regiões endêmicas como a Amazônia, as outras

vias permanecem igualmente importantes, destacando-se a transmissão intrafamiliar por características sociais e hábitos culturais (Lobato *et al.*, 2005).

No grupo de pacientes com doença ativa, próximo da metade, 43,5%, já possuíam cirrose, demonstrando muitas vezes o curso insidioso da doença e a necessidade de se pesquisar todos os pacientes HBsAg positivos, com idade acima de 40 anos e carga viral detectável, independente dos *status* do HBeAg para a possibilidade de formas mais graves (Fattovich *et al.*, 2008).

Nos portadores inativos, os exames hematológicos e bioquímicos se encontravam dentro da normalidade. Por outro lado, alterações como plaquetopenia, elevações de ALT, AST, GGT, FA e hipoalbuminemia foram comuns no grupo B, o que já era esperado.

Os resultados de biópsia hepática refletem uma parcela da população de estudo, posto que nove dos dez pacientes cirróticos não o fizeram por contraindicações. Nos 32 resultados analisados, 81,25% apresentavam atividade inflamatória mínima ou ausente e 68,7% estadio 0 ou 1, correlacionando-se muito mais com os casos de portadores inativos, ao quais corresponderam a 62,5% (20/32) do total.

Este estudo encontrou viremia mais elevada nos portadores do grupo B e naqueles HBeAg positivos, ratificando os achados de literatura. O reconhecimento das características que compõe cada fase da hepatite B crônica é de suma importância para a definição das intervenções. Os pacientes pertencentes à fase de hepatite B crônica HBeAg positiva possuem carga viral média de acima de 20.000 UI/mL enquanto que os casos de hepatite B crônica HBeAg negativa, a carga viral varia de 2.000 a 20.000 UI/mL. Os portadores inativos do VHB essencialmente são HBeAg negativos e sua

carga viral indetectável ou abaixo de 2.000 UI/L, apesar de ainda haver controvérsia sobre este ponto de corte (Lok & McMahon, 2007; Lin & Kao, 2008; Shi & Shi, 2009).

Na hepatite B crônica, a dosagem da carga viral vem ocupando lugar de destaque na conduta frente a estes casos, principalmente quando se demonstrou que este é um fator de risco independente para o desenvolvimento da cirrose e CHC (Chen *et al.*, 2006; Iloeje *et al.*, 2006).

Os estudos acerca da distribuição genotípica do VHB reforçam a existência de diferenças regionais relacionadas, entre outros fatores, aos padrões culturais e étnicos de cada população. Sabe-se que o genótipo F é característico da América Latina (Schaefer, 2007), sendo o subgenótipo F1 mais prevalente na costa oeste e o F2 na leste (Campos *et al.*, 2005; Devesa & Pujol, 2007), este incluindo boa parte do território brasileiro.

Estudos nacionais apontam a maior ocorrência dos genótipos A e D na maioria das casuísticas, sendo o A prevalente nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste e o D na região sul (Mello *et al.*, 2007; Tonetto *et al.*, 2009). A importância do genótipo F aparece na casuística de pesquisas na Amazônia ocidental (Viana *et al.*, 2005) ou em comunidades isoladas (Bertolini *et al.*, 2000).

O atual estudo encontrou 95% de prevalência do genótipo A em uma população da Amazônia oriental, predominantemente oriunda de área urbana do estado do Pará, à semelhança de resultados anteriores (Conde *et al.*, 2004), onde se encontrou 89,1% de genótipo A, seguido de F (8,7%) e D (2,2%). Por outro lado, resultados vindos do lado ocidental da região amazônica relatam grande aumento da participação do genótipo F, em torno de 26,5%, ainda sendo genótipo A o mais prevalente com 73,5% dos casos (Viana *et al.*, 2005).

Possivelmente, diferenças entre as correntes migratórias contribuíram para estes fatos. Os achados da maior prevalência do genótipo A1 (92,1%) em relação ao A2 (7,9%), neste estudo, reforçam a forte influência da entrada deste vírus na época da escravidão, mediante a chegada de negros provenientes da África.

Os genótipos A2 e D foram encontrados em 12,5% (5/40) da casuística pesquisada, os quais são os prevalentes no continente europeu e norte da África (Norder *et al.*, 2004), locais de origem de grupos populacionais que também participaram da construção étnica do estado Pará. Não foi encontrado nenhum paciente infectado pelo genótipo F, fato esperado por ser este o genótipo nativo das Américas. Contudo, todos os pacientes eram miscigenados e possivelmente não houve representantes de comunidades mais isoladas da região.

Em 80% da casuística, o HBeAg esteve ausente, não se encontrando nenhuma associação estatisticamente significativa com os genótipos encontrados. A carga viral foi semelhante entre os casos infectados pelo genótipo A1 e A2, sendo a viremia menor nos dois portadores inativos infectados pelo genótipo D. Contudo, a pequena casuística não permite tecer maiores comentários.

Não houve associação com o genótipo do VHB a apresentação clínica da hepatite B crônica, pois a imensa maioria era infectada pelo genótipo A. Em regiões onde predominam os genótipos B e C, como na Ásia, os estudos demonstram maior progressão para cirrose e desenvolvimento de CHC em pacientes acima de 50 anos entre os infectados pelo genótipo C, em especial o C1 (You *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007; Chu & Liaw, 2005), enquanto os casos de portadores de genótipo B se correlacionaram com maior taxa de soroconversão do HBeAg e CHC em jovens (Chu & Liaw, 2005; Ni *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2000). Chan, H.L. *et al.* (2008) concluíram, em uma coorte de

1.006 pacientes, que a carga viral acima de 6,5 log e o genótipo C1 estiveram fortemente associados com os casos de CHC e menor sobrevida.

Na Europa, o genótipo D esteve associado a altas cargas virais, aos casos HBeAg negativos e maior progressão para cirrose (Sanchez-Tapias *et al.*, 2002; Oommen *et al.*, 2006; Deterding *et al.*, 2008;) quando comparado ao genótipo A. Investigação prévia, em uma população do estado do Pará, também não encontrou relação dos genótipos do VHB com as manifestações clínicas (Conde *et al.*, 2004).

O entendimento da complexa interação vírus-hospedeiro, resultando em variados tipos de manifestações clínicas, necessariamente passa pela compreensão da imunopatogênese da doença e da importância do perfil imunológico do hospedeiro, como o seu padrão de secreção de citocinas (Bertoletti & Gerhing, 2006; Baumert *et al.*, 2007).

As citocinas pró-inflamatória estudadas, o TNF- α e o INF- γ , são fundamentais no clareamento viral na fase aguda e na hepatite crônica se apresentam com sua produção e ação alteradas pela deficiência imunológica do hospedeiro e pelos mecanismos de escape viral (Larrubia *et al.*, 2009).

A distribuição genotípica do TNF- α no grupo controle (84,5% GG, 14,4% AG e 1,1% AA) e de pacientes (77,3%, 18,9% e 3,8%) foi semelhante da encontrada em outros estudos. Migita *et al.* (2005), em asiáticos, encontraram proporção genotípica entre hepatopatas com CHC 97,5% de GG, 2,5% de AG e 0% de AA. Estudo realizado na região Sul do Brasil (Ribeiro *et al.*, 2007), identificou percentuais de 80,5%, 17,1% e 2,4% nos controles e 70%, 30% e 0% nos portadores crônicos do VHB, para os genótipos GG, AG e AA, respectivamente.

A presente pesquisa identificou um risco de 2,6 vezes maior de desenvolvimento de doença crônica em portadores do alelo *A*. Este fato foi também demonstrado por Jeng *et al.* (2007), que avaliando este polimorfismo nos portadores crônicos do VHB com CHC, identificaram que a presença do alelo *A* aumentou em quatro vezes o risco de cronicidade da hepatite B.

A avaliação intergrupo da distribuição genotípica do polimorfismo TNF- α -308G/A demonstrou significativo aumento da proporção do genótipo *GA* e do alelo *A* no grupo de pacientes com doença ativa (grupo B) do que nos controles. Sabe-se que a mutação de G por A na posição promotora -308 do gene TNF- α aumenta o nível de secreção desta citocina e segundo alguns estaria relacionada a quadros mais agressivos (Wilson *et al.*, 1997).

Contudo, outros estudos não confirmaram estes achados (Du *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007). Du *et al.* (2006) relataram que outro polimorfismo genético, o TNF- α -238GG, é que estaria associado com a persistência viral, com risco estimado em quatro vezes, além de observar que o polimorfismo TNF- α -308G/A não se correlacionou com pior prognóstico da doença.

Fenotipicamente, a presença do alelo *A*, em condição de homozigose ou heterozigose, não resultou em maiores níveis do TNF- α , como seria esperado. Contudo, deve-se levar em conta que a lesão é no ambiente hepático e, talvez, análises teciduais e não séricas poderiam refletir melhor a dinâmica do processo.

Apesar de se encontrar associação do alelo mutante *A* em pacientes com doença mais agressiva, não se observou correlações com os níveis séricos bioquímicos, de carga viral, com a presença do HBeAg, com os níveis séricos do TNF- α , com o grau de atividade inflamatória ou com a fibrose hepática. Dados escassos na literatura,

apontam associação positiva de maior fibrose hepática, plaquetopenia e menor atividade protrombínica com a presença do alelo *A*, mas não com o nível de transaminases (Jeng *et al.*, 2007).

Chan *et al.* (2008) avaliaram a relação dos polimorfismos genéticos TNF- α -308G/A e -238G/A com o grau de fibrose hepático na hepatite B crônica, não encontrando associação dos genótipos com grau mínimo, moderado ou avançado de fibrose.

Na hepatite B crônica, mesmo com a falha do sistema imune em controlar a replicação viral, há recrutamento persistente de infiltrado inflamatório mononuclear, levando à inflamação crônica com dano hepático sustentado. Vários fatores modulam este processo, incluindo citocinas, como a IL-6, TNF- α e TGF- β 1 (Vierling, 2007; Larrubia *et al.*, 2009). Portanto, quanto mais ativa replicação viral, maior inflamação e maiores níveis de TNF- α , o que explica valores elevados quanto maior atividade inflamatória parenquimatosa.

Na presente pesquisa, o nível sérico do TNF- α se correlacionou de modo significativo com o grau de atividade inflamatória. Kiki *et al.* (2006) estudaram a correlação dos níveis séricos em portadores crônicos do VHB (com e sem cirrose), com os escores histológicos e clínicos de Child-Pugh. Entre os seus resultados, os níveis de TNF- α foram maiores nos casos de hepatite sem cirrose e se correlacionaram positivamente com os escores de atividade inflamatória, segundo o escore de Knodell e negativamente com a classificação prognóstica de Child-Pugh.

A distribuição dos polimorfismos INF- γ +874T/A, na casuística pesquisada, mostrou maior prevalência do alelo mutante *A* em todos os grupos. Este alelo esteve presente em 71,6% no grupo controle, 68,8% no de pacientes, 63,3% no

grupo A e 76,1% no grupo B. Não foi encontrado, portanto, relação da distribuição genotípica e alélica com o risco de infecção crônica pelo VHB.

Gao *et al.* (2009) identificaram, também, maior prevalência do alelo A entre os controles (54,7%) e os doentes crônicos pelo VHB (61,6%). Observou-se, ainda, menor frequência do genótipo selvagem +876TT em ambos os grupos (9,5% e 13%), à semelhança do encontrado na atual pesquisa, 9,4% no grupo controle e 13,2% nos cronicamente infectados. Contudo, no estudo chinês, o genótipo +874AA esteve associado com maior risco de cronicidade.

Este achado se assemelha com o reportado por Liu, M. *et al.* (2006) que observaram o alelo A com frequência significativamente maior no grupo de pacientes (72,1%) do que nos controles (53,49%), com risco estimado de 2,25 vezes. Igualmente, Yu *et al.* (2006) identificaram o alelo A como responsável por maior susceptibilidade individual para infecção pelo VHB.

De maneira contrária, Migita *et al.* (2006) não observaram diferença entre a população de infectados com e sem CHC em relação à distribuição genotípica do polimorfismo INF- γ +874T/A, predominando o genótipo AA, em 83,5% e 85,4%, respectivamente. No mesmo sentido, Ribeiro *et al.* (2007) revelaram que em pacientes da região sul do Brasil houve maior prevalência do alelo A, tanto no grupo de pacientes com hepatite B crônica (62,2%) quanto nos indivíduos que tiveram doença aguda autolimitada (60%), em concordância com os resultados da atual pesquisa.

As associações do polimorfismo no gene INF- γ +874T/A com parâmetros bioquímicos e virológicos demonstraram, somente, associação de níveis séricos mais elevados de GGT na presença do genótipo AA. Suspeita-se que a menor produção tecidual de INF- γ imposta pela presença do alelo mutante A, suscitaria a piora

da lesão e progressão da fibrose, refletida, talvez, pelo aumento da enzima de colestase, a GGT. Contudo, este dado demonstra a necessidade de novos estudos que possam explicar a razão pela qual a hipotética atividade inflamatória aumentada não se correlacionou, igualmente, com elevação das enzimas necroinflamatórias, AST e ALT.

A mutação +874 T>A induz a menor secreção de INF- γ (Pravica *et al.*, 2000), fundamental na resposta imunológica inata e adaptativa contra o VHB. Níveis diminuídos de INF- γ são encontrados em portadores crônicos do VHB em relação aos casos agudos autolimitados (Baumert *et al.*, 2007; Vierling *et al.*, 2007; Larrubia *et al.*, 2009). No presente estudo, este fenômeno foi comprovado, ao se encontrar níveis séricos de INF- γ significativamente menores nos infectados ($94,69 \pm 33,14$ pg/mL), independente se portadores inativos ($87,44 \pm 25,11$ pg/mL) ou se replicantes ($104,57 \pm 40,22$ pg/mL), do que nos controles ($136,78 \pm 84,37$ pg/mL). Sabe-se que a insuficiente produção de INF- γ colabora para evolução crônica, com incapacidade de clareamento do VHB (Vierling *et al.*, 2007).

No atual estudo, não se encontrou associação dos níveis séricos do INF- γ com o polimorfismo pesquisado e nem com os marcadores bioquímicos, sorológicos e virológicos. Cabe ressaltar que os níveis foram pesquisados no compartimento sanguíneo, o que pode não refletir o que ocorre no parênquima hepático. Análises adicionais, como a imunohistoquímica, poderiam determinar se a mutação altera ou não a produção da citocina no fígado.

A correlação positiva entre níveis séricos de INF- γ com atividade inflamatória e com fibrose encontrada nesta pesquisa sugere que esta citocina se mantém tanto mais ativada por células Th1 antígeno-específicas quanto maior o dano hepático. Em modelo animal, demonstrou-se que o INF- γ e o TNF- α assumem

importante papel na patogênese da infecção pelo VHB, ao serem induzidos por estimulação de LTh1 HBsAg-específicas, que, por sua vez, ativam células citotóxicas efectoras (Ohta *et al.*, 2000).

Neste sentido, Tang *et al.* (2006) estudaram 43 pacientes portadores crônicos de VHB e 19 controles, encontrando concentrações maiores de INF- γ no grupo com cirrose hepática ativa e houve correlação positiva com os níveis de transaminases e de IL-12.

A injúria tecidual estimularia as células estrelas na produção de citocinas com função reparadora do dano, como a TGF- β 1, que ao mesmo tempo que antagoniza os efeitos inflamatórios tenta reparar a lesão tecidual por meio da síntese de colágeno. Até certo ponto, este efeito é benéfico, porém a estimulação crônica levaria à substituição de grande parte do tecido hepático normal por tecido fibrótico, desarranjando a arquitetura hepática com impacto na circulação portal e na função do órgão. Admite-se também, que em pacientes portadores crônicos do VHB, há predomínio da resposta do Th2 em relação a Th1, resultando no aumento da produção de citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 (Vierling, 2007).

A atual pesquisa avaliou a distribuição genotípica do polimorfismo TGF- β 1 -509C/T, onde a mutação de C pela T levaria ao fenótipo de maior síntese desta citocina. A análise dos resultados demonstrou predomínio do genótipo CT (40,2%) no grupo controle e no de pacientes (36%). Também, não houve diferença estatística da distribuição nos grupos A e B, apesar de percentualmente o grupo A ter apresentado maior ocorrência do genótipo TT (40% vs. 21,9%).

Migita *et al.* (2006), estudando o perfil genético dos portadores de CHC com hepatite B crônica, encontraram 52,1% do genótipo CT no grupo de infectados, a

semelhança do presente estudo; porém houve o achado de risco aumentado para o desenvolvimento de CHC naqueles pacientes com o alelo mutante *T*, encontrado em 85,4% dos casos com tumor e em 68,1% sem CHC.

Pesquisa de polimorfismo em outros *locus* no gene do TGF- β 1, como o +869T/C e o +915G/C não se associaram com risco e gravidade de evolução para hepatite B crônica (Ribeiro *et al.*, 2007).

As correlações entre o polimorfismo genético estudado do TGF- β 1 com a bioquímica, a viremia, os níveis séricos desta citocina e com os estadiamentos da histopatologia hepática não demonstraram associações na casuística pesquisada. Contudo, níveis séricos do TGF- β 1 foram maiores nos grupos de pacientes, tanto os replicantes com não. Encontrou-se, também, correlação positiva dos níveis plasmáticos de TGF- β 1 com as concentrações de GGT.

A citocina TGF- β 1 tem um efeito imunossupressivo, resultando em um aumento da replicação do VHB, acarretando maior grau de fibrose hepática. Ela ativa as células estreladas com posterior estimulação de proteínas da matrix extracelular, como o colágeno e a fibronectina, induzindo a fibrose (Visvanathan & Lewin, 2006; Malhi & Gores, 2008). Portanto, os pacientes cronicamente infectados pelo VHB possuem estimulação contínua de fatores que levam a síntese de TGF- β 1, com consequente progressão da fibrose e evolução para cirrose. Estes dados explicam os achados de maiores níveis séricos de TGF- β 1 nos infectados, assim como sua correlação com a GGT, a qual é considerada uma enzima de colestase, reveladora da fibrose hepática.

Esperava-se que níveis de TGF- β 1 fossem diretamente proporcionais aos de viremia e estadiamento da fibrose, o que não ocorreu. Talvez, o tamanho da amostra

assim como a dosagem da citocina ter sido sérica e não tecidual possam ter contribuído por estes achados.

Avaliando outra citocina anti-inflamatória, a IL-10, o atual estudo demonstra que a distribuição do polimorfismo IL-10 -1082A/G foi semelhante nos grupos de pacientes e controle, predominando o genótipo *AA*, com frequências de 50,9% e 48,4%, respectivamente. Resultados de outro estudo de origem oriental relatam maior frequência do genótipo -1082*AG* nos controles e nos doentes crônicos (77% e 60,9%) e houve maior risco de cronificação e de evolução para cirrose hepática entre os portadores do genótipo -1082*AA* (Gao *et al.*, 2009).

Pesquisas científicas encontraram associação entre genótipos combinados da IL-10 e os seus níveis séricos, promovendo impacto na evolução das patologias hepáticas. A mutação de A por G na região -1082 aumenta as concentrações da IL-10, assim como a combinação *ATA* (-1082, -819 e -592) se relaciona com diminuição dos níveis séricos e um curso mais benigno da doença, enquanto *GCC* (-1082, -819 e -592) se associa com aumento dos níveis séricos e doença mais progressiva (Zhang & Wang, 2006).

Neste sentido, em artigo de revisão, Zhang & Wang (2006) se referem a indícios de outros estudos de que o haplótipo *ATCT* (-1082, -819, -592 e +117) favoreceria a susceptibilidade ao VHB e a progressão para cirrose e CHC, além de elevar os níveis séricos desta citocina. Contudo, há diferenças populacionais na distribuição destes polimorfismos, sendo encontrado, inclusive, populações sem mudanças de genótipos na região -1082 da IL-10, como foi o caso de 138 amostras chinesas de pacientes portadores de CHC infectados pelo VHB (Wang *et al.*, 2006).

Na atual pesquisa, o polimorfismo da região -1082A/G não se associou com as concentrações séricas bioquímicas, de viremia, com a presença do HBeAg e com os próprios níveis de IL-10. Muitas vezes, os achados genotípicos podem ou não se correlacionar com os fenótipos encontrados, a depender das interações com outros fatores genéticos, infecciosos e ambientais.

De maneira contrária ao esperado, os níveis séricos da IL-10 foram significativamente maiores no grupo controle do que de pacientes, em particular com os portadores de doença mais ativa. Sabe-se que a IL-10 é produzida por LTh2, inibe a ação do INF- γ e TNF- α controla a fibrogênese por supressão das células estreladas mediada pela ação do TGF- β 1 (Zhang & Wang, 2006). Em portadores crônicos do VHB, há predomínio da resposta tipo Th2, dificultando o clareamento viral dependente da Th1. Acredita-se que haja aumento concomitante da ação de células Treg (CD25+), as quais aumentariam a produção de IL-10, suprimindo a resposta Th1 estimulada pelo HBcAg (Kondo *et al.*, 2006).

O achado de níveis séricos menores entre os infectados pelo VHB se assemelha com resultados de pesquisas em infectados crônicos pelo VHC, onde as concentrações plasmáticas de IL-10 foram significativamente menores neste grupo do que em indivíduos não infectados (Zhang *et al.*, 2004; Gramenzi *et al.*, 2005).

Estudos apontam que as características virais também influenciariam no padrão de secreção de citocinas. Comparando o perfil de concentração sérica de citocinas nos infectados pelos genótipos B e C do VHB, observou-se maior produção de IL-10 no genótipo C, ampliando a resposta Th2 e favorecendo a um curso mais agressivo nestes casos (Yuen *et al.*, 2007).

Entre outras explicações para o achado de níveis elevados de IL-10 no grupo controle, estaria o fato de se ter dosado somente a concentração sérica e não a tecidual, não haver avaliações de outros *loci* do gene desta citocina, não possuir informações sobre a influência do genótipo *A* sobre o padrão de secreção de citocinas em relação aos outros e o próprio tamanho amostral.

Houve correlação inversa entre os níveis séricos de ALT com as concentrações plasmáticas de IL-10, no presente estudo, confirmando a ação anti-inflamatória desta citocina, posto que níveis mais baixos de IL-10 se correlacionam com maior apoptose e necrose por predomínio de resposta Th1 (Zhang & Wang, 2006).

Não houve correlação entre o polimorfismo estudado da IL-10 e seu nível sérico, com a atividade inflamatória lobular e com o estadio da fibrose. Pesquisas com outros polimorfismos, como o -1117A/G, o -854C/T e o -627C/A, identificaram o genótipo -627CC como protetor de fibrose (Chan *et al.*, 2008). Neste estudo, além do polimorfismo, outros fatores influenciaram no maior grau de fibrose, como o elevado índice de massa corpórea, a plaquetopenia e os níveis elevados de FA.

A combinação dos genótipos pesquisados identificou a maior ocorrência de *GGAACTAA* (TNF- α -308, INF- γ +874, TGF- β 1 -509, IL-10 -1082), hipoteticamente responsável por menores concentrações destas citocinas, no grupo controle (15,6%) do que nos pacientes (5,6%), apesar de não ser estatisticamente significativa. Talvez, ampliações de pesquisas em mais *loci* do mesmo gene e de outros com concomitante formação de haplótipos, poderiam oferecer dados mais consistentes do comportamento da resposta imune em portadores crônicos do VHB, em casuísticas amazônicas.

Sabe-se que deverá haver equilíbrio das respostas do tipo Th1 e Th2 para o perfeito funcionamento do sistema e eliminação viral, o que não ocorre nos que

evoluem para cronicidade (Baumert *et al.*, 2007; Vierling, 2007). As respostas para este fenômeno com os dados até então conhecidos sugerem a importância da interação dos três fatores ligados à epidemiologia da hepatite B: o vírus, o hospedeiro e o meio ambiente. Logo, a compreensão dos mesmos não deverá se fazer de maneira isolada, sob pena de se ter uma visão compartimentalizada, não conseguindo formar nexos entre os achados.

Quanto mais próximo se chegar da realidade, melhores serão as ações de prevenção, monitoramento e intervenção terapêutica nos portadores de hepatite B, declinando cada vez mais as taxas de morbi-mortalidade, que ainda permanecem alarmantes.

Não restam dúvidas que o advento da vacinação contribuiu de forma dramática para a diminuição da incidência dos casos. Porém, nem todos têm acesso aos serviços básicos de saúde, principalmente em regiões menos favorecidas e que coincidem com as de maior endemicidade; além do mais, há um contingente grande de portadores crônicos, responsável pelo reservatório da doença e pelos quadros de cirrose e CHC que leva ao óbito cerca de 500.000 pacientes ao ano.

Avanços, em todas as áreas do conhecimento, inclusive o da imunologia e da genética humana, com certeza contribuirão para minimização do problema se não distanciados do pensamento holístico do ser humano e de suas relações entre si e com o meio ambiente. Sem dúvida que estudos futuros com aumento de casuística e outras correlações serão necessários para ratificação dos resultados e contribuir para esclarecimentos de questões ainda não respondidas da imunopatogenia na infecção crônica do VHB.

5 CONCLUSÕES

Em resposta aos objetivos traçados, os resultados deste estudo permitem concluir que:

i) O sexo masculino se constituiu em um fator predisponente para a cronificação da hepatite B, com risco estimado de 3,3 vezes;

ii) Os pacientes cirróticos possuíam média de idade mais avançada do que os portadores crônicos do VHB não cirróticos;

iii) O genótipo A do VHB foi o mais prevalente na população estudada (95%), sendo a maioria do subgenótipo A1 (92,1%) e relacionado com os subtipos ayw1 e adw2;

iv) Não foi encontrada associação dos genótipos do VHB com a apresentação clínica da hepatite B crônica;

v) Os pacientes cronicamente infectados pelo VHB apresentaram menores níveis séricos de INF- γ e de IL-10 e maiores concentrações plasmáticas de TGF- β 1 do que os não infectados;

vi) Houve associação positiva entre os níveis séricos da TGF- β 1 com os de GGT e associação inversa entre os de IL-10 com as concentrações séricas da ALT;

vii) O comportamento da secreção de citocinas não se associou com a presença ou não do HBeAg, com viremia do VHB e nem com os polimorfismos estudados;

viii) O grau de atividade inflamatória esteve diretamente associado com os níveis séricos de TNF- α e de INF- γ e o estadió de fibrose hepática recebeu influência das concentrações sanguíneas do INF- γ ;

ix) A presença do alelo *A* no polimorfismo TNF- α -308G/A se associou com risco de 2,6 vezes maior de cronificação do VHB; assim como a quadros mais avançados da infecção;

x) A distribuição dos polimorfismos INF- γ +874T/A, TGF- β 1 -509C/T e IL-10 -1082A/G não se correlacionaram com risco aumentado de cronificação do VHB, com fator de proteção e nem com a piora da progressão da doença;

xi) O genótipo INF- γ +874TT se associou com menores níveis séricos de GGT;

xii) Os polimorfismos estudados não influenciaram no grau de atividade inflamatória e no estadio de fibrose, nas biópsias hepáticas analisadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Cytokines. In: **Cellular and Molecular Immunology**. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S (eds). Saunders, 2007, p. 251-282.
- ABBOTT,W.; GANE, E.; WINSHIP, I.; MUNN, S.; TUKUITONGA, C. Polymorphism in intron 1 of the interferon-gamma gene influences both serum immunoglobulin E levels and the risk for chronic hepatitis B virus infection in Polynesians. **Immunogenetics**, 59:187-195, 2007.
- ALLEN, M.A.; WAKELIN, S.H.; HOLLOWAY, D.; LISBY, S.; BAADSGAARD, O.; BARKER, J.N.W.N.; McFADDEN, J.P. Association of TNF alpha gene polymorphism at position – 308 with susceptibility to irritant contact dermatitis. **Immunogenetics**, 51: 2001-2005, 2000.
- ALMEIDA, J.D., RUBENSTEIN, O., SCOTT, E.J. New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. **Lancet**, 2:1225-1227, 1971.
- ALTER, M.J. Epidemiology and prevention of hepatitis B. **Seminars in Liver Disease**, 23(1): 39-46, 2003.
- ANGUS, P.; VAUGHAN, R.; XIONG, S.; YANG, H.; DELANEY, W.; GIBBS, C.; BROSGART, C.; COLLEDGE, D.; EDWARDS, R.; AYRES, A.; BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with de development of a novel mutation in the HBV polymerase. **Gastroenterology**, 125 (2): 292-297, 2003.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2008. 272p.

- BARON, J.L.; GARDINER, L.; NISHIMURA, S.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R.; GANEM, D. Activation of nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. **Immunity**, 16:583-594, 2002.
- BAUMERT, T.F.; THIMME, R.; von WEIZSÄCKER, F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, 13(1): 82-90, 2007.
- BEASLEY, R.P., LIN, C.C., HWANG, L.L., CHIEN, C.S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B. A prospective study of 22.707 men in Taiwan. **The Lancet**, London, 21: 1129-1133, 1981.
- BECK, J. & NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. **World Journal of Gastroenterology**, 13(1): 48-64, 2007.
- BEDOSSA, P. & POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, 24(2): 289-293, 1996.
- BENSABATH, G.; HADLER, S.C.; SOARES, M.P.C.; FIELDS, H.; DIAS, L.B.; POPPER, H.; MAYNARDI, J.D. Hepatitis delta virus infection and Lábrea hepatitis: prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon Basin. **Journal of the American Medical Association**. 258: 479-483, 1987.
- BENSABATH, G.; CARTÁGENES, P.R.B., DIAS, L.B., CRESCENTE, J.A.B., MIRANDA, E.C.B.M. Hepatitis por vírus. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Leão, R.N.Q. (ed). Belém, 1997, p. 313-343.
- BENSABATH, G. & SOARES, M.C.P. 2004. The evolution of knowledge about viral hepatitis in Amazon region: from epidemiology and etiology to the prophylaxys. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(suppl 2):14-26, 2004

- BERTOLETTI, A. & GEHRING, A.J., The immune response during hepatitis B virus infection. **Journal of General Virology**, 87: 1439–1449, 2006.
- BERTOLINI, D.A., MOREIRA, R.C., SOARES, M., BENSABATH, G., LEMOS, M.F., MELLO, I.M.V.G.C., PINHO, J.R.R. Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil. **Virus – Reviews & Research**, 5 (2) – (Suppl 1): 101, 2000 (Resumo).
- BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., VISNICH, S. A new antigen in leukemia sera. **The Journal of the American Medical Association**, 191: 541-546, 1965.
- BOCK, C.T.; TILLMANN, H.L.; MANNS, M.P.; TRAUTWEIN, C. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus. **Hepatology**, 30: 517-525, 1999.
- BORTOLOTTI, F.; JARA, P.; CRIVELLARO, C.; HIERO, L.; CADROBBI, P.; FAUCA, E.; CAMARENA, C.; DE LA VEGA, A.; DIAZ, C.; MOLINER, L.; NOVENTA, F. Outcome of chronic hepatitis B in caucasian children during a 20-year observation period. **Journal of Hepatology**, 29:184-190, 1998.
- BRAGA, W.S.M.; BRASIL, L.M.; SAOUZA, R.A.B.; CASTILHO, M.C.; FONSECA, J.C. 2001. Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34(4): 349-355, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatite B**, 2009. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude> > . Acesso em: 13/01/2010.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. 3 ed. Brasília, 2008, 60 p.
- BRUNETTO, M.R., STEMLER, M., BONINO, F., SCHODEL, F., OLIVERI, F., RIZZETTO, M., VERME, G., WILL, H. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, 10: 258–261, 1990.
- BRUSS, V. & GANEM, D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 88 (3): 1059-1963, 1991.
- BRUSS, V. Hepatitis B virus morphogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, 13(1): 65-73, 2007.
- CAMPOS, R.H.; MBAYED, V.A.; LEONE, F.G.P. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, 34(suppl 2): S8-S13, 2005.
- CARMAN, W.F., HADZIYANNIS, S., MCGARVEY, M.J., JACYNA, M.R., KARAYIANNIS, P., MAKRIS, A., THOMAS, H.C. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet**, 2(8663): 588-591, 1989.
- CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Divison of Viral Hepatitis – Statistics and Surveillance**, may 22 (58), 2009. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/hepatitis/Statistics.htm> >. Acesso em 13/01/2010.

- CHAN, H.L.Y., HUSSAIN, M., LOK, A.S.F. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. **Hepatology**, 29: 976-984, 1999.
- CHAN, H.L.; HUI, A.Y.; WONG, M.L. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. **Gut**, 53: 1494-1498, 2004.
- CHAN, H.L.Y.; TSE, A.M.L.; CHIM, A.M.L.; WONG, V.W.S.; CHOI, P.C.L.; YU, J.; ZHANG, M.; SUNG, J.J.T. Associations of cytokine gene polymorphisms and liver fibrosis in chronic hepatitis B. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 23: 783-789, 2008.
- CHAN, H.L.; TSE, C.H.; MO, F.; KOH, J.; WONG, V.W.; WONG, G.L.; LAM, CHAN. S.; YEO, W.; SUNG, J.J.; MOK, T.S. High viral load and hepatitis B virus subgenotype ce are associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. **Journal Clinical Oncology**, 10;26(2): 177-182, 2008.
- CHAVES, M.H.P. **Prevalência da infecção pelos vírus das hepatites B e C entre indivíduos portadores de HIV-1 e/ou SIDA/AIDS na cidade de Belém-Pará.** Dissertação (Mestrado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2007. 97p.
- CHEN, M.; SÅLLBERG, M.; HUGHES, J.; JONES, J.; GUIDOTTI, L.G.; CHISARI, F.V.; BILLAUD, J.N.; MILICHI, D.R. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. **Journal of Virology**, 79(5): 3016-3027, 2005.
- CHEN, B.F.; LIU, C.J.; JOW, G.M.; CHEN, P.J.; KAO, J.H.; CHEN, D.S. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. **Gastroenterology**, 130:1153-1168, 2006.

- CHEN, C.J.; YANG, H.I.; SU, J. REVEAL-HBV study group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. **The Journal of the American Medical Association**, 295:168-174, 2006.
- CHEONG, J.Y.; CHO, S.W.; CHUNG, S.G.; LEE, J.A.; YEO, M.; WANG, H.J.; LEE, J.E.; HAHM, K.B.; KIM, J.H. Genetic polymorphism of interferon- γ , interferon- γ receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. **Biochemical Genetics**, 44(5/6): 246-255, 2006.
- CHU, C.J.; LIAW, Y.F. genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline. **Journal of Hepatology**, 43: 411-417, 2005.
- CONDE, S.R.S.S.; MOIA, L.J.M.P.; BARBOSA, M.S.B.; AMARAL, I.S.A.; MIRANDA, E.C.B.M.; SOARES, M.C.P.; BRITO, E.M.F.; SOUZA, O.S.C.; ARAÚJO, M.T.; DEMACHIKI, S.; REBELLO, J.R.P.; MESQUITA, M.G.; BERTOLLINI, D.A.; ISHAK, R. Prevalência de genótipos e mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia oriental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 23(supl II): 33-39, 2004.
- COTRIM, H., MOTA, E., LEITE, L., SILVA, L., LYRA, L. A case-control study on the association of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Northeast Brazil. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, 26 (5): 301-305, 1992.
- COUROUCÉ-PAUTY, A.M., LEMAIRE, J.M., ROUX, J.F. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. **Vox sanguinis**, 35: 304-308, 1978.

- DANDRI, T.; VOLZ, T.K.; LÜTGEHETMANN, M.; PETERSEN, J. Animal models for the study of HBV replication and its variants. **Journal of Clinical Virology**, 34: S54-S62, 2005.
- DANE, D.S, CAMERON, C.H., BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet**, 1: 695 - 698, 1970.
- DEVESA, M. & PUJOL, F.H. Hepatitis B virus genetic diversity in Latin America. **Virus Research**, 127(2):177-184, 2007.
- DETERDING, K.; CONSTANTINESCU, I.; NEDELICU, F.D.; GERVAIN, J.; NEMECEK, V.; SRTUNECKY, O.; VINCE, A.; GRGUREVIC, I.; BIELAWSKI, K.P.; ZALEWSKA, M.; BOCK, T.; AMBROZAITIS, A.; STANCZAK, J.; TAKÁCS, M.; CHULANOV, V.; SLUSARCZYK, J.; DRAZD'ÁKOVÁ, M.; WIEGAND, J.; CORNBERG, M.; MANNS, M.P.; WEDEMEYER, H. Prevalence of HBV genotypes in central and eastern Europe. **Journal of Medical and Virology**, 80(10):1707-1711, 2008.
- DOGANCI, ; UYSAL, G.; KIR, T.; BAKIRTAS, A.; KUYUCU, N.; DOGANCI, L. Horizontal transmission of hepatitis B virus in children with chronic hepatitis B. **World Journal of Gastroenterology**. 11(3):418-420, 2005.
- DONATO, F.; GELATTI, U.; LIMINA, R.M.; FATTOVICH, G. Southern Europe as an example of interaction between various environmental factors: a systematic review of the epidemiologic evidence. **Oncogene**. 2006 Jun 26;25(27):3756-3770.
- DU, T.; GUO, X.H.; ZHU, X.L.; LU, L.P.; GAO, C.Y.; LI, Z.; LIU, Y.; LI, H. Association of TNF- α promoter polymorphisms with the outcome of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. **Journal of Viral Hepatitis**, 13:618-624, 2006.

- FATTOVICH, G.; BORTOLOTTI, F.; DONATO, F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. **Journal of Hepatology**, 48: 335-352, 2008.
- FAY, O.H. Hepatitis B in Latin America: epidemiological patterns and eradication strategy. **Vaccine**, 8 (Suppl): S100-S106, 1990.
- FELD, J.J. & HEATHCOTE, J. Hepatitis B e antigen-positive chronic Hepatitis B: natural history and treatment. **Seminars in Liver Disease**, 26(2): 116-129, 2006.
- FERRAZ, M.L.G. Testes laboratoriais na investigação de doenças hepáticas. In: **Tratado de Hepatologia**. Mattos, A.A. & Dantas-Corrêa, E.B. (eds). Rio de Janeiro, 2010, p. 21-28.
- FONSECA, J.C.F. HDV in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 25: 52-54, 2002a.
- FONSECA, J.C.F. Hepatite D. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(2): 181-190, 2002b.
- FONSECA, J.C.F. História natural da hepatite crônica B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 40(6): 672-677, 2007.
- FRANZESE, O.; KENNEDY, P.T.F.; GEHRING, A.J.; GOTTO, J.; WILLIAMS, R.; MAINI, M.K.; BERTOLETTI, A. Modulation of the CD8+ -T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. **Journal of Virology**, 79(6): 3322-3328, 2005.
- FRIAS, F.R., BUTI, M., JARDI, R., COTRINA, M., VILADOMIU, L., ESTEBAN, R., GUARDIA, J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. **Hepatology**, 22: 1641-1647, 1995.

- FUNG, S.K. & LOK, A.S. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? **Hepatology**, 40: 790-792, 2004.
- GANEM, D. & SCHNEIDER, R.J. Hepadnaviridae: the virus and their replication. In: **Fields Virology**. KNIPE, D.M & HOWLEY, P.M. (eds). 4 th ed, vol. 2. Philadelphia, Lippincott Williams, 2001:2923-2969.
- GANEM,D. & PRINCE, A.M. Mechanisms of disease: hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. **The New England Journal of Medicine**, 350 (11): 1118-1129, 2004.
- GAO, Q.J.; LIU, D.W.; ZHANG, S.Y.; JIA, M.; WANG, L.M.; WU, L.H.; WANG, S.Y.; TONG, L.X. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, 15(44): 5610-5619, 2009.
- GASPAR, A.M. & YOSHIDA, C.F. Geographic distribution of HBsAg subtypes in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 82(2):253-258, 1987.
- GAYOTTO, L.C.C. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, 19 (3): 137 – 140, 2000.
- GAYOTTO, L.C.C. & ALVES, V.A.F. Patologia das hepatite crônicas. In: **Hepatites Agudas e Crônicas**. Silva, L.C. (3 ed.), São Paulo, 2003, p. 88-97.
- GOMES-GOUVÊA, M.S.; SOARES, M.C.P.; CARVALHO, I.M.G.; MELLO, I.M.; BRITO, E.M.; MOIA, L.J.P.; BENSABATH, G.; NUNES, H.M.; CARRILHO, F.J.; PINHO, J.R. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. **Acta Tropica**, 106(6):149-155, 2008.

- GONÇALVES, C.S., PEREIRA, F.E.L., GAYOTTO, L.C.C. Hepatocellular carcinoma in Brasil: report of a national survey (Florianópolis, SC, 1995). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 39 (3): 165-170, 1997.
- GRAMENZI, A.; ANDREONE, P.; LOGGI, E.; FOSCHI, F.G.; CURSARO, C.; MARGOTTI, M.; BISELLI, M.; BERNARDI, M. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection. **Journal of Viral Hepatitis**, 12(5):525-530, 2005.
- GUIDOTTI, L.G.; ISHIKAWA, T.; HOBBS, M.V.; MATZKE, B.; SCHREIBER, R.; CHISARI, F.V. Intracellular inactivation of hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. **Immunity**, 24: 25-36, 1996.
- GUIDOTTI, L.G.; ROCHFORD, R.; CHUNG, J.; SHAPIRO, M., PURCELL, R.; CHISARI, F.V. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. **Science**, 284: 825-829, 1999.
- HADZIYANNIS, S.J. & PAPANICOLAOU, G.V. Hepatitis B e antigen-negative chronic Hepatitis B: natural history and treatment. **Seminars in Liver Disease**, 26(2): 130-141, 2006.
- HSIEH, Y.; CHANG, C.; TSAI, F.; PENG, C.; YEH, L.; LIN, C. Polymorphism for Transforming Growth Factor Beta 1 -509 (TGF-B1-509): association with endometriosis. **Biochemical Genetics**, 43(5/6 june): 203-210, 2005.
- HSU, H.Y., CHANG, M.H., NI, Y.H., LIN, H.H., WANG, S.M., CHEN, D.S. Surface gene mutants of hepatitis B virus in infants who develop acute or chronic infections despite immunoprophylaxis. **Hepatology**, 26: 786-791, 1997.

- HSU, H.Y., CHIEN, R.N., YEH, C.T.; SHEEN, I.S.; CHIOU, H.Y.; CHU, C.M.; LIAW, Y.F. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. **Hepatology**, 35:1522-1527, 2002.
- HUI, C. & LAU, G.K.K. Immune system and hepatitis B virus infection. **Journal of Clinical Virology**, 34(supl 1): S44 – S48, 2005.
- ILOEJE, U.H.; YANG, H.I.; SU, J.; JEN, C.L.; YOU, S.L.; CHEN, C.J. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. **Gastroenterology**, 130:678-686, 2006.
- JACYNA, M.R. & THOMAS, H.C. Pathogenesis and treatment of chronic infection. In: **Viral Hepatitis. Scientific Basis and Clinical Management**. Zuckerman, A.J. & Thomas, H.C. (ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1993. p. 185-205.
- JENG, J.E.; TSAI, J.F.; CHUANG, L.Y.; HO, M.S.; LIN, Z.Y.; HSIEH, M.Y.; CHEN, S.C.; CHUANG, W.L.; WANG, L.Y.; YU, M.L.; DAI, C.Y.; CHANG, J.G. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. **Neoplasia**, 9(11):987-992, 2007.
- KAN, M.; SCHMITZ, A.; RABE, B. Intracellular transport of hepatitis B virus. **World Journal of Gastroenterology**, 13(1): 39-47, 2007.
- KANZLER, S.; LOHSE, A.; KEIL, A.; HENNIGER, J.; DIENES, H.P.; SCHIRMACHER, P.; ROSE-JOHN, S.; MEYER, K.H.; BLESSING, M. TGF- β 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. **American Journal of Physiological Gastrointestinal and Liver Physiology**, 275:1059-1068, 1999.

- KAO, J.H., CHEN, P.J., LAI, M.Y., CHEN, D.S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, 118: 554-559, 2000.
- KAO J.H & CHEN D.S. Global control of hepatitis B virus infection. **Lancet Infectious Diseases**, 2(7):395-403, 2002.
- KAO, J.H; CHEN, P.J.; LAI, M.Y.; CHEN, D.S. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatic B virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, 40(4):1207-1209, 2002.
- KAO, J.H; CHEN, P.J.; LAI, M.Y.; CHEN, D.S. Basal core promoter mutation of hepatitis B virus increased the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. **Gastroenterology**, 124:327-334, 2003.
- KAPLAN, P.M., GERIN, J.L., ALTER, H.I. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. **Journal of Virology**, 12: 995-1005, 1973
- KARASAWA, T., SHIRASAWA, T., OKAWA, Y., KURAMOTO, A., SHIMADA, N., AIZAWA, Y., ZENIYA, M., TODA, G. Association between frequency of amino acid changes in core region of hepatitis B virus (HBV) and the presence of precore mutation in Japanese HBV carriers. **Journal of Gastroenterology**, 32: 611-622, 1997.
- KIKI, I.; YILMAZ, O.; ERDEM, F.; GUNDOGDU, M.; DEMIRCAN, B.; BILICI, M. Tumor necrosis factor- α levels in hepatitis B virus-related chronic active hepatitis and liver cirrhosis and its relationship to Knodell and Child-Pugh scores. **International Journal of Clinical Practices**, 60(9):1075-1079, 2006.

- KLINGMULLER, U. & SCHALLER, H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. **Journal of Virology**, 67 (12): 7414-7422, 1993.
- KRAMVIS, A.; KEW, M.C. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. **Journal of Viral Hepatology**, 12: 456-464, 2005.
- KONDO, Y.; KOBAYASHI, K.; UENO, Y.; SHIINA, M.; NIITSUMA, H.; KANNO, N.; KOBAYASHI, T.; SHIMOSEGAWA, T. Mechanism of T cell hiporesponsiveness to HBcAg is associated with regulatory T cells in chronic hepatitis B. **World Journal of Gastroenterology**, 12(27): 4310-4317, 2006.
- LARRUBIA JR, BENITO-MARTÍNEZ S, MIQUEL-PLAZA J, SANZ-DEVILLALOBOS E, GONZÁLEZ-MATEOS F, PARRA T. Cytokines - their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, 101(5):343-51, 2009.
- LEE, J.A.; KIM, H.Y.; KIM, K.H.; KIM, S.M.; JANG, M.K.; PARK, J.Y.; LEE, J.H.; KIM, J.H.; YOO, J.Y. Association of polymorphism of *IL-10* and *TNF-A* genes with gastric cancer in Korea. **Cancer Letters**, 225:207-214, 2005.
- LEVANCHY, D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. **Journal of Clinical Virology**, 34(suppl I): S1-S3, 2005.
- LIAW, Y.F.; CHEN, Y.C.; SHEEN, I.S.; CHIEN, R.N.; YEH, C.T.; CHU, C.M. Impact of acute hepatitis C virus superinfection in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, 126:1024-1029, 2004.
- LIN, C.L. & KAO, J.H. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. **Journal Biomed Science**, 15: 137-145, 2008.

- LIU, C.J.; CHEN, B.F.; CHEN, P.J.; LAI, M.Y.; HUANG, W.L.; KAO, J.H. Role of hepatitis B virus precore/core promoter mutations and serum viral load on non-cirrhotic hepatocellular carcinoma: a case-control study. **Journal of Infectious Diseases**, 194: 594-599, 2006.
- LIU, M.; CAO, B.; ZHANG, H.; DAÍ, Y.; LIU, X.; XU, C. Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. **Immunogenetics**, 58: 859-864, 2006.
- LIVINGSTONE, S.E.; SIMONETTI, J.P.; McMAHON, B.J.; BULKOW, L.R.; HURLBURT, K.J.; HOMAN, C.E. Hepatitis B virus genotype in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. **Journal of Infectious Diseases**, 195: 5-11, 2007.
- LOBATO, C.; TAVARES-NETO, J.; RIOS-LEITE, M.; TREPO, C.; VITVITSKI, L.; PARVAZ, P.; ZOULIM, F.; D'OLIVEIRA, A.J.R.; PARANÁ, R. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: epidemiologic and biomolecular study. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 21(5): 863-868, 2006.
- LOCARNINI, S. Molecular virology of hepatitis B virus. **Seminars in Liver Disease**, 24 (supl 1): 3-10, 2004.
- LOK, A.S.F. & McMAHON, B.J. Chronic Hepatitis B. **Hepatology**, 45(2):507-539, 2007.
- LUPBERGER, J. & HILDT, E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, 13(1): 74-81, 2007.
- MacCALLUM, F.O. Homologous serum jaundice. **Lancet**, 2: 691-692, 1947.

- MAGNIUS, L.O. & ESPMARK, J.A. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. **Journal of Immunology**, 109(5): 1017-1021, 1972.
- MALHI, H. & GORES, G.J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. **Gastroenterology**, 134(6):1641-54, 2008.
- MASON, W.S., BURRELL, C.J.; CASEY, J.; GERLICH, W.H.; HOWARD, C.R.; KANN, M.; NEWBOLD, J.; SCHAEFER, S.; TAYLOR, J.M.; WILL. H. Hepadnaviridae. In: **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (eds). Amsterdam, 2005.
- MAST EE, WEINBAUM CM, FIORE AE, ALTER MJ, BELL BP, FINELLI L, RODEWALD LE, DOUGLAS JM JR, JANSSEN RS, WARD JW. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. **Morbidity and Mortality Weekly Recommendations Report**, 55(RR-16):1-33, 2006.
- MAZO, D.F.C. & PESSÔA, M.G. Hepatite pelo vírus B em pacientes HBeAg-negativo. In: **Tratado de Hepatologia**. Mattos, A.A. & Dantas-Corrêa, E.B. (eds). Rio de Janeiro, 2010, p. 189-203.
- MAZZUR, S.; BASTIAANS, M.J.; NATH, N. Hepatitis B virus (HBV) infection among children and adults in the Solomon Island. **American Journal of Epidemiology**, 113: 510-519, 1981.
- McGOVERN, B.H. The epidemiology, natural history and prevention of hepatitis B: implications of HIV coinfection. **Antiviral Therapy**, 12(suppl 3): 3-13, 2007.

- McMAHON, B.J. Natural history of chronic hepatitis B – clinical implications. **The Medscape Journal of Medicine**, 10(4): 91, 2008.
- MELLO, F.C.A.; SOUTO, F.J.D.; NABUCO, L.C.; VILLELA-NOGUEIRA, C.A.; COELHO, H.S.M.C.; FRANZ, H.C.F.F.; SARAIVA, J.C.P.; VIRGOLINO, H.A.; MOTTA-CASTRO, A.R.; MELO, M.M.M.; MARTINS, R.M.B.; GOMES, S.A. Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotypes F isolates. **BioMed Central Microbiology**, 7: 103, 2007.
- MIGITA, K.; MIYAZOE, S.; MAEDA, Y.; DAIKOKU, M.; ABIRU, S.; UEKI, T.; YANO, K.; NAGAOKA, S.; MATSUMOTO, T.; NAKAO, K.; HAMASAKI, K.; YATSUHASHI, H.; ISHIBASHI, H.; EGUCHI, K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF- β 1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, 42: 505-510, 2005.
- MILICHI, D. & LIANG, T.J. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. **Hepatology**, 38: 1075-1086, 2003.
- MIRANDA, E.C.B.M.; MOIA, L.J.M.P.; AMARAL, I.S.A.; BARBOSA, M.S.B.; ARAÚJO, M.T.; CRUZ, E.R.M.; DEMACHIKI, S.; BENSABATH, G.; SOARES, M.C.P. Infecções pelos vírus das hepatite B e C e o carcinoma hepatocelular na Amazônia oriental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31(supp II): 47-56, 2004.
- MOIA, L.J.M.P.; AMARAL, I.S.A.; CONDE, S.R.S.S.; BRITO, M.S.B.; MIRANDA, E.C.B.M.; MACEDO, Z.P.; ARAÚJO, M.T.F.; DEMACHIKI, S.; SOARES, M.C.P. Programa de hepatopatias do Hospital Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará

- Infra-estrutura e epidemiologia clínica em 10 anos de atendimento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(suppl II): 57-62, 2004.
- MONTEIRO, M.R.; NASCIMENTO, M.M.; PASSOS, A.D.; FIGUEIREDO, J.F. Seroepidemiological survey of hepatitis B virus among HIV/AIDS patients in Belém, Pará-Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 37(suppl II): 27-32, 2004.
- NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES. Hepatitis B. E.U.A. Disponível: < <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hepatitis>> Acesso em 11 de setembro de 2007.
- NATIVIDAD, A.; WILSON, J.; KOCH, O.; HOLLAND, M.J.; ROCKETT, K.; FAAL, N.; JALLOW, O.; JOOF, H.M.; BURTON, M.J.; ALEXANDER, N.D.; KWIATKOWSKI, D.P.; MABEY, D.C.; BAILEY, R.L. Risk of trachomatous scarring and trichiasis in Gambians varies with SNP haplotypes at the interferon-gamma and interleukin-10 loci. **Genes Immunity**, 6(4):332-340, 2005.
- NGUI, S.L., ANDREWS, N.J., UNDERHILL, G.S., HEPTONSTALL, J., TEO, C. Failed postnatal immunoprophylaxis for hepatitis B: characteristics of maternal hepatitis B virus as risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, 27: 100-106, 1998.
- NI, Y.H.; CHANG, M.H.; WANG, K.J.; HSU, H.Y.; CHEN, H.L.; KAO, J.H.; YEH, S.H.; JENG, Y.M.; TSAI, K.S.; CHEN, D.S. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, 127(6):1733-1738, 2004.

- NORDER, H.; COUROUCE, A.M.; COURSAGET, P. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirology**, 47: 289-309, 2004.
- NUNES, H.M.; MONTEIRO, M.R.C.; SOARES, M.C.P. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D nas áreas indígenas Apyterewa, do grupo Parakanã, Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 23(11): 2256-2766, 2007.
- OHTA, A.; SEKIMOTO, M.; SATO, M.; KODA, T.; NISHIMURA, S.; IWAKURA, Y.; SEKIKAWA, K.; NISHIMURA, T. Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. **Journal of Immunology**, 15;165(2): 956-961, 2000.
- OKAMOTO, H., YOTSUMOTO, S., AKAHANE, T.Y., MIYAZAKI, Y., SUGAI, Y., TSUDA, F., TANAKA, T., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infect hosts along seroconversion to the antibody against e antigen. **Journal of Virology**, 64 (3):1298-1303, 1990.
- OOMMEN, P.T.; WIRTH, S.; WINTERMEYER, P.; GERNER, P. Relationship between viral load and genotypes of hepatitis B virus in children with chronic hepatitis B. **Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition**, 43(3):342-347, 2006.
- OKOCHI, K. & MURAKAMI, S. Observations on Australia antigen in Japanese. **Vox Sanguinis**, 15: 374-385, 1968
- PARANÁ, R & ALMEIDA, D. HBV epidemiology in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, 34(suppl 1): S130-S133, 2005.

- PARANÁ, R; VITVITSKI, L.; PEREIRA, J.E. Hepatotropics viruses in brazilian amazon. **Journal of Brazilian Infectious Diseases**, 12: 253-256, 2008.
- PINHEIRO, L.M.L. **Filogenia molecular do vírus B da hepatite em doadores de sangue no Estado do Pará, norte do Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2010. 130p.
- PERZ, J.F.; ARMSTRONG, G.L.; FARRINGTON, L.A.; HUTIN, Y.J.F.; BELL, B.P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **Journal of Hepatology**, 45: 529-538, 2006.
- PRAVICA, V.; PERRREY, C.; STEVENS, A.; LEE, J.H.; HUTCHINSON, I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human INF- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high INF- γ production. **Human Immunology**, 61:863-866, 2000.
- PRINCE, A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. **Proceedings of National Academy of Sciences**, 60: 814 – 821, 1968.
- POSCH, P.E.; CRUZ, I.; BRADSHAW, D.; MEDHEKAR, B.A. Novel polymorphisms and the definition of promoter “alleles” of the tumor necrosis factor and lymphotoxin α loci: inclusion in HLA haplotypes. **Genes and Immunity**, 4: 547-558, 2003.
- PUNGPAPONG, S.; KIM, R.W.; POTERUCHA, J.J. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. **Mayo Clinic Proceedings**, 82(8): 967-975, 2007.

- PUOTI, M.; TORTI, C.; BRUNO, R.; FILICE, G. ; CAROSI, G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. **Journal of Hepatology**, 44: S65-S70, 2006.
- RAIMONDO, G.; BRUNNETO, M.R.; PONTISSO, P.; SMEDILE, A.; MAINA, A.M.; SAITTA, C. Longitudinal evaluation reveals a complex spectrum of virological profiles in hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfecting patients. **Hepatology**, 43:100-107, 2006.
- REES, L.E.N.; WOOD, N.A.P.; GILLESPIE, K.M.; LAI, K.N.; GASTON, K.; MATHIESON, P.W. The interleukin-10 – 1082 G/A polymorphisms: allele frequency in different populations and functional significance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 59: 560-569, 2002.
- RIBEIRO, C.S.S.; VISENTAINER, J.E.L.; MOLITERNO, R.A. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102(4): 435-440, 2007.
- ROBINSON, W.S. DNA and DNA polymerase in the core of the Dane particle of hepatitis B. **American Journal of Medicine and Science**, 270: 151-159, 1975.
- SÁNCHEZ-TAPIAS, J.M.; COSTA, J.; MAS, A.; BRUGUERA, M.; RODÉS, J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. **Gastroenterology**, 123(6):1848-1856, 2002.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 74(12): 5463-5467, 1977.
- SANTOS, A.K.C.R.; ISHAK, M.O.G.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; ISHAK, R. A possible correlation between the host genetic background in the epidemiology

- of hepatitis B virus in the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 90(4): 435-441, 1995.
- SEEGER, C. & MASON, W. Hepatitis B virus biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64 (1): 51-68, 2000.
- SCHAEFER, S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. **World Journal of Gastroenterology**, 13 (1):14-21, 2007.
- SCHOENBORN, J.R. & WILSON, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, 96:41-101, 2007.
- SHI M, FU J, SHI F, ZHANG B, TANG Z, ZHANG Z, ZHANG H, JIN L, CHEN L, WANG H,AKBAR SM, WANG FS. Viral suppression correlates with dendritic cell restoration in chronic hepatitis B patients with autologous cytokine-induced killer cell transfusion. **Liver International**, 29(3): 466-474, 2008.
- SHI, Y.H. & SHI, C.H. Molecular characteristics and stages of chronic hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, 7;15(25):3099-3105, 2009.
- SHIMIZU, Y.; GUIDOTTI, L.G.; FOWLER, P.; CHISARI, F.V. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. **The Journal of Immunology**, 161:4520-4529, 1998.
- SHIMIZU, I.; KOHNO, N.; TAMAKI, K.; SHONO, M.; HUANG, H.W.; HE, J.H.; YAO, D.F. Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, 13 (32): 4295-4305, 2007.
- SILVA, L.C. Aspectos clínicos e diagnósticos das hepatites por vírus e por outras causas. In: **Hepatites Agudas e Crônicas**. Silva, L.C. (3 ed.), São Paulo, 2003, p. 135-147.

- SILVEIRA, T.R., FONSECA, J.C., RIVERA, L., FAY, O.H., TAPIA, R., SANTOS, J.I., URDENETA, E., CLEMENS, S.A. Hepatitis B seroprevalence in Latin America. **Revista Panamericana de Salud Publica**, 6 (6): 378-383, 1999.
- SIGNH R.; KAUL, R.; KAUL, A.; KHAN, K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C infections across global populations. **World Journal of Gastroenterology**, 13(12):1770-1787, 2007.
- SITNIK, R., PINHO, J.R.R., SILVA, L.C., FONSECA, L.E.P., CARRILHO, F.J., BERNARDINI, A.P. Genótipos do vírus da hepatite B e mutações na região pré-core (VHB) em pacientes brasileiros com hepatite crônica B. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, 18 (supl 1): S25, 1999. (Resumo).
- SOUTO, F. J. D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, 18 (4): 143-150, 1999.
- SUGIURA, Y.; NIIMI, T.; SATO, S.; YOSHINOUCI, T.; BANNO, S.; NANIWA, T.; MAEDA, H.; SHIMIZU, S.; UEDA, R. Transforming growth factor beta 1 gene polymorphism in rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatic Diseases**, 61: 826-828, 2002.
- TAMURA, I.; KURIMURA, O.; KODA, T.; ICHIMURA, H.; KATAYAMA, S.; KURIMURA, T. Risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in subjects with hepatitis B and delta virus infection: a study from Kure, Japan. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 8: 433-436, 1993.
- TAKAHASHI, K., AOYAMA, K., OHNO, N., IWATA, K., AKAHANE, Y., BABA, K., YOSHIZAWA, H., MISHIRO, S. The precore/core promoter mutant

- (T1762/A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and easy method for detection. **Journal of General Virology**, 76: 3159-3164, 1995.
- TAKAHASHI, K., OHTA, Y., KANAI, K., AKAHANE, Y., IWASA, Y., HINO, K., OHNO, N., YOSHIZAWA, H., MISHIRO, S. Clinical implications of mutations C-to-T1653 and T-to-C/ A/ G1753 of hepatitis B virus genotype C in chronic liver disease. **Archives of Virology**, 144: 1299-1308, 1999.
- TANG, J.T.; FANG, J.Y.; GU, W.Q.; LI, E.L. T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. **World Journal of Gastroenterology**, 12(19): 3015-3019, 2006.
- THIMME, R.; WIELAND, S.; STEIGER, C.; GHRAYEB, J.; REIMANN, K.A.; PUCELL, R.H.; CHISARI, F.V. CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. **Journal of Virology**, 77(1): 68-76, 2003.
- TONETTO, P.A.; GONÇALES, N.S.; FAIS, V.C.; VIGANI, A.G.; GONÇALES, E.S.; FELTRIN, A., GONÇALES, F.L. JR. Hepatitis B virus: molecular genotypes and HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. **BioMedicalCenter Infectuos Diseases**, 8(9):149, 2009.
- TORONTOLIVER.CA. Hepatitis B. Disponível em: <<http://torontoliver.ca/content/hepatitisb>>. Acesso em: 27/03/2010.
- TZAKAS, P.; WONG, B.Y.L.; LOGAN, A.G.; RUBIN, L.A.; COLE, D.E.C. Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and peak bone mass: association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the heel. **BioMed Central Musculoskeletal Disorders**, 6: 29-39, 2005.

- UCHIDA, T., SAITOH, T., SHINZAWA, H. Mutation of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. **Pathology International**, 47: 183-193, 1997.
- VIANA, S.; PARANÁ, R.; MOREIRA, R.C.; COMPRI, A.P.; MACEDO, V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian amazon. **American Journal of Tropical and Medicine and Hygiene**, 73(4): 808-814, 2005.
- VIDIGAL, P.G.; GERMER, J.J.; ZEIN, N.N. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transformin growth factor-beta 1 genes in chronic hepatic C patients treated with interferon and ribavirin. **Journal of Hepatology**, 36:271-277, 2002.
- VIERLING, J.M. The immunology of hepatitis B. **Clinics in Liver Disease**, 11(4):727-59, 2007.
- VILLENEUVE, J.P. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Clinical Virology**, 34(suppl 1): S139-S142, 2005.
- VISVANATHAN, K. & LEWIN, S.R. Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses. **Seminars in Liver Disease**, 26(2):104-15, 2006.
- WANG J, NI H, CHEN L, SONG WQ. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with hepatitis B virus infection or hepatocellular carcinoma in Chinese Han ethnic population. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, 5(1): 60-4, 2006.
- WANG, Z.; HUANG, Y.; WEN, S.; ZHOU, B.; HOU, J. Hepatitis B virus genotypes and subgenotypes in China. **Hepatology Research**, 37(s1): S36-41, 2007.
- WEBSTER, G.J.M; REIGNAT, S.; MAINI, M.K.; WHALLEY, S.A.; OGG, G.S.; KING, A.; BROWN, D.; AMLOT, P.L.; WILLIAMS, R.; VERGANI, D.;

- DUSHEIKO, G.M.; BERTOLETTI, A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. **Hepatology**, 32: 1117-1124, 2000.
- WELLS, R.G. TGF- β signaling pathways. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, 279: G845-G850, 2000.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress towards global immunization goals – 2006. Summary presentation of key indicators. Geneva, September, 2007.
- WIELAND, S.; THIMME, R.; PUCELL, R.H.; CHISARI, F.V. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 101(17): 6669 – 6674, 2004.
- WIELAND, S.F. & CHISARI, F.V. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. **Journal of Virology**, 79(15): 9369 – 9380, 2005.
- WILSON, A.G.; SYMONS, J.A.; McDOWELL, T.L.; McDEVITT, H.O.; DUFF, G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 94: 3195-3199, 1997.
- WONG, G.L.H.; WONG, V.W.S.; CHOI, P.C.L.; CHAN, A.W.H.; CHIM, A.M.L.; YIU, K.K.L.; CHAN, Y.H.; CHAN, F.K.L.; SUNG, J.J.Y.; CHAN, H.L.Y. Metabolic syndrome increases the risk of liver cirrhosis in chronic hepatitis B. **Gut**, 58(1): 111-117, 2009.
- YOU, J.; SRIPLUNG, H.; GEATER, A.; CHONGSUVIVATWONG, V.; ZHUANG, L.; CHEN, H.Y.; HUANG, J.H.; TANG, B.Z. Hepatitis B virus DNA is more powerful than HBeAg in predicting peripheral T-lymphocyte subpopulations in chronic HBV-infected individuals with normal liver function tests. **World Journal of Gastroenterology**, 14(23): 3710-3718, 2008.

- YU, H.; ZHU, Q.R.; GU, S.Q.; FEI, L.E. Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. **World Journal of Gastroenterology**, 14;12(18): 2928-31, 2006.
- YUEN, M.F.; TANAKA, Y.; NgiOL, M.; YUEN, J.C.H.; WONG, K.H. Hepatic necroinflammation and fibrosis and fibrosis in patients with genotypes Ba and C, core-promoter and precore mutations. **Journal of Viral Hepatitis**, 12: 513-518, 2005.
- YUEN, M.F.; WONG, D.K.H; ZHENG, B.J.; CHAN, J.C.H.; YUEN, J.C.H.; WONG, B.C.Y.; LAI, C.L. Difference in T helper responses during hepatitis flares in hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive patients with genotypes B and C: implication for early HBeAg seroconversion. **Journal of Viral Hepatitis**, 14: 269-275, 2007.
- ZHANG, L.J. & WANG, X.Z. **World Journal of Gastroenterology**, 12(11):1681-1685, 2006.
- ZHANG, P.; CHEN, Z.; CHEN, F.; LI, M.W.; FAN, J.; ZHOU, H.M.; LIU, J.H.; HUANG, Z. Expression of IFN-gamma and its receptor alpha in the peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. **Chinese Medical Journal**, 17(1):79-82, 2004.
- ZOULIM, F.; SAPUTELLI, J.; SEEGER, C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. **Journal of Virology**, 68 (3): 2026-2030,1994.

ANEXOS**ANEXO A**

**FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA – ICB
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS/SVS/MS**

ANATOMIA PATOLÓGICA – FACULDADE DE MEDICINA/UFPA

Projeto de Pesquisa - Correlação do nível sérico e do polimorfismo do gene de citocinas com a apresentação clínica da infecção crônica pelo *Vírus da hepatite B*, em pacientes da Amazônia oriental.

DATA DA INVESTIGAÇÃO:...../...../.....

NÚMERO DO PRONTUÁRIO:.....

NOME..... SEXO F / M DNAS...../...../.....

IDADE.....

LOCAL NASC..... ESTADO..... ETNIA.....

PROFISSÃO..... E. CIVIL.....

PROCEDÊNCIA..... ESTADO.....

ENDEREÇO..... FONE.....

....

RESIDÊNCIAS ANTERIORES (CIDADE, ESTADO)

PERÍODO

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ANTECEDENTES PESSOAIS

ETILISMO ()ml / etanol puro/ dia TEMPO..... anos TIPO DE

BEBIDA.....

HEPATITE () (MÊS/ANO)/.....

TRANSFUSÃO SANGÜÍNEA () DATA...../...../.....

CIRURGIA () DATA...../...../.....

HEMODIÁLISE () INÍCIO...../.....

HETEROSSEXUAL PROMÍSCUO () HOMOSSEXUAL ()

TOXICÔMANO () INJETÁVEL () ASPIRATIVA ()

TATUAGEM () ACUNPUNTURA ()

MEDICAÇÃO HEPATOTÓXICA ()

QUAL?.....

MEDICINA NATURAL ()

QUAL?.....

ANTICONCEPCIONAIS () TEMPO..... (ANOS) TIPO.....

ANTECEDENTES FAMILIARES

DOENÇA HEPÁTICA CRÔNICA NA FAMÍLIA ()

CAUSA (HBV – HCV – ÁLCOOL – AUTOIMUNE – IGNORA)

RELAÇÃO DE PARENTESCO

QUEIXA PRINCIPAL.....

INÍCIO DOS SINAIS/SINTOMAS...../.....

OUTRAS DOENÇAS: DIABETES () HANSEN () LES () IRC () CARDÍACO ()

HAS ()

SEQUELAS () OUTRAS.....

SINAIS/SINTOMAS

FEBRE () ASTENIA () ANOREXIA () EMAGRECIMENTO () DOR ABDOMINAL ()
 PLENITUDE GÁSTRICA() SONOLÊNCIA() INV. SONO() DESORIENTAÇÃO()
 FLAPPING() EDEMA PERIFÉRICO() TELANGIECTASIA() ERITEMA PALMAR()
 ERITEMA PALMAR() GINECOMASTIA() HIPOGONADISMO()
 CIRCULAÇÃO COLATERAL() HEMORRAGIA CUTÂNEO/MUCOSA() MELENA()
 HEMATÊMESE() ICTERÍCIA() PALIDEZ() BAQUETEAMENTO() XANTOMAS()
 XANTELASMAS() PRURIDO() COLURIA() INSUF. RENAL() OUTROS()

MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS()

VASCULITE() ARTRITE() MONONEURITE() POLINEURITE() MIELITE() ACNE()
 ANEMIA HEMOLÍTICA() CRIOGLOBULINEMIA() TIREOIDITE() MIOCARDITE()
 MANIFESTAÇÃO DERMATOLÓGICA () GLOMERULONEFRITE () OUTRAS ().....

HEPATOMEGALIA() RCD cm..... AX cm.....

ESPLENOMEGALIA() GRAU 1 – 2 – 3 – 4

ASCITE ()

ENDOSCOPIA() - NORMAL()

GASTROPATIA HIPERTENSIVA() VARIZES DE ESÔFAGO() – FINO / MEDIO / GROSSO
 CALIBRE - VARIZES GÁSTRICAS()
 OUTROS().....

ULTRA-SONOGRAFIA ABDOMINAL() – NORMAL()

HEPATOMEGALIA() REDUZIDO() HETEROGÊNEO() HOMOGÊNEO() DILATAÇÃO VEIA
 PORTA() ESPLENOMEGALIA() ASCITE() NÓDULOS()

OUTROS().....

TOMOGRAFIA() – NORMAL()

HEPATOMEGALIA() REDUZIDO() HETEROGÊNEO() HOMOGÊNEO() DILATAÇÃO VEIA
 PORTA() ESPLENOMEGALIA() ASCITE() NÓDULOS()

OUTROS().....

BIÓPSIA HEPÁTICA()

DIAG.....

SBP: Atividade peri-portal peri-septal: 0 – 1 – 2 – 3 – 4

Atividade Estrutural 0 -1 – 2 – 3 – 4

METAVIR: Atividade peri-portal peri-septal: 0 – 1 – 2 – 3

Atividade Estrutural 0 -1 – 2 – 3 – 4

BT..... BD..... ALBUMINA..... GLOBULINA..... AST..... ALT..... δGT.....
 FOSFATASE ALCALINA..... TAP..... ALFA-FETOPROTEÍNA.....
 FERRO SÉRICO..... FERRITINA..... CERULOPLASMINA.....
 HEMÁCIAS..... HB..... HT..... LEUCÓCITOS..... PLAQUETAS.....
 FAN.....(.....) PADRÃO.....
 AML.....(.....) ALKM1.....(.....) AMT.....(.....)

SOROLOGIA

HBsAg..... anti-HBc IgM..... anti-HBc..... HBeAg..... anti-HBe.....

DNA-HBV..... Carga viral..... cópias / mL
 Anti-HCV..... PCR-RNA..... anti-HDV..... anti-HIV

BIOLOGIA MOLECULAR

GENÓTIPO A – B – C – D – E – F – G - H

MUTAÇÃO A-1896() MUTAÇÃO A-1899() OUTRAS MUTAÇÕES().....

NÍVEL SÉRICO DE CITOCINAS

TNF α pg/mL INF γ pg/mL

TGF β pg/mL IL-10 pg/mL

POLIMORFISMO DO GENE

TNF α : () – 308GG () – 308GA () – 308AA

INF γ : () + 874TT () + 874TA () + 874AA

TGF β : () – 509TT () – 509TC () – 509CC

IL-10: () – 1082AA () – 1082AG () – 1082GG

DIAGNÓSTICO: PORTADOR INATIVO ()

HEPATITE CRÔNICA ()

CIRROSE ()

HEPATOCARCINOMA ()

GRUPO CONTROLE ()

ÓBITO() CAUSA.....

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO..... DATA...../...../.....

ANEXO B



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

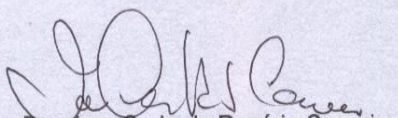
TERMO DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética em Pesquisa analisou no dia 13 de março de 2006 o projeto de pesquisa intitulado **“CORRELAÇÃO DO NÍVEL SÉRICO E DO POLIMORFISMO NOS GENES DE CITOCINAS COM APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HEPATITE B CRÔNICA”** de autoria da pesquisadora Prof^a. Ms. Simone Regina Souza da Silva Conde, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolvê-lo, nesta Instituição.

Belém, 25 de março de 2006.

Informo ainda, que V. As. Deverá apresentar relatório semestral (previsto para 30/05/06), anual e/ ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto (item VII.13.d. da Resolução nº 196/96 – CNS / MS).

Atenciosamente,


Dra. Irna Carla do Rosário Carneiro
Vice-Coordenadora do CEP

ANEXO C

FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA – CCB
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA – UFPA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

- 1- Estou sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre correlação dos níveis sérico e polimorfismo do gene das citocinas (TNF α , INF γ e TGF- β 1) com apresentação clínica e histopatologia da infecção crônica pelo vírus da hepatite B, em pacientes da Amazônia oriental, que está sendo desenvolvida na Fundação Santa Casa, no laboratório do Instituto Evandro Chagas e no de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA).
- 2- Para que eu decida em participar ou não da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
- 3- A pesquisadora responsável é a Dra. Simone Regina Souza da Silva, médica e professora de Clínica Médica da UFPA .
- 4- O objetivo da pesquisa é avaliar a associação entre as citocinas e o polimorfismo de seus genes com o padrão de infecção crônica pelo vírus da hepatite B.
- 5- Para esta pesquisa, será coletada uma pequena quantidade de sangue (10 mL) e nos casos possíveis será realizada uma biópsia do fígado.
- 6- Os possíveis riscos incluem dor local e sangramentos. Todos os pacientes permanecerão em observação por quatro horas após a realização da biópsia, sendo utilizados todos os meios para evitar estes riscos. Serão utilizados materiais descartáveis, como agulhas e seringas.
- 7- Além da coleta de sangue e biópsia hepática, os dados referentes a todo seu acompanhamento e história clínica serão transportados para uma ficha de protocolo, permitindo comparar os resultados do questionário com os achados nos testes de sangue.
- 8- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar o estudo no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa, garantindo o atendimento médico participando ou não da pesquisa.
- 9- Não haverá nenhum tipo de despesa para participação, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
- 10- O grande benefício desta pesquisa para todos que participam é possibilitar um melhor entendimento sobre a influência da resposta imunológica do hospedeiro (pessoa infectada) através de suas citocinas no tipo de evolução da doença crônica do fígado pelo vírus da hepatite B. Alguns que se infectam podem eliminar espontaneamente o vírus, enquanto outros se tornam crônicos, podendo evoluir para cirrose ou tumor fê fígado.
- 11- A participação é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.
- 12- Ao final da pesquisa, os resultados serão fornecidas a todos os participantes através do contato direto com seu médico assistente.

13- Qualquer dúvida sobre a pesquisa, o paciente poderá em contato com a Dra. Simone Conde, no ambulatório de doenças hepáticas da Fundação Santa Casa, de 7:00 às 11:00h, nas segundas, quartas e quintas-feiras, ou pelo telefone 4009-2273.

Assinatura do Pesquisador Responsável

No. da Carteira de Identidade

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido (a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar, cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, _____ / _____ / _____

Assinatura do Participante ou Responsável Legal

No. da Carteira de Identidade

Prontuário: _____


Protocolo: _____

Fone de contato: (91) 4009-2273

Ambulatório de Doença Hepática da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará

ANEXO D

055

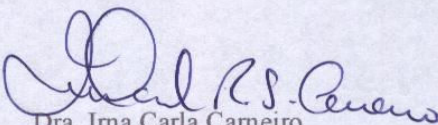


**GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará está de acordo com a solicitação da pesquisadora Simone Regina Souza de Silva Conde, responsável pelo projeto “Correlação do Nível Sérico do Polimorfismo de Genes de Citocinas com a Apresentação Clínica da Hepatite B Crônica” em utilizar amostras de banco de dados do Laboratório de Virologia do ICB / UFPA, respeitando as normas vigentes de pesquisa em seres humanos.

Atenciosamente


Dra. Ima Carla Carneiro
Dra. Ima Carla Carneiro
Assessora - GCIH/FSCMPA
CRM 4099