

Gaspar Lisboa Neto

Influência da infecção pregressa pelo vírus da
hepatite B em portadores de hepatite C crônica:
análise histológica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lisboa Neto, Gaspar

Influência da infecção progressiva pelo vírus da hepatite B em portadores de hepatite C crônica : análise histológica / Gaspar Lisboa Neto. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Antonio Alci Barone.

Descritores: 1.Hepatite C crônica/epidemiologia 2.Hepatite C crônica/fisiopatologia
3.Vírus da hepatite B 4.Anticorpos anti-hepatite B 5.Hepatite B oculta 6.Estudos
transversais

USP/FM/SBD-077/09

*Aos meus pais Edivaldo e Maria Auxiliadora e à minha irmã Samantha,
pelo imenso apoio durante a realização desta dissertação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Alci Barone, pela orientação neste estudo e pela oportunidade ímpar a qual foi me dada para o aprendizado e aprimoramento na assistência aos pacientes portadores de hepatites virais.

À Dra. Norma de Paula Cavalheiro, pela amizade e pelo grande auxílio científico na confecção desta dissertação.

À Dra. Fatima Mitiko Tengan, pela valorosa contribuição durante a fase de delineamento deste estudo.

Ao Dr. Evaldo Stanislau Affonso de Araújo e Dr. Evandro Sobroza de Mello, pelas importantes sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. João Silva de Mendonça, pela sólida formação durante os anos de residência médica e pela contribuição no exame de qualificação.

Ao Prof. Lúcio Benedito Rennó Salomon, pela colaboração na análise estatística.

Ao SAME – HC FMUSP, pela pronta disponibilização dos prontuários médicos para revisão.

À secretária Roseli Antonia Santo, da Pós-Graduação do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, pelo apoio e suporte.

Aos colegas do Ambulatório de Hepatites Virais do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias e do Laboratório de Investigação Médica em Hepatites Virais (LIM-47), pelo ótimo ambiente de trabalho e espírito colaborativo.

Aos pacientes, principal motivação desta pesquisa.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	
Lista de gráficos e figuras	
Lista de abreviaturas e siglas	
Resumo	
Summary	
INTRODUÇÃO	1
1. O vírus da hepatite C	3
1.1. Histórico	3
1.2. Epidemiologia da infecção pelo vírus C	4
1.3. Vias de transmissão	7
1.4. Virologia	11
1.5. Imunopatogênese	17
1.6. Infecção aguda pelo vírus C	20
1.7. Infecção crônica pelo vírus C	22
1.8. Diagnóstico	24
1.9. História natural da infecção pelo vírus C	28
1.10. Fatores associados à progressão da hepatite C crônica	31
2. O vírus da hepatite B	40
2.1. Epidemiologia da infecção pelo vírus B	40
2.2. Vias de transmissão	42
2.3. Virologia	43
2.4. Mecanismos de persistência viral	50
2.5. Hepatite B oculta	57
2.6. Influência da infecção pelo VHB na história natural da hepatite C crônica ...	61
JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	66
OBJETIVOS	67
CASUÍSTICA E MÉTODOS	68
1. Definições	68
2. Tipo de delineamento	68
3. Local do estudo	69
4. Indivíduos em estudo	69
5. Dinâmica do atendimento ambulatorial	70
6. Exames laboratoriais	71
7. Detecção viral através de técnica de biologia molecular	72
8. Análise do fragmento hepático	72
9. Amostragem	76
10. Seleção de pacientes	77
11. Instrumento	78
12. Cálculo da taxa de progressão de fibrose	83
13. Análise estatística	84

14. Aspectos éticos.....	86
15. Revisão bibliográfica	86
RESULTADOS	87
1. Caracterização dos indivíduos portadores de hepatite C crônica e infecção progressa pelo vírus B	91
2. Análise comparativa entre portadores de hepatite C crônica de acordo com a infecção progressa pelo vírus B.....	99
2.1. Comparação histológica entre pacientes portadores de hepatite C crônica em relação a infecção progressa pelo vírus B.....	106
2.2. Taxa de progressão da fibrose hepática.....	109
3. Fatores preditores de fibrose hepática acentuada.....	111
3.1. Análise univariada.....	111
3.2. Análise multivariada.....	114
DISCUSSÃO	118
CONCLUSÕES	139
ANEXOS	141
REFERÊNCIAS	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Possíveis situações de imunossupressão e reativação clínica do VHB.....	52
Tabela 2 - Pacientes candidatos ao diagnóstico de infecção oculta pelo VHB.	58
Tabela 3 - Correspondência entre o tipo de bebida consumida e conteúdo alcoólico.....	82
Tabela 4 - Distribuição das frequências indivíduos com sorologia anti-HBcAg isolado de acordo com índice S/CO do método empregado	91
Tabela 5 - Comorbidades encontradas em pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B	92
Tabela 6 - Fatores de risco associados à aquisição de infecção pelo vírus C em pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B	93
Tabela 7 - Distribuição de pacientes com histórico de tabagismo quanto à intensidade de uso	94
Tabela 8 - Distribuição de pacientes com histórico de etilismo quanto à intensidade de uso	94
Tabela 9 - Frequência dos genótipos do vírus C em portadores de infecção pregressa pelo vírus B	94
Tabela 10 - Frequências, medidas de tendência central e dispersão dos exames laboratoriais.....	95
Tabela 11 - Relação entre os achados anatomopatológicos de pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo VHB distribuídos de acordo com a presença do anti-HBsAg.....	97
Tabela 12 - Marcadores etiológicos histológicos em portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B	98
Tabela 13 - Distribuição dos indivíduos quanto ao sexo e faixa etária de acordo com o status sorológico anti-HBcAg.....	99
Tabela 14 - Distribuição dos indivíduos quanto as comorbidades de acordo com o status sorológico anti-HBcAg.....	100

Tabela 15 - Fatores de risco potenciais à aquisição de infecção de acordo com o status sorológico anti-HBcAg	101
Tabela 16 - Comparação entre o uso acentuado de álcool e cigarro de acordo com status sorológico anti-HBcAg	101
Tabela 17 - Genótipos do vírus C distribuídos de acordo com a detecção do anti-HBcAg	102
Tabela 18 - Exames laboratoriais distribuídos de acordo com status sorológico anti-HBcAg	103
Tabela 19 - Relação entre os achados anatomopatológicos em portadores de hepatite C crônica com e sem infecção pregressa pelo VHB	107
Tabela 20 - Análise univariada de possíveis preditores de fibrose hepática acentuada, por método de Regressão Logística binária	113
Tabela 21 - Análise multivariada de possíveis preditores de fibrose hepática acentuada, por método de Regressão Logística seqüencial, modelo final	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Genótipos do vírus C encontrados em maior frequência nos pacientes atendidos pelo DMIP-HC FMUSP	88
Gráfico 2 - Proporção de pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C quanto à infecção pregressa pelo vírus B atendidos pelo ambulatório de DMIP-HC FMUSP	90
Gráfico 3 - Proporção de pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C e infecção pregressa pelo vírus B em relação à presença do anti-HBsAg atendidos pelo ambulatório de DMIP-HC FMUSP	90
Gráfico 4 - Comparação do tempo de infecção pelo vírus C entre pacientes com e sem infecção pregressa pelo vírus B	110
Gráfico 5 - Comparação da taxa de progressão de fibrose hepática entre pacientes com e sem infecção pregressa pelo vírus B	110
Gráfico 6 - Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para preditores de fibrose avançada, de acordo com modelo de Regressão Logística multivariado	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa genômico do VHC	12
Figura 2 - Antígenos e anticorpos detectáveis pelos testes imunoenzimáticos ...	25
Figura 3 - Seleção dos indivíduos em estudo de acordo com critérios adotados.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VHC	Vírus da hepatite C
VHB	Vírus da hepatite B
NANBH	Hepatite não-A não-B
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
NS	Não estrutural
ISDR	Região determinante de sensibilidade ao interferon
HVR	Região hipervariável
NK	<i>Natural Killer</i>
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
IL	Interleucina
INF	Interferon
DC	Célula dendrítica
TNF	Fator de necrose tumoral
IRF	Fator regulador do interferon
CTL	Linfócito T citotóxico
PCR	Reação pela Cadeia de Polimerase
cccDNA	<i>Covalently closed circular DNA</i>
PBMC	Células linfomonucleares de sangue periférico
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
DMIP	Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

RESUMO

Lisboa Neto G. *Influência da infecção pregressa pelo vírus da hepatite B em portadores de hepatite C crônica: análise histológica* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009, 172p.

INTRODUÇÃO: Os vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC) são os principais causadores de hepatopatia crônica em todo mundo. Ambos compartilham vias semelhantes de transmissão. Em pacientes portadores crônicos de VHC com sorologia compatível com infecção pregressa pelo VHB (anti-HBcAg[+] e HBsAg [-]), o VHB DNA residual tem sido detectado por técnicas de biologia molecular altamente sensíveis no soro, em células linfomononucleares de sangue periférico e em hepatócitos (como cccDNA), de forma que o anti-HBcAg tem sido associado a pior prognóstico, tanto histológico quanto terapêutico. **OBJETIVOS:** Analisar a associação entre infecção pregressa pelo VHB nos portadores crônicos do VHC e o dano histológico hepático, além das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais destes pacientes em região de baixa prevalência para o VHB. **MÉTODOS:** A prevalência do anti-HBcAg foi avaliada em 574 pacientes portadores crônicos de VHC atendidos durante o ano de 2006 no ambulatório de Hepatites Virais do DMIP-HC FMUSP. Deste grupo, foram selecionados 215 pacientes (98 de 112 com anti-HBcAg[+] e 117 de 462 monoinfectados pelo VHC) para análise comparativa. Ainda, 145 indivíduos foram submetidos à análise estatística multivariada, por metodologia de Regressão Logística sequencial, para identificação de possíveis preditores de fibrose avançada. **RESULTADOS:** Foram avaliados 98 pacientes com marcadores sorológicos de infecção pregressa pelo VHB. Quarenta e seis indivíduos (47%) possuíam o anti-HBcAg de forma isolada. O principal fator de risco relacionado à infecção viral foi hemotransfusão (31,6%). Contudo, a frequência de UDI foi maior no grupo com infecção pregressa pelo VHB, em relação aos 117 indivíduos monoinfectados pelo VHC ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao estadiamento ($p = 0,40$) ou à graduação necroinflamatória histológica (APP, $p = 0,70$) entre esses dois grupos. O tempo de infecção e a taxa de progressão de fibrose também foram semelhantes ($p = 0,99$ e $p = 0,61$, respectivamente). A presença do anti-HBcAg não foi considerada preditora de fibrose hepática avançada ($p = 0,11$), porém identificamos como variáveis independentes o tabagismo acentuado (OR 4,40; IC95%: 1,30-14,87), aumento da ALT (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,03), de γ -gt (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,01) e leucopenia (OR 7,75; IC95%: 2,13-28,23). **CONCLUSÃO:** A prevalência de infecção pregressa pelo VHB em portadores de infecção crônica pelo VHC foi de 20%, sendo este valor compatível com outros estudos realizados em regiões de endemicidade semelhante. A frequência do marcador anti-HBcAg isolado foi alta neste grupo, refletindo uma possível supressão da imunidade humoral contra o VHB frente a resposta dirigida ao VHC. A infecção pregressa pelo VHB não parece acentuar ou acelerar o dano histológico hepático no nosso meio.

Descritores: 1.Hepatite C crônica/epidemiologia 2.Hepatite C crônica/fisiopatologia 3.Vírus da hepatite B 4.Anticorpos anti-hepatite B 5.Hepatite B oculta 6.Estudos transversais

SUMMARY

Lisboa Neto G. *Influence of previous HBV infection in patients with chronic hepatitis C: histological assessment* [Dissertation]. São Paulo: University of São Paulo Medical School; 2009, 172p.

INTRODUCTION: Hepatitis B (HBV) and C (HCV) virus are the main causes of chronic hepatic disease worldwide. Both viruses share similar transmission routes. In chronic HCV infected patients with serological markers of resolved HBV infection (anti-HBcAg [+] and HBsAg [-]), residual HBV-DNA has been detected through highly sensible techniques in serum, PBMC and hepatocytes (as cccDNA). In fact, anti-HBcAg has been associated with worse prognoses, severe histological liver damage and less sustained virological response to HCV treatment. **OBJECTIVE:** Assess the relationship between previous HBV infection (anti-HBcAg [+]; HBsAg [-]) in patients with chronic hepatitis C (HCV) and histological damage, considering epidemiological, clinical and laboratorial characteristics of this group in a region of low prevalence for HBV. **METHODS:** Anti-HBcAg prevalence was evaluated in 574 patients seen during a period of one year in a tertiary center (University of Sao Paulo General Hospital, Sao Paulo, Brazil). Of this group, 215 subjects addressed selection criteria and have been selected for evaluation (98 of 112 carriers of anti-HBcAg and 117 of 462 infected only by HCV). 145 individuals have undergone analysis for identification of predictors of advanced fibrosis through univariate and multivariate stepwise logistic regression. **RESULTS:** Nineteen-eight subjects with serological markers of previous HBV infection were evaluated. Forty-six (47%) patients had anti-HBcAg in isolated form. The main risk factor for infection was blood transfusion (31,6%). However, the IDU frequency was greater in this group ($p < 0.05$). There was no difference regarding histological staging (fibrosis ranging from 0 to 4, $p = 0.40$) or grading (portal inflammation, $p = 0.70$) compared with subjects infected only by HCV with no markers of HBV infection. The rate of fibrosis progression (in units per year) and the infection length was similar in these two groups ($p = 0,61$ and $p = 0,99$, respectively). Anti-HBcAg was not considered a predictor for advanced fibrosis ($p = 0.11$). However, we identified tobacco smoking (OR 4.40; CI 95%: 1.30-14.87), increased ALT (OR 1.01; CI 95%: 1.00-1.03), increased γ -gt (OR 1.01; CI 95%: 1.00-1.01) and leucopenia (OR 7.75; CI 95%: 2.13-28.23) as independent variables. **CONCLUSION:** The prevalence of resolved HBV infection in subjects with chronic hepatitis C was 20%. This result was equivalent to other studies carried out in regions of similar endemicity. The frequency of the isolated anti-HBcAg was higher in this group, reflecting a possible suppression of the humoral immunity against HBV caused by an active immune response directed to HCV. Former and resolved HBV infection does not seem to increase or accelerate histological damage in our geographical area.

Descriptors: 1.Hepatitis C, chronic/epidemiology 2.Hepatitis C, chronic/physiopathology 3.Hepatitis B virus 4.Hepatitis B antibodies 5.Occult hepatitis B 6.Cross-sectional studies

INTRODUÇÃO

As hepatites virais constituem grave problema de saúde pública, sendo responsáveis pela grande maioria das hepatopatias crônicas em todo mundo^(1,2). Estima-se que atualmente haja cerca de 160 milhões de portadores de infecção crônica pelo vírus C e cerca de 450 milhões de pessoas vivendo com hepatite B crônica (3% e 7% da população mundial, respectivamente). Estes números tornam-se extremamente relevantes, uma vez que o arsenal terapêutico disponível para ambas as formas se mantém longe do ideal⁽³⁾.

A grande maioria dos indivíduos que se infectam com o vírus C (VHC) torna-se portadora do mesmo de forma persistente, permanecendo sob o risco de complicações hepáticas progressivas⁽⁴⁾. Seu impacto clínico é notório, uma vez que a hepatite C crônica é responsável pelo desenvolvimento de 27% dos casos de cirrose e 25% dos casos de carcinoma hepatocelular em todo mundo, além de ser a principal etiologia de doença hepática terminal levando a necessidade de transplante hepático⁽⁵⁻⁷⁾.

Seu curso evolutivo é dinâmico e altamente influenciável por agentes exógenos, endógenos e pelas condições imunológicas do hospedeiro. O entendimento destes fatores torna-se essencial para seu potencial controle, visto que, na atualidade, o tratamento considerado de maior eficácia constitui na combinação do interferon alfa peguilado associado à ribavirina. Este é capaz de promover resposta virológica sustentada em aproximadamente 50% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 – este de maior frequência no Brasil e em países industrializados – e em cerca de 80% dos indivíduos infectados pelos genótipos 2 e 3^(8,9).

Dentre os fatores modificadores de sua história natural, o estudo da co-infecção com o vírus B (VHB) torna-se relevante. A prevalência da infecção dupla é bastante variável^(10,11). Contudo, é consenso que se trata de um fenômeno relativamente comum, uma vez que estes dois vírus compartilham vias semelhantes de transmissão.

Com a evolução dos métodos diagnósticos, principalmente das análises de biologia molecular, houve a necessidade da revisão dos conceitos de persistência viral e mesmo das definições de hepatite B crônica, resolvida ou progressiva e oculta. Conseqüentemente, há uma demanda por estudos que avaliem a real influência deste vírus, principalmente de formas menos evidentes de infecção, no curso evolutivo da hepatopatia produzida pelo VHC.

1. O vírus da hepatite C

1.1. Histórico

Epidemias de doença icterica sempre foram descritas, especialmente em períodos com condições adversas, como nas guerras. Da mesma forma, relatos provenientes de clínicas de saúde onde pacientes se adoeceram após o uso de medicação injetável sugeriram a existência de duas origens distintas para a doença hepática. A partir da década de 1950, estudos realizados em voluntários demonstraram que uma forma de hepatite era transmitida pelo soro outra pelas fezes. Em 1960, Krugman et al., em Nova Iorque, estratificaram as hepatites de acordo com o período de incubação, a atividade enzimática e pelo grau de infectividade em duas formas distintas: MS1, conhecida como hepatite infecciosa – atualmente hepatite A e MS2, denominada hepatite sérica, que posteriormente foi classificada como hepatite B⁽¹²⁾.

Contudo, a identificação da origem etiológica não conseguiu esclarecer um ponto crucial: a maioria das formas transmitidas pela via transfusional não estava relacionada a estes agentes⁽¹³⁾. As taxas de infecção pós transfusional de causa indefinida chegavam a 75%. Desse modo, essas formas indeterminadas foram classificadas como hepatite não-A não-B (NANBH), após a realização de estudos experimentais em chimpanzés, que permitiram comprovar a via sanguínea de transmissão⁽¹²⁾.

As características biológicas e estruturais desse novo agente começaram ser elucidadas no final da década de 1980, quando o vírus NANBH foi finalmente

seqüenciado por Houghton e colaboradores em 1989, pela empresa Chiron Corporation (*Emeryville, Califórnia*) e por Bradley e colaboradores, no Centro de Controle e Prevenção de Doenças norte americano (*CDC*)^(14,15). Estes pesquisadores conseguiram clonar o vírus e, a partir daí, desenvolver imunoenaios capazes de detectar anticorpos dirigidos contra seus produtos protéicos. Assim, foi possível demonstrar que 70% a 90% dos casos de hepatite NANBH decorriam da ação deste novo agente identificado, agora denominado vírus C^(1,12).

1.2. Epidemiologia da infecção pelo vírus C

A prevalência global estimada da infecção pelo VHC é de 2,2% a 3%. Este valor corresponde à cerca de 130 a 170 milhões de indivíduos em todo o mundo, com aproximadamente 127 milhões de portadores crônicos. São descritos anualmente 3 a 4 milhões de novos casos desta infecção^(1,16-18).

A dinâmica da infecção pelo VHC é influenciada por diferenças geográficas e temporais⁽⁵⁾. A maior parte da África, América, Europa e Sudeste Asiático é caracterizada por prevalências menores que 2,5%. Os países banhados pelo Oceano Pacífico exibem prevalências em torno de 2,5 a 4,9%⁽¹⁶⁾. São consideradas áreas de alta prevalência (acima de 5%) o Extremo Oriente, Mediterrâneo, África Subsaariana e Europa Oriental^(7,19).

A América Latina contribui para as estatísticas globais com cerca de 10 milhões de infectados. Os dados provenientes desta região são extremamente heterogêneos, devido as grandes diferenças encontradas de um país para outro ou dentro de uma mesma região. O VHC não parece ser autóctone nas Américas. Sua

prevalência entre indígenas é baixa, estando entre 0 e 1%, segundo levantamentos realizados em comunidades distribuídas pela Planície Amazônica⁽¹⁷⁾.

Em relação ao Brasil, a real dimensão epidemiológica da infecção ainda não é totalmente conhecida. Entre 1994 e 2005, foram notificados 52.489 casos de hepatite pelo VHC, sendo 50% destes diagnosticados na região sudeste⁽²⁰⁾.

A maioria das informações sobre prevalência foi obtida através da realização de inquéritos soropidemiológicos em banco de sangue. Por isso, os resultados descritos sofrem influência desta amostragem e não necessariamente refletem a situação epidemiológica da população. Dados da região Nordeste revelam prevalência do anti-VHC em torno de 1,09 a 2,29. Na região Centro-Oeste a prevalência total é de 1,22% a 2,61%, sendo no Distrito Federal de 0,8% a 1,4%. Na região Norte, um estudo sugeriu prevalência de 0,55%^(20,21). Na região Sul, Rosini et al.⁽²²⁾ identificaram uma prevalência de 0,34% em 88.241 doadores de sangue. Na cidade de São Paulo, um estudo soropidemiológico populacional envolvendo 1.059 indivíduos demonstrou prevalência estimada de 1,42% (IC 95% 0,70-2,12) para marcadores de hepatite C⁽²³⁾.

A globalização e particularmente os fluxos migratórios estão modificando radicalmente o perfil epidemiológico mundial. Imigrantes provenientes de áreas endêmicas têm influenciado a incidência e prevalência dos países de destino. É necessário ainda considerar aspectos econômicos, sociais, culturais e ambientais, que sabidamente são capazes de afetar diretamente não só as taxas locais, como também o diagnóstico, tratamento e estratégias de prevenção⁽¹⁷⁾.

Os estudos relacionados à prevalência por faixa etária são limitados. Contudo, a grande maioria consegue distinguir três perfis de transmissão, que refletem as

variações regionais associadas aos períodos de maior risco para a aquisição do VHC⁽⁵⁾.

No primeiro padrão, a prevalência é baixa dentre indivíduos menores que 20 anos, aumenta consideravelmente na meia idade (30-49 anos) e declina em maiores de 50 anos. É descrito na Austrália e nos Estados Unidos, onde dois terços de todos os casos notificados são constituídos por indivíduos de 30 a 49 anos, sugerindo que a maioria dessas transmissões ocorreu num passado relativamente recente (10-30 anos)⁽⁵⁾.

No segundo padrão, a prevalência é baixa em crianças e adultos jovens e aumenta consideravelmente entre indivíduos mais velhos, acima de 50 anos, população na qual se encontra a maioria dos casos. Este é o padrão da Turquia, Espanha, Itália, Japão e China, sendo compatível com um maior risco de infecção em um passado remoto - há 30 ou 50 anos^(5,7).

No terceiro padrão, a frequência de infectados é alta em todos os grupos etários, aumentando progressivamente de acordo com o tempo de vida. O Egito, sendo o país de maior prevalência para o VHC (17% a 26%), exemplifica bem este fenômeno, que se associa a um maior risco de infecção num passado distante, em conjunto com a persistência atual de alto risco para a aquisição viral^(5,7).

Devido ao fato da doença hepática se desenvolver muitos anos após a infecção, o contingente de indivíduos que desenvolvem complicações relacionadas ao VHC reflete a magnitude de incidência da infecção no passado⁽⁷⁾. Desta forma, os portadores crônicos representam um reservatório suficiente para a manutenção da circulação do VHC, embora a incidência de contágio a partir de sangue e

hemoderivados tenha se reduzido substancialmente com a melhoria dos testes imunodiagnósticos e a adoção de medidas universais de precaução^(1,5).

1.3. Vias de transmissão

A infecção pelo VHC é mais freqüente em populações de maior risco, embora não seja possível a identificação de fatores predisponentes em cerca de 40% dos indivíduos infectados^(1,19).

No estado de São Paulo, o levantamento de 17.208 casos notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica, entre 1998 e 2006, revelou o seguinte perfil quanto aos padrões de transmissão: 16% dos indivíduos apresentavam histórico de transfusão de sangue ou hemoderivados, 21% relatavam uso de droga intravenosa, 10% por provável via sexual, 4% por tratamento cirúrgico / dentário, 0,7% por acidente perfuro cortante, 0,5% por contato intradomiciliar com indivíduo infectado e 0,37% por via vertical⁽²¹⁾.

1.3.1. Uso de droga ilícita intravenosa

O uso de droga intravenosa associada ao compartilhamento do material de uso parenteral é uma das vias mais eficientes para a transmissão do VHC^(16,24,25). Nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, este foi considerado o meio de maior relevância nos últimos 30 anos, sendo responsável por 60% a 80% dos casos de infecção. De fato, após cinco anos de uso, cerca de 50% a 90% dos indivíduos drogaditos tornam-se infectados, tendo como fator agravante as características comportamentais próprias

deste grupo, que facilitam ainda mais a exposição a este e a outros agentes, essencialmente de origem sanguínea e sexual⁽⁵⁾.

O contágio através do uso de cocaína intranasal ainda necessita ser melhor esclarecido. Embora seja possível a transmissão pela mucosa escoriada através do compartilhamento de canudos contaminados, apenas um estudo conseguiu correlacionar a infecção pelo VHC de maneira independente ao uso concomitante de droga intravenosa⁽²⁶⁾.

1.3.2. Transfusão e transplante

A transfusão de sangue ou hemoderivados e transplante de órgãos sólidos provenientes de indivíduos portadores de infecção pelo VHC são vias altamente efetivas de transmissão⁽⁶⁾. Os procedimentos realizados antes de 1992 foram significativamente associados com a infecção pelo VHC⁽²⁷⁾. De fato, a incidência de hepatite transfusional, que era de 5% a 13% antes de 1986, foi reduzida para 1,5% a 9% em 1990 e posteriormente para 0,6% a 3% após a introdução dos testes imunossorológicos na rotina dos bancos de sangue⁽⁵⁾.

1.3.3. Procedimentos relacionados aos cuidados com saúde

O uso apropriado de material descartável e de procedimentos efetivos de desinfecção e esterilização minimizaram substancialmente a transmissão de patógenos de origem sanguínea, incluindo o VHC⁽⁵⁾. Atualmente, esta modalidade de transmissão tem sido pouco relatada, exceto em pacientes renais crônicos submetidos

à hemodiálise, onde algumas casuísticas revelam que pelo menos 20% dos mesmos evoluem com infecção pelo VHC⁽⁴⁾.

Quanto aos indivíduos trabalhadores da área de saúde expostos a sangue ou secreções, embora a ocorrência de infecção seja infreqüente, é possível que o número de casos não diagnosticados seja relevante, dada a característica assintomática da infecção^(1,5). A maioria dos relatos associa-se a acidente perfuro-cortante, com taxas de soroconversão que variam de 0 a 7% (média de 1,8%)⁽¹⁾. A transmissão através da conjuntiva foi relatada, mas a infecção através do contato de pele íntegra com sangue ou secreção contaminados ainda não foi descrita⁽⁵⁾.

1.3.4. Transmissão perinatal

Os estudos atualmente disponíveis sugerem baixa eficácia da transmissão vertical no que diz respeito à infecção pelo VHC⁽¹⁶⁾. Esta via tem sido descrita quase que exclusivamente em mães virêmicas no momento do parto. O risco médio de transmissão gira em torno de 6% (0 a 42%), sendo maior em mulheres co-infectadas pelo HIV (média de 17%), situação esta relacionada com a alta carga viral do VHC^(1,5). Em relação ao tipo de parto ou segurança do aleitamento materno, existem poucos dados disponíveis na literatura, de forma que a indicação da via de parto segue as condições obstétricas habituais. O aleitamento materno não é contra-indicado, salvo a presença de lesões sangrantes em mamilos⁽²¹⁾.

1.3.5. Transmissão sexual

A importância da atividade sexual na transmissão do VHC é tema controverso. Essa associação foi avaliada em estudos com diferentes desenhos epidemiológicos envolvendo grupos heterogêneos, como portadores de infecção aguda ou crônica, heterossexuais, homossexuais, portadores de doenças sexualmente transmissíveis e profissionais do sexo. Desta forma, observou-se que a transmissão sexual era pouco freqüente e que se relacionava com as seguintes características: idade precoce de início da atividade sexual, grande número de parceiros, histórico de doença sexualmente transmissível, práticas sexuais desprotegidas e de risco (trauma de mucosas)^(5,16).

Assim, existem formas de transmissão consideradas mais eficientes do que a via sexual. Esta acaba sendo responsável pela infecção em uma pequena proporção de casos, principalmente em indivíduos expostos a situações de risco⁽⁵⁾.

1.3.6. Outros fatores de risco

Existe uma variedade de formas de exposição percutânea que, ao menos teoricamente, permitem a transmissão do VHC. A reutilização de materiais contaminados em serviços cosméticos, de higiene e de saúde, bem como tatuagem, acupuntura, piercing, lâminas de barbear, escovas dentárias, tesouras e alicates de unha guardam potencial de transmissão de patógenos derivados do sangue^(1,25). Todavia, a ausência de grandes estudos não permite generalizar os relatos isolados

encontrados na literatura vigente, embora a conexão causal entre a exposição e infecção seja biologicamente plausível⁽⁵⁾.

O contato intradomiciliar íntimo e não sexual tem sido responsabilizado por uma grande parcela de transmissões onde não foi possível identificar um fator de risco em especial⁽²⁵⁾. Na maioria dos casos, a transmissão envolve vias percutâneas menos evidentes. De fato, na Europa Ocidental e América do Norte, a prevalência de infecção pelo VHC entre em contatos intradomiciliares não sexuais foi de 0,7%, enquanto que estudos realizados no sul da Europa e Ásia demonstraram uma taxa de 4%, espelhando a possível influência da endemicidade local nesta modalidade de infecção⁽⁵⁾.

1.4. Virologia

O VHC faz parte da família *Flaviviridae*, sendo o único membro do gênero *Hepacivirus*^(8,28). Esta família inclui ainda dois outros gêneros: *Flavivirus*, à qual pertencem os vírus da Febre Amarela e do Dengue; *Pestivirus* e o vírus ainda não classificado GBV-B⁽¹⁵⁾. É um vírus envelopado, tendo seu genoma constituído por uma única fita de RNA com polaridade positiva, contendo aproximadamente 9.600 nucleotídeos^(15,29,30). Tem o homem como seu único hospedeiro natural⁽⁸⁾.

Seu genoma consiste em regiões não codificadoras 5' e 3', que delimitam uma única fase de leitura ou ORF^(8,15). A extremidade 5' (5'-UTR) possui 341 nucleotídeos e é extremamente conservada, interagindo com múltiplos fatores intracelulares. Tem função na mediação do início da tradução da fase de leitura viral⁽¹⁵⁾. A extremidade 3' (3'-UTR) é subdivida em três regiões, sendo uma variável

e outra altamente conservada – cauda 3'X – tendo importante papel na replicação viral e na interação com proteínas celulares e virais^(15,29).

A fase de leitura codifica uma poliproteína de 3.010 a 3.033 aminoácidos, que é submetida a um processo de clivagem formando dez proteínas menores, classificadas de acordo com a sua função estrutural (core e proteínas do envelope) ou não estrutural (proteínas NS2 a NS5). Estas últimas exercem atividades enzimáticas fundamentais para a replicação viral⁽²⁸⁾.

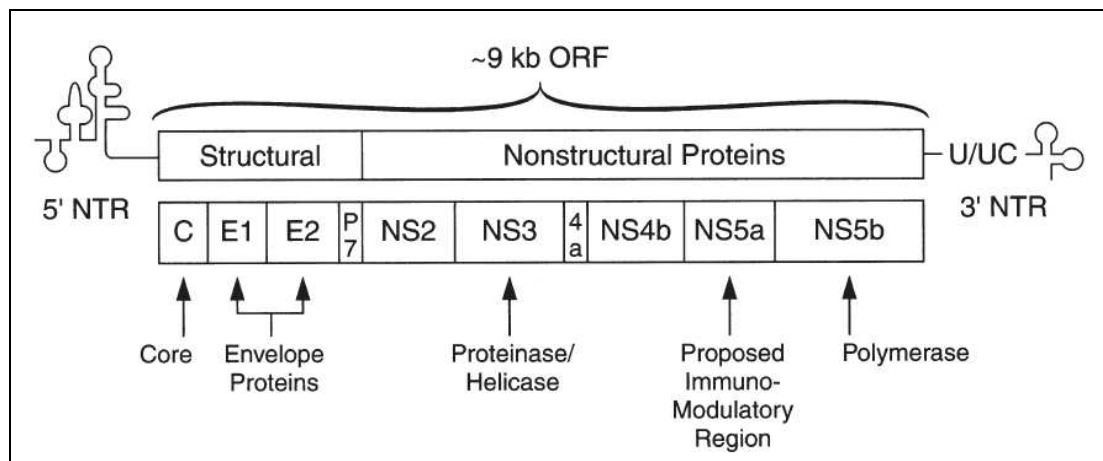


Figura 1 – Mapa genômico do VHC
 FONTE: Branch, 2000⁽²⁹⁾

A primeira proteína estrutural é a do core, que constitui o nucleocapsídeo viral. Ela é altamente conservada e se localiza no espaço citoplasmático (membrana externa) do retículo endoplasmático, embora algumas formas truncadas tenham sido descritas no núcleo⁽¹⁵⁾. Apresenta um domínio hidrofílico na porção N-terminal e um domínio hidrofóbico na porção C-terminal, que se associa com lipídeos da membrana para a sua estabilização⁽³⁰⁾. Esta proteína é multifuncional. Atua, por exemplo, nas

vias de sinalização intracelular, sendo capaz de modificar o metabolismo lipídico e ativar genes promotores de crescimento e indutores de apoptose^(15,29).

As glicoproteínas E1 (gp35) e E2 (gp70) são constituintes do envelope, estando expostas em sua superfície⁽²⁸⁾. A E2 tem importante papel no tropismo celular, atuando na mediação entre a união do vírus com a célula hospedeira, embora o receptor específico para o VHC ainda não tenha sido identificado^(8,28). Entre os possíveis candidatos destacam-se a molécula CD81, que promove a união vírus-célula hospedeira e não a entrada do agente; o receptor de LDL (LDL R), uma vez que as partículas virais, em uma grande parcela, circulam associadas a lipídeos e lipoproteínas; proteoglicanos de heparan sulfato e moléculas intracelulares de adesão hepato específicas (L-SIGN)^(8,31). A expressão da E1 e E2 na superfície extracelular é limitada, sendo um dos possíveis mecanismos de escape viral ao ataque celular imunomediado⁽¹⁵⁾. A E1 interage com a E2, com a NS2 e com o core, que por sua vez liga-se ao RNA viral, promovendo a conjugação do envelope com o nucleocapsídeo⁽²⁹⁾. Ainda, a E2 parece modular a resposta a ação do interferon- α ⁽²⁸⁾. Uma pequena proteína de função desconhecida, denominada p7, está localizada na extremidade 5'⁽¹⁵⁾.

As proteínas não estruturais NS2 e NS3 são as proteases responsáveis pela clivagem da poliproteína. A NS3 apresenta atividade de helicase e NTPase, exercendo papel na replicação do RNA. Parece induzir transformação celular e oncogênese em culturas celulares⁽¹⁵⁾. A NS4A é um cofator da NS3, formando heterodímeros que fazem com que a clivagem molecular em trans seja mais eficiente⁽²⁹⁾. A NS4B provavelmente facilita a ancoragem de todo complexo replicativo à membrana do retículo endoplasmático, formando uma verdadeira teia

perinuclear⁽³⁰⁾. A NS5A parece interferir com a resposta terapêutica ao interferon, através da ação da região ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region*), localizada próxima à extremidade carboxila desta proteína, além de ser sítio para muitas mutações adaptativas que facilitam a replicação viral (*fitness*). Apresenta potencial oncogênico e inibidor de apoptose⁽¹⁸⁾. A NS5B tem ação de replicase (RNA polimerase dependente de RNA)⁽¹⁵⁾.

O VHC é extremamente heterogêneo quanto ao genoma, pois sua polimerase não é capaz de reproduzir seu RNA de forma idêntica à fonte precursora⁽²⁸⁾.

1.4.1 Heterogenicidade genética e quasiespécies

A polimerase (NS5B) não possui mecanismo de correção, o que associado a sua alta taxa de replicação (10^{12} partículas virais ao dia) resulta em uma grande frequência de mutações (10^{-5} erros por nucleotídeo por sítio genômico por ano)⁽¹⁵⁾. Esta diversidade genética, por sua vez, é responsável em parte pela persistência da infecção^(15,28). O vírus tem sido rotulado em três níveis hierárquicos quanto a sua heterogenicidade: genótipos, subgenótipos ou subtipos e quasiespécies⁽³²⁾.

O VHC é classificado em pelo menos seis diferentes genótipos, identificados por números e em 52 subtipos, caracterizados em letras minúsculas, sendo os principais: 1 (a, b, c), 2 (a, b, c), 3 (a, b), 4a, 5a, 6a^(8,33). Esses genótipos diferem entre si por pelo menos 30% de sua seqüência genômica, enquanto que diferentes subtipos dentro de um genótipo podem variar em mais de 20%. Dentro de um subtipo, não há mais que 10% de seqüências variantes⁽³³⁾.

Um indivíduo infectado pelo VHC costuma apresentar seqüências nucleotídicas distintas do mesmo vírus, embora correlacionadas geneticamente, constituindo um *pool* de variantes que acumulam vantagens quanto à capacidade adaptativa, tropismo, virulência e escape à resposta imune. Estas variantes foram denominadas quasiespécies e se desenvolvem em um curto período de tempo, sendo sua frequência diretamente proporcional ao grau de pressão imunológica exercida pelo hospedeiro^(15,32).

A principal região de mutações é constituída por 34 aminoácidos e está localizada na porção N-terminal da proteína E2 do envelope, sendo denominada região hipervariável 1 ou HVR1⁽¹⁵⁾. Ainda, esta porção do VHC é considerada um epítipo dominante, de modo que sua variação acaba comprometendo tanto a resposta imune humoral quanto celular. Inclusive, este fenômeno seria uma das principais explicações para a dificuldade no desenvolvimento da vacinas contra o vírus⁽²⁸⁾. Outra região variante de menor importância – HVR2 – localiza-se próxima a proteína E2⁽¹⁵⁾.

A distribuição global dos genótipos do VHC varia consideravelmente, embora seu papel como marcador epidemiológico necessite ser melhor esclarecido⁽¹⁷⁾. Os genótipos 1, 2 e 3 são encontrados em praticamente todo o mundo. Os genótipos 4 e 5 são descritos principalmente na África e o tipo 6 na Ásia^(15,16).

Na América Latina, o genótipo 1 é mais prevalente no Caribe, na América Central e do Sul. O Brasil, por ser um país de dimensões continentais e ter população de origens étnicas distintas, apresenta uma grande variação genotípica^(9,17). Análises de 1.688 amostras de pacientes portadores de infecção pelo VHC, provenientes da maioria dos estados brasileiros, revelou uma prevalência de 64,9% para genótipo 1, 4,6% para genótipo 2, 30,2% para genótipo 3, 0,2% para genótipo 4 e 0,1% para

genótipo 5. O genótipo 1 foi o mais freqüente em todas as regiões, enquanto o genótipo 2 foi mais prevalente na região Centro-Oeste e o tipo 3 mais comum no Sul, de forma quase tão freqüente quanto o genótipo 1⁽⁹⁾. Como esta distribuição é muito semelhante àquela descrita em certas regiões da Europa, acredita-se que o VHC tenha sido introduzido no país em parte pelos imigrantes europeus e disseminada posteriormente para a população geral⁽⁹⁾.

1.4.2. Ciclo celular

O VHC une-se ao receptor específico na membrana da célula hospedeira. Desta forma, seu envelope difunde-se nos lipídeos constituintes da membrana, possibilitando a liberação do nucleocapsídeo⁽¹⁵⁾. Ao contrário do VHB, o genoma do VHC não penetra no núcleo das células infectadas e atua diretamente como um RNA mensageiro, após ser liberado pela degradação do core^(15,30). A tradução proteica é mediada pela interação do RNA viral com a subunidade 40S ribossomal no seu sítio interno de entrada (IRES). Esta estrutura engloba a região 5' UTR e os primeiros 30-40 nucleotídeos da região codificadora do core⁽⁸⁾. A poliproteína viral é então processada por proteases virais e celulares nas proteínas estruturais e não estruturais⁽²⁹⁾. Após a síntese e maturação, o RNA viral em conjunto com as proteínas não estruturais formam complexos de replicação associado à membrana do retículo endoplasmático, que se expressam como teias membranosas perinucleares. Estes complexos catalizam a transcrição do RNA viral primeiramente em uma fita intermediária antígenômica, de polaridade negativa, que posteriormente dará origem a fita positiva, via ação enzimática das proteínas não estruturais. Esta então é

encapsidada no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, compondo o nucleocapsídeo^(29,30). A liberação dos virions ocorre provavelmente por via secretória ou pela lise celular^(15,30).

O VHC não parece ter tropismo somente por hepatócitos⁽³⁴⁾. Através da observação, realizada por Araya et al.⁽³⁵⁾, de que fígados transplantados em pacientes portadores do VHC se tornavam rapidamente reinfetados, aventou-se a hipótese da presença viral em sítios extra-hepáticos. Assim, alguns estudos sugeriram outros potenciais reservatórios virais, onde o mesmo manteria inclusive a sua atividade replicativa, citando: células linfomononucleares de sangue periférico, linfonodos, pâncreas, medula óssea, tireóide, adrenais e baço⁽³⁴⁾.

1.5. Imunopatogênese

O VHC não é citopático e não promove lesão hepática de forma direta, uma vez que lesões histológicas secundárias a atividade viral não são identificadas rotineiramente em análises histológicas⁽³⁶⁾. A relação entre a carga viral e a gravidade / prognóstico da doença hepática ainda não foi totalmente comprovada⁽⁸⁾. Considera-se que os mecanismos responsáveis pela injúria tecidual na infecção pelo VHC sejam essencialmente dependentes da resposta imune celular contra o vírus^(15,30).

É necessário que o hospedeiro seja capaz de desencadear uma resposta imune efetiva, vigorosa e sustentada contra o VHC para o controle da infecção. Para isso, há uma demanda do trabalho coordenado pelos diferentes braços do sistema imune⁽³⁷⁾. Uma vez que o vírus sobrevive ao ataque imunomediado, ele lança mão de diversos

mecanismos capazes de ludibriar a vigilância imunológica, principalmente durante as fases mais tardias da infecção⁽³⁸⁾.

Primeiro, o vírus altera seus epítomos que foram reconhecidos inicialmente pelas células T e por anticorpos neutralizantes. Em seguida, o VHC subverte as funções imunológicas de maneira altamente específica, desde a resposta inata até adaptativa^(15,38).

Após a infecção dos hepatócitos, o VHC inicia seu mecanismo de replicação, liberando continuamente partículas virais na circulação – cada uma com uma meia vida de 3 horas⁽³⁰⁾. As células NK e NKT, presentes em maior quantidade no tecido hepático do que em sangue periférico, constituem a primeira linha de defesa. São células que não expressam receptores antígeno-específicos em sua superfície⁽³⁹⁾. Contudo, apresentam receptores que reconhecem a ausência anormal de MHC (complexo de histocompatibilidade) na superfície de células infectadas, promovendo lise destes elementos por exocitose granular decorrente de apoptose⁽⁴⁰⁾. Também são ativadas pela ação de citocinas como INF- α , IL-12, IL-15, IL-2 e pelos produtos derivados da transcrição de genes induzidos pelo interferon. Células NK e NKT ativadas secretam INF- γ , que inibe a replicação viral pela via não citolítica, embora as células NKT apresentem também habilidade de promover lise celular direta^(36,39).

As Células dendríticas (DCs) e os macrófagos residentes (células de Kupffer) são ativados por citocinas e por receptores específicos distintos (*Toll-like receptors*). Estas têm como função o processamento de antígenos virais. Assim, migram para os tecidos linfóides locais, onde os apresentam para outros elementos efetores – células T e B – via moléculas de MHC classe II⁽³⁷⁾. Ainda secretam IL-12, TNF- α , INF- α e IL-10, capazes de regular as ações de outras células adjacentes^(15,38).

As células dendríticas podem ser agrupadas em dois subgrupos: células mielóides (MDC) e plamocitóides (PDC). As MDC produzem predominantemente IL-12 ou TNF- α após um estímulo pró-inflamatório, enquanto as PDC sintetizam principalmente INF- α ⁽³⁸⁾. Desta forma, a polarização da resposta T Helper em Th1, citotóxica, com secreção de IL-2, INF- γ e TNF- α ou Th2, humoral, com produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 parece ser intimamente influenciada pela atuação destas células. A ativação e migração de linfócitos T citotóxicos, sob a supervisão e ação potencializadora de linfócitos T CD4+ antígeno-específicos constitui elemento crucial para a erradicação de células infectadas pelo VHC^(15,37).

Existem três diferentes mecanismos através dos quais ocorre o clareamento hepático do VHC: remoção de partículas virais circulantes pela ação de anticorpos específicos – mecanismo pouco eficaz; ativação de células linfomonucleares (Linfócitos T citotóxicos ou CTLs e células NKs) com indução de apoptose – mecanismo citolítico e supressão da replicação viral pela ação do INF- γ – mecanismo não citolítico^(40,41).

O mecanismo citolítico envolve diversos sistemas efetores como o CD95 / Fas ligante (Fas-FasL, capaz de ativar a via das caspases), perforina, granzima e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL)⁽⁴⁰⁾.

O VHC infecta uma pequena proporção de hepatócitos, aproximadamente 1-10% de todo o tecido. Porém, Bantel et al.⁽⁴²⁾ relataram que 7-20% dessas células demonstraram ativação da caspase-3, típico de elementos em apoptose. Assim, o processo de morte celular é capaz de atingir células saudáveis, ampliando ainda mais a área de dano histológico.

1.6. Infecção aguda pelo vírus C

1.6.1. Imunidade inata

Durante as fases iniciais da infecção primária, os níveis de VHC-RNA elevam-se rapidamente, se mantendo em um alto patamar durante o período de incubação, apesar da expressão celular de INF do tipo I (α e β) e dos genes induzidos pelo mesmo (ex: 2', 5' oligoadenilsintetase)⁽¹⁵⁾. Desta forma, parece haver um mecanismo de interferência das proteínas virais na execução das vias de sinalização celular, suprimindo o clareamento viral possivelmente através da interação com o fator regulador de interferon (IRF-3), NF- κ B e proteína quinase dependente de RNA (PKR)^(36,38).

As células dendríticas modelam a imunidade inata através da interação com as células NK, através da produção de citocinas (IL-12, IL-18 ou INF- α) e pela expressão de ligantes – cadeias relacionadas ao MHC classe I – capazes de se unir especificamente e promover a ativação destas células^(15,39). Por outro lado, o comprometimento das células DC impede a ação das células NK, permitindo que o VHC se replique efetivamente, apesar do alto nível de expressão do INF- α no fígado⁽³⁹⁾. Paralelamente, estas células conseguem suprimir a ação das DCs através da secreção de citocinas com IL-10 e TGF- β 1. Este mecanismo, em parte, explica a alta taxa de persistência viral que segue a infecção aguda pelo VHC⁽³⁸⁾.

1.6.2 Imunidade adaptativa

O processo da imunidade inata é progressivamente auxiliado pela atividade de células T específicas. Inicialmente, os hepatócitos infectados produzem INF- α e β em resposta a presença do material genético viral, induzindo a produção de CCL3 (MIP1- α) pelos macrófagos residentes (células de Kupffer). A CCL3 estimula a síntese e liberação de INF- γ pelas células NK, que tem capacidade de estimular o endotélio sinusoidal e os hepatócitos a produzir CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10). Estas quimiocinas atraem linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados para o ambiente hepático⁽³⁸⁾. Os linfócitos T CD8+ são fundamentais como células efetoras, enquanto os linfócitos T CD4+ auxiliam a manutenção e a pronta resposta do CD8+ frente às constantes mutações de escape produzidas pelo VHC⁽⁴²⁾. A resposta vigorosa, multi-específica, sustentada e principalmente do tipo Th1 relaciona-se com a resolução da infecção, contrastando com a resposta fraca, fugaz e pouco específica típica da infecção persistente⁽³⁰⁾. Embora haja na infecção crônica um grande número de CTLs infiltradas no parênquima hepático, as mesmas apresentam-se inativas, incapazes de produzir quantidades suficientes de INF- γ e de se proliferarem mediante a presença de antígenos virais⁽³⁸⁾.

Imunoglobulinas contra o VHC são detectadas no soro logo após o aparecimento da resposta imune celular. Primeiramente, são sintetizados os anticorpos específicos contra a proteína NS3 e o core, seguidos então pelo aparecimento de anticorpos contra o NS4 e E1 e E2⁽³⁶⁾. Porém, sua produção e a durabilidade são menores do que a atividade da resposta celular. A análise longitudinal de indivíduos que resolveram a infecção pelo VHC demonstrou que os

títulos de anticorpos diminuem dentro de 10 a 20 anos, enquanto a resposta T CD4+ e CD8+ específica se mantém por décadas após a primoinfecção⁽⁴³⁾.

Quanto à imunidade contra reinfeção, estudos realizados em modelos animais e inquéritos epidemiológicos baseados em grupos populacionais de risco (usuários de drogas injetáveis, indivíduos politransfundidos) sugerem que não existe bloqueio imunológico protetor, embora o risco de viremia seja menor em usuários de droga que resolveram a infecção e que se reinfectaram do que naqueles sem evidência de contato anterior^(44,45).

1.7. Infecção crônica pelo vírus C

Na hepatite C crônica, as células T CD4+ específicas estão funcionalmente comprometidas e sem atividade sustentada, enquanto células T CD8+ possuem menor capacidade de proliferação e produzem menor quantidade de INF- γ em resposta aos antígenos virais⁽³⁸⁾. Neste momento, a resposta imune costuma ser restrita e compartimentalizada ao tecido hepático⁽³⁶⁾. Como estas células se correlacionam com a atividade inflamatória hepática, sua ação ineficiente associa-se frequentemente a um dano histológico de pequena monta e insuficiente para a erradicação viral⁽¹⁵⁾.

Como visto anteriormente, o VHC é caracterizado por sua heterogenicidade (quasiespécies). Na maioria dos casos, as mutações acometem a região HVR1 e outros epítomos de CTLs – como variantes do NS3 – comumente dentro de um ano após a infecção aguda, promovendo uma atenuação da resposta T citotóxica específica^(46,47). Isto resulta em uma diminuição da afinidade e/ou do reconhecimento destes peptídeos mutantes pelos receptores de células T (TCRs) e no

comprometimento do processamento antigênico por proteossomos, necessário para a exposição dos epítomos⁽⁴⁸⁾.

A resposta T CD4+ costuma ser breve, fraca, não sustentada e mesmo exaurida na persistência viral. Resulta provavelmente da apresentação de antígenos de maneira inefetiva pelas células dendríticas ou da deleção de células T específicas⁽³⁸⁾. De fato, DCs derivadas de indivíduos infectados apresentam comprometimento da sua habilidade de estimular células T CD4+ alogênicas, sendo que esta disfunção se reverte uma vez que o VHC é erradicado, evidenciando a influência viral na atividade destas células⁽⁴⁹⁾. O dano direto das DCs pelo VHC é um mecanismo plausível de inativação, uma vez que o genoma viral tem sido isolado destas células⁽¹⁵⁾.

As proteínas do VHC estão implicadas no mecanismo de subversão funcional de células T, NK e DCs. No geral, os eventos desencadeados pelos produtos virais têm objetivos não apoptóticos, no intuito de assegurar a progressão viral⁽⁴⁰⁾. De fato, a interação da proteína do core no receptor C1q das células T suprime a proliferação celular e a produção de IL-2. A proteína E2 tem alta afinidade pela molécula de superfície CD81, além de inibir a ativação direta de células NK. A presença das proteínas do core e E1 nas DCs reduzem sua capacidade de estimular células T. A NS3 e NS4 influenciam monócitos e sua produção de citocinas necessárias para sua evolução para DCs e bloqueiam a fosforilação do IRF-3, resultando na redução da transcrição de genes induzidos pelo interferon^(36,38). A proteína E2 apresenta alto grau de homologia com sítios de autofosforilação da via do PKR e da eIF2 α , inibindo sua ativação e permitindo conseqüentemente a síntese protéica viral. A NS5A também interage nesta mesma via, induzindo a produção de IL-8, que resulta na resistência ao

interferon exógeno e endógeno⁽³⁶⁾. A alta replicação viral parece produzir exaustão de células T CD4+ específicas⁽⁵⁰⁾.

Na infecção crônica pelo VHC, as células T CD8+ apresentam defeitos na sua maturação fenotípica. A diferenciação de células T CD8+ de memória (CCR7+) para sua função efetora (CCR7-) é impedida pela supressão da secreção de IL-2, mediada em parte pela proteína core do VHC⁽³⁸⁾. Por outro lado, células T CD8+ maduras (CD27- e CD28-) apresentam maior potencial citotóxico, produzindo grandes quantidades de INF- γ ⁽⁵¹⁾. A presença de células regulatórias (Tregs) parece contribuir para a persistência viral, uma vez que estas impedem a ação de células T CD8+ específicas através da secreção de IL-10⁽⁵²⁾.

1.8. Diagnóstico

Os primeiros testes sorológicos para a detecção do VHC começaram a ser desenvolvidos tão logo se deu o sequenciamento viral, em 1989⁽⁵³⁾. Foi rapidamente adotado na triagem de hemoderivados, levando a um importante declínio no número de casos de hepatite transfusional⁽¹²⁾.

Posteriormente, com o advento das técnicas de biologia molecular, surgiram ensaios mais acurados, baseados na Reação pela Cadeia de Polimerase (PCR). No início, havia grande discrepância em relação aos resultados obtidos, muito devido a divergência de sensibilidade e especificidade destes testes, secundária a falta de uniformização entre os laboratórios⁽²⁷⁾. Todavia, o advento da padronização em unidades internacionais, associada à aprovação dos testes de detecção viral direta pelo

FDA americano, resultou em uma melhora da confiabilidade e reprodutibilidade dos ensaios para a mensuração do VHC⁽²⁷⁾.

Os métodos sorológicos são considerados testes de rastreamento e possibilitam a detecção indireta do vírus através da mensuração de anticorpos circulantes produzidos pelo hospedeiro ou de antígenos produzidos pelo agente infeccioso e que são lançados ao soro^(21,54).

O ensaio imunoenzimático (EIA / ELISA) foi o primeiro teste desenvolvido para o VHC. O EIA de primeira geração era capaz de detectar anticorpos contra uma região da proteína não estrutural 4 (NS4). Apresentava limitada sensibilidade e especificidade, com um período de janela imune de cerca de 16 semanas após a exposição. A partir daí, foram realizadas modificações como a reconfiguração de certos antígenos e a associação de proteínas provenientes do core e de regiões não estruturais⁽²⁷⁾. Os teste imunoenzimáticos atuais são considerados de terceira e quarta geração, pois detectam anticorpos contra 4 sítios distintos do VHC, incluindo a região NS5⁽²¹⁾. Apresentam alta sensibilidade e especificidade, com redução do tempo médio de soroconversão para cerca de 7 a 8 semanas após a infecção aguda^(27,54).

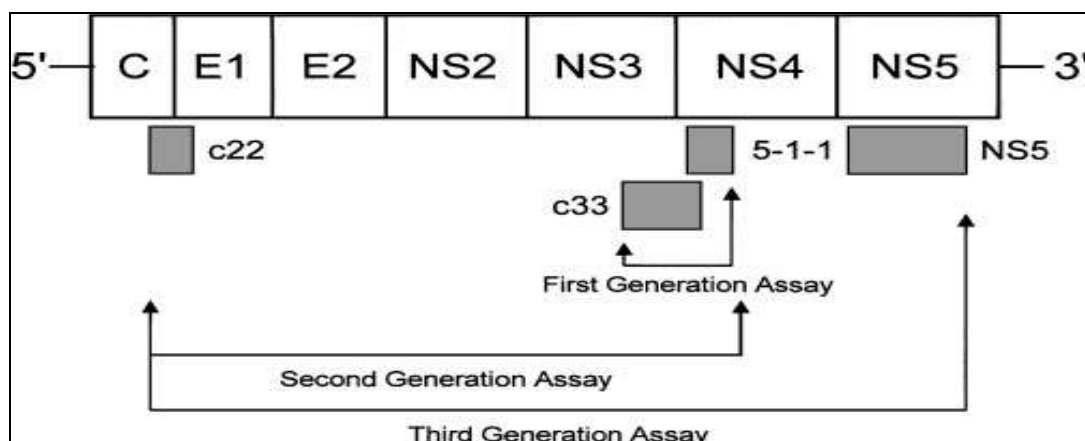


Figura 2 – Antígenos e anticorpos detectáveis pelos testes imunoenzimáticos
 FONTE: Branch, 2000⁽²⁷⁾

O resultado sorológico falso-positivo pode decorrer de interações não específicas entre imunoglobulinas séricas e antígenos virais utilizados nos ensaios. Constitui evento raro, sendo mais freqüente em populações com prevalência de infecção menor que 10% e em portadores de doenças autoimunes com autoanticorpos circulantes^(21,27). Resultados falso-negativos também podem ocorrer, de maneira praticamente restrita, em pacientes imunocomprometidos incapazes de produzir quantidades detectáveis de anticorpos contra o VHC⁽²⁷⁾.

O valor preditivo positivo do teste depende do cenário epidemiológico de onde o mesmo foi obtido. Mais de 95% dos pacientes com fatores de risco para aquisição viral e/ou transaminases elevadas e que apresentam análise sorológica positiva terão também o VHC-RNA detectável. Por outro lado, aproximadamente metade dos pacientes sem fatores de risco ou com transaminases não alteradas terá infecção comprovada pelos testes de biologia molecular⁽²⁷⁾. Entretanto, um resultado negativo praticamente exclui a presença do VHC⁽⁵⁴⁾.

O ensaio recombinante por imunoblot (RIBA) foi desenvolvido como um teste suplementar para ser realizado em indivíduos que apresentavam ELISA positivo, devido a sua maior especificidade⁽²⁷⁾. Não são considerados confirmatórios, uma vez que contêm os mesmos antígenos presentes no teste imunoenzimático⁽⁵⁴⁾. Seu resultado é negativo nos pacientes que apresentaram o anti-VHC detectável devido a uma provável reação cruzada entre anticorpos. Contudo, não consegue distinguir a infecção atual da resolvida^(21,27).

O RIBA inicialmente era utilizado de maneira mais corriqueira, até o advento de ensaios mais confiáveis, baseado na detecção do ácido nucléico viral. Desta forma,

os testes de biologia molecular têm sido frequentemente empregados para a confirmação da infecção pelo VHC⁽²⁷⁾.

Os testes de biologia molecular detectam e mensuram o VHC-RNA mediante a sua amplificação, uma vez que o genoma viral está presente em quantidades relativamente pequenas nos fluídos corporais dos pacientes infectados⁽⁵⁵⁾. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH), o VHC-RNA pode ser detectado no soro humano dentro de 1 a 3 semanas após a exposição⁽⁵⁶⁾. Os testes podem ser classificados em qualitativos e quantitativos, sendo subdivididos em duas categorias técnicas: amplificação do alvo e amplificação do sinal⁽⁵⁵⁾. Três metodologias específicas foram desenvolvidas: Reação pela Cadeia de Polimerase com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR), Amplificação mediada por Transcrição (TMA) e técnica de b-DNA^(27,55).

A detecção e quantificação do material genético do VHC têm importância não só para o diagnóstico da infecção, mas também na monitorização da eficácia terapêutica em indivíduos submetidos ao mesmo⁽¹⁶⁾. De fato, a pesquisa do VHC-RNA em tempos específicos (semana 4 e semana 12) correlaciona-se com a probabilidade de resposta virológica sustentada e em alguns casos (genótipos 2 e 3) permitem a redução do tempo previsto de uso da medicação⁽²¹⁾.

A determinação do genótipo do VHC tem importância no manejo terapêutico e pode ser realizada pela análise de diferentes regiões do genoma viral. Os sítios considerados mais adequados são aqueles relativamente conservados (Core, E1, NS4 e NS5 e 5'UTR). A genotipagem pode ser realizada através do emprego de técnicas de sequenciamento, hibridização com probes tipo específicas e por PCR em tempo real⁽⁵⁷⁾.

1.9. História natural da infecção pelo vírus C

1.9.1 Infecção aguda

A infecção primária pelo VHC é caracterizada por um período de incubação de 2 a 26 semanas⁽¹⁾. Contudo, a época de contágio muitas vezes é desconhecida, pois a doença hepática torna-se clinicamente aparente em somente 25% dos indivíduos infectados^(16,58). Acredita-se que o VHC seja responsável por 20% de todos os casos de hepatite aguda⁽⁶⁾. Aqui, é comum o aparecimento de icterícia, colúria, acolia fecal, náuseas, desconforto abdominal e adinamia. Estes duram em média 2 a 12 semanas, sendo que o paciente raramente progride para forma fulminante^(1,25).

A infecção pelo VHC é autolimitada e resolve-se espontaneamente em aproximadamente 10 a 25% dos indivíduos adultos, não conferindo imunidade permanente; enquanto 75-80% dos mesmos tornam-se portadores crônicos do vírus^(1,8,16). Há lesão hepatocítica dentro de 15 a 50 dias em praticamente todos os indivíduos, embora nem sempre acompanhada de elevação de enzimas hepáticas (AST e ALT). A produção de anticorpos inicia-se em torno de 2 a 3 semanas após o contato viral⁽⁶⁾.

A ALT elevada é indicativa de doença hepática em atividade. Sua quantificação pode sofrer variações, muitas vezes de forma intensa. Em algumas ocasiões, seu valor mostra-se dentro dos limites de normalidade, mesmo quando a atividade inflamatória hepática mantém-se em progressão⁽²⁷⁾. De maneira geral, o incremento dos níveis enzimáticos costuma ser menos pronunciado do que as formas agudas de hepatite A e B, retornando aos valores basais em 2 a 12 semanas⁽¹⁾.

Os fatores decisivos para a resolução ou a persistência da infecção são complexos e multifatoriais, estando intimamente relacionados com a eficácia do sistema imunológico em suprimir a atividade viral⁽⁸⁾.

1.9.2. Infecção crônica

A hepatite C crônica caracteriza-se pela lenta progressão das lesões hepáticas na grande maioria dos casos⁽⁶⁾. O VHC não costuma provocar sinais ou sintomas clínicos específicos na primeira década de infecção. Desta forma, muitos pacientes permanecem assintomáticos por longos períodos⁽¹⁾. Menos de 20% dos pacientes desenvolvem sintomas iniciais e estes, quando presentes, são por vezes inespecíficos e não indicativos da etiologia viral. Podem ser caracterizados como mal estar geral, fadiga, tonturas, desconforto abdominal, artralguas e mialgias⁽⁶⁾. A fadiga costuma ser a queixa mais comum, presente em até 53% dos casos sintomáticos e se correlaciona com o sexo feminino, idade acima de 50 anos, cirrose, depressão e lesão cutânea do tipo púrpura⁽⁵⁸⁾. Os sintomas típicos de doença hepática surgem com o desenvolvimento das formas mais avançadas de doença hepática, por volta de 1 a 3 décadas após a infecção inicial⁽⁶⁾.

Embora a permanência de níveis elevados de transaminases tenha sido correlacionada a maior probabilidade de desenvolvimento de necrose periportal e cirrose, a ALT sérica não parece ser um bom preditor de progressão da doença hepática em uma parcela dos casos^(18,59,60). De fato, cerca de 11-19 % dos pacientes com valores enzimáticos normais desenvolvem fibrose (pontes) e/ou cirrose^(61,62).

Deste modo, é possível encontrar pacientes cirróticos sem queixas clínicas e com transaminases inalteradas^(1,58).

Na hepatite C crônica, o estudo anatomopatológico hepático denota infiltração de células inflamatórias, especialmente nos tratos portais e lóbulos⁽⁶³⁾. Podem ser descritos infiltrado inflamatório linfomononuclear portal e focal, pontes de necrose e lesões degenerativas lobulares. As lesões são decorrentes da resposta imune local, uma vez que é possível a identificação de células T CD4+ no interior do espaço portal e de linfócitos T CD8+ nas regiões periportais e lobulares⁽⁸⁾.

A cirrose ocorre em cerca de 20% dos pacientes com infecção crônica, podendo se desenvolver em até 50% destes indivíduos, dependendo da presença de co-fatores capazes de influenciar de forma negativa a evolução natural desta infecção^(6,18,58). Ainda, a evolução da fibrose hepática é dependente do tempo de contágio, podendo ser dividida em quatro períodos distintos de acordo com sua taxa de progressão: muito lenta, lenta, intermediária e rápida progressão^(62,63).

Na cirrose, a transição para a forma descompensada é marcada pelo surgimento de sinais e sintomas clínicos de falência hepática, como icterícia, varizes gástricas e esofágicas, esplenomegalia, ascite e encefalopatia⁽²⁵⁾. Fattovich et al.⁽⁶⁴⁾ descreveram um risco de 18% de descompensação hepática em cirróticos durante um período de cinco anos de observação, acompanhado pelo aumento da necessidade de transplante hepático e de mortalidade, sendo esta decorrente essencialmente de complicações relacionadas ao hepatocarcinoma, falência hepática terminal e sangramentos.

A probabilidade cumulativa para a descompensação hepática em cirróticos é de 22% em cinco anos, com uma incidência de 4,4% ao ano⁽⁵⁸⁾. A incidência de

hepatocarcinoma em pacientes cirróticos é de 1 a 4% ao ano, resultando em uma sobrevida em 5 anos menor que 5%⁽¹⁾.

Sabe-se que o processo inflamatório hepático relaciona-se com a progressão de fibrose e cirrose de maneira relativamente linear, embora o desenvolvimento da fibrose pareça ser mais acentuado nos cinco últimos anos que antecedem a instalação da cirrose⁽⁶⁵⁾. Estima-se que cerca de 20 a 33% dos pacientes apresentem uma atividade necroinflamatória acentuada, evoluindo para cirrose em 20 a 30 anos. Por outro lado, 15 a 33% dos pacientes evoluem com hepatite de baixo grau inflamatório, desenvolvendo fibrose e cirrose após várias décadas (média de 50 anos)^(6,18).

Manifestações extra-hepáticas são incomuns e aparentam ser decorrentes de processos imunologicamente mediados, essencialmente associados ao desenvolvimento de autoanticorpos e/ou imunocomplexos circulantes⁽¹⁶⁾.

Alguns pacientes podem desenvolver crioglobulinemia essencial mista, glomerulonefrite membranoproliferativa, síndrome de Sjogren, Porfíria Cutânea Tarda, síndrome Sicca, líquen plano, tireoidites, úlceras de córnea, fibrose pulmonar idiopática, diabetes mellitus do tipo 2, doenças linfoproliferativas (linfoma de células B), neuropatia periférica e parestesias dolorosas^(1,25).

1.10. Fatores associados à progressão da hepatite C crônica

A história natural da progressão do dano hepático na infecção crônica pelo VHC costuma ser silenciosa em uma grande proporção de pacientes, embora seu curso clínico e evolutivo seja passível de interferência, seja por fatores virais ou

próprios do hospedeiro. De maneira didática, estes podem ser classificados em fatores não modificáveis ou constitucionais e fatores potencialmente modificáveis⁽¹⁸⁾.

1.10.1. Fatores não modificáveis

Os co-fatores não modificáveis compreendem a idade de aquisição e duração da infecção, gênero, fonte de infecção, raça, características genéticas do hospedeiro e fatores virais⁽¹⁸⁾.

A idade na época da aquisição tem sido associada com a taxa de progressão da fibrose, mesmo após o controle estatístico para a duração da infecção. Poynard et al.⁽⁶⁵⁾ identificaram, em um estudo envolvendo 2.313 pacientes, que a progressão para a cirrose em 20 anos ocorreu em 2% daqueles infectados com menos de 50 anos e em 63% no infectados com mais de 50 anos. Estudos com crianças que se infectaram após transmissão vertical demonstraram progressão mais lenta da fibrose^(7,66). A real influência da idade na fisiopatogenia da fibrose hepática ainda não é totalmente conhecida. Porém, parece estar correlacionada a eventos degenerativos secundários ao envelhecimento, como a redução do fluxo sanguíneo hepático, disfunção mitocondrial, vulnerabilidade a fatores ambientais (stress oxidativo) e resposta imune ineficiente^(18,62).

Quanto ao gênero, a progressão para cirrose é mais intensa nos homens, podendo ser até 10 vezes mais rápida do que em mulheres^(18,62,65). A possível explicação para este fato baseia-se em teorias hormonais nas quais o estrógeno seria capaz de alterar a fibrogênese através da inibição da ativação e proliferação das células estreladas do parênquima hepático. De fato, a exposição a estrógenos

exógenos em mulheres menopausadas teria papel inibidor na progressão fibrótica. Ainda, um polimorfismo da IL-10 no sexo feminino estaria associado com menor fibrogênese^(18,62).

A fonte de infecção parece influenciar a taxa de progressão de fibrose. Estudos sobre hepatite C pós transfusional relataram uma rápida progressão para cirrose, excedendo as taxas observadas em pacientes que adquiriram o vírus por outras vias^(7,65). Desta maneira, postulou-se que o modo de transmissão e especialmente o tamanho do inoculo seriam preditores de lesão hepática⁽¹⁸⁾.

Em relação à raça, os estudos mostram resultados bem divergentes. Pacientes afroamericanos com hepatite C crônica apresentaram taxas maiores de mortalidade relacionada à doença hepática e desenvolveram hepatocarcinoma de maneira mais frequente quando comparados a caucasianos⁽⁶⁷⁾. Entretanto, outros estudos sugerem que estes indivíduos evoluem com menor progressão para cirrose, níveis menores de ALT e de atividade necroinflamatória histológica⁽⁶⁸⁾. A velocidade de desenvolvimento de lesões hepáticas parece ser mais acelerada em moradores dos Estados Unidos de origem latina⁽⁶⁹⁾. Contudo, não foi possível a exclusão de variáveis de confusão na análise destes dados, uma vez que o acesso destes cidadãos ao sistema de saúde costuma ser restrito e, portanto, inadequado, nos países onde os estudos foram realizados⁽¹⁸⁾.

A influência do polimorfismo de genes específicos na patogênese e taxa de progressão de fibrose ainda constitui um campo aberto a discussão^(30,58). Inicialmente, foram identificados inúmeros alelos do MHC que se correlacionavam tanto a uma reduzida atividade inflamatória quanto a maior progressão do dano histológico⁽¹⁸⁾. Mais recentemente, estudos abordaram o polimorfismo da TGF- β 1 e angiotensina II,

associando-os a maior probabilidade de desenvolvimento de fibrose hepática^(70,71). Outros estudos abordaram o papel dos polimorfismos do CCR5, IL-10, CYP2D6, DDX5 e CPT1A⁽¹⁸⁾. Desta forma, o risco de desenvolvimento de fibrose possivelmente envolve a ação de numerosos genes, embora a identificação exata e a contribuição relativa de cada um ainda permaneçam uma incógnita^(18,58).

Quanto às características virais, o genótipo do VHC, sua carga viral na época da biópsia e a diversidade de quasiespécies não parecem exercer influência na progressão da doença hepática^(62,65). Acreditava-se que o VHC genótipo 1 seria capaz de produzir lesão hepática de maneira mais acelerada^(7,18). Contudo, estes resultados não foram reproduzidos em outros estudos, especialmente quando as análises foram controladas para outros fatores de confusão⁽⁶⁵⁾. Por outro lado, o genótipo 3 possui ação citopática direta, observada através de sua associação com esteatose hepática e esteatohepatite, ainda que a maior propensão para fibrose neste caso pareça ser independente da infiltração gordurosa visceral^(18,72,73).

O envolvimento direto do VHC, em especial a proteína do core, tem sido implicado na promoção do stress oxidativo, esteatose e apoptose. A lesão hepática viral independente dos mecanismos inflamatórios poderia explicar, em parte, a presença de fibrose nos pacientes que apresentam enzimas hepáticas normais⁽¹⁸⁾.

1.10.2. Fatores potencialmente modificáveis

Os co-fatores potencialmente modificáveis englobam a graduação histopatológica, consumo de álcool, tabagismo, metabolismo do ferro, esteatose, resistência insulínica, obesidade e co-infecções⁽¹⁸⁾.

O grau de atividade necroinflamatória hepática correlaciona-se com o desenvolvimento de fibrose. Yano et al.⁽⁷⁴⁾ identificaram que, após o seguimento de 70 pacientes por uma média de 9 anos, a incidência cumulativa de cirrose estava associada a uma maior atividade necroinflamatória na análise histológica inicial. De maneira oposta, Poynard et al.⁽⁶⁵⁾ identificaram que somente a ausência total de inflamação correlacionava-se a uma menor taxa de fibrose.

Vários estudos têm demonstrado o papel do consumo de derivados do álcool no aumento da taxa de progressão da fibrose, da incidência de hepatocarcinoma e de mortalidade relacionada à doença hepática^(7,18,58,62,75). O limite preciso acima do qual a quantidade de álcool utilizada acelera a progressão da hepatopatia ainda não é conhecido. Contudo, parece haver consenso que o uso de mais de 50 a 60 gramas de etanol por dia para homens e de 20 a 40 gramas por dia para mulheres é capaz de influenciar de maneira significativa a lesão histológica em portadores de hepatite C crônica⁽⁷⁵⁾. De fato, Poynard et al.⁽⁷⁶⁾ descreveram que o consumo acima de 50 gramas por dia estava associado, de maneira independente, a um aumento da fibrogênese. Ainda não é claro qual o impacto do consumo alcoólico leve a moderado na doença hepática viral, uma vez que há dificuldade na padronização de uma classificação de consumo que envolva o tempo de uso e a quantidade ingerida^(58,62,75). Os mecanismos fisiopatológicos secundários ao álcool no cenário da infecção crônica pelo VHC ainda não são bem compreendidos⁽⁷⁵⁾. Entretanto, o etanol parece ter ação sinérgica a atividade viral promovendo disfunção imunológica (humoral e celular) e o aumento da replicação viral e da complexidade de quasiespécies, além de se associar a esteatose e esteatohepatite, apoptose e ao incremento do depósito de ferro hepático^(18,75).

O tabagismo tem sido classificado como um fator de risco independente para progressão de fibrose, mesmo após o controle estatístico para o consumo de álcool^(18,58). Pessione et al.⁽⁷⁷⁾ através do estudo de 310 pacientes portadores de hepatite C crônica, identificaram de forma independente a associação entre o tabagismo acentuado (acima de 15 anos / maço) e maior atividade fibrótica e necroinflamatória hepática ($p < 0,03$ e $p < 0,04$). Hézode et al.⁽⁷⁸⁾ demonstraram que 81,7% dos indivíduos tabagistas com consumo acima de 20 anos / maço apresentavam graduação A2 e A3 pelo METAVIR versus 62% nos não fumantes ($p < 0,009$). Da mesma forma que o tabaco, o consumo diário de *Cannabis* tem sido descrito como um facilitador da fibrogênese, provavelmente através de sua ação promotora de esteatose^(78a).

A infecção pelo VHC correlaciona-se com o comprometimento do metabolismo dos carboidratos e gorduras, levando ao desenvolvimento de esteatose hepática, resistência insulínica e diabetes mellitus^(62,79). De fato, esteatose e esteatohepatite estão associadas à síndrome metabólica, embora possam ocorrer em pacientes com hepatite C crônica independente da presença de obesidade, consumo alcoólico e dislipidemia^(80,81).

A esteatose hepática desenvolve-se em cerca de 40 a 86% dos pacientes infectados pelo VHC, sendo mais freqüente do que na população geral^(81,82). No Brasil, Coral et al.⁽⁸³⁾, através do estudo anatomopatológico de lâminas de fígado de 120 pacientes portadores de hepatite C crônica, identificaram esteatose em 54,2% dos casos. Esta lesão contribui para a progressão da doença hepática acentuando a atividade necroinflamatória e a taxa de progressão da fibrose. Além disso, parece aumentar a incidência de hepatocarcinoma e reduzir a resposta terapêutica ao

interferon^(62,81). Todavia, a maioria dos pacientes infectados apresenta lesões leves, com acometimento de menos de 30% dos hepatócitos⁽¹⁸⁾.

O desenvolvimento de resistência insulínica e o diabetes mellitus do tipo 2 é 4 a 11 vezes mais comum em pacientes com hepatite C crônica do que na população em geral⁽⁷⁹⁾. Estão associados de maneira independente a instalação de fibrose acentuada, cirrose e a redução da resposta virológica sustentada após terapia combinada^(18,62,79). A causa da resistência insulínica parece ser multifatorial. O TNF- α parece ser capaz de inibir a fosforilação dos receptores de insulina, reduzindo sua ação^(79,81). Solidificando estes achados, parece haver correlação, especialmente em infecção pelos genótipos 1 e 4, entre carga viral elevada e a redução da sensibilidade a insulina – observado através do cálculo do modelo de avaliação homeostática (HOMA IR), de maneira que o tratamento efetivo produziu melhora do metabolismo da glicose^(18,84). Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela maior fibrogênese encontrada nestes pacientes ainda não são totalmente conhecidos, entretanto acredita-se que os altos níveis de insulina e glicose estimulariam a proliferação de células estreladas e a síntese de fator de crescimento do tecido conectivo⁽⁷⁹⁾.

A obesidade, principalmente em sua distribuição visceral, parece afetar de forma indireta a progressão para fibrose hepática^(18,72). Assim, a sua associação com esteatose, esteatohepatite não alcoólica e resistência à insulina contribui para a piora histológica em pacientes com hepatite C crônica⁽⁶²⁾. De fato, a perda de peso por vezes se associa à normalização das transaminases, dos níveis glicêmicos e da atividade das células estreladas⁽⁷⁹⁾. A menor resposta terapêutica e o desenvolvimento de hepatocarcinoma são vistos com maior frequência em pacientes com índices elevados de massa corporal⁽¹⁸⁾. Em pacientes infectados pelo genótipo 1, a falha

terapêutica foi mais freqüente em indivíduos obesos que expressaram a fosfoenolpiruvato carboxiquinase e a SOCS-3, fatores intracelulares associados a inibição da via de sinalização do interferon⁽⁸⁵⁾.

A sobrecarga hepática de ferro pode ser descrita em até 30 a 40% dos pacientes portadores de hepatite C crônica, sendo conseqüência da própria inflamação hepática associada a mudanças no transporte e armazenamento do ferro, induzidos possivelmente pela ação viral⁽⁸⁶⁾. A correlação entre mutações específicas no gene HFE e a presença anormal de ferro hepático ainda é controversa⁽⁵⁸⁾. Contudo, este fenômeno resulta em uma maior atividade fibrótica e menor resposta terapêutica⁽¹⁸⁾.

A coexistência de outras infecções associadas ao VHC tem sido implicada na acentuação da lesão hepática^(18,21,62). Nos indivíduos co-infectados com o HIV, a resposta das células T CD4+ e CD8+ está reduzida de maneira significativa, tanto em sua magnitude quanto em abrangência. A carga viral do VHC costuma ser mais elevada, devido a redução absoluta do número de linfócitos T CD4+, aliada a resposta inadequada desenvolvida por estas células frente ao estímulo antigênico^(18,87). Desta forma, o grau de imunossupressão secundário a presença do HIV influi na piora histológica. O impacto do HIV na evolução natural da hepatite C crônica é bem conhecido, de modo que a doença hepática tem sido classificada como uma das principais causas de mortalidade em indivíduos infectados por este vírus⁽⁸⁷⁾. A presença do HIV associa-se a rápida progressão para cirrose, falência hepática, hepatocarcinoma e menor freqüência de clareamento viral, seja espontâneo ou induzido farmacologicamente^(18,87). Graham et al.⁽⁸⁸⁾ demonstraram que a co-infecção aumenta o risco de desenvolvimento de cirrose em 2,1 vezes e o risco de descompensação clínica em 6,1 vezes. A contagem de CD4+ menor que 200 células

por mm^3 está associada a um risco de mortalidade por hepatopatia 6,7 vezes maior do que em pacientes com valores acima deste ponto de corte⁽⁸⁹⁾. A terapia antiviral de alta potência (HAART) para o HIV foi capaz de reduzir a fibrogênese e a mortalidade relacionada à doença hepática de maneira substancial, embora a utilização deste grupo de medicação tenha, em parte, associação com hepatotoxicidade⁽¹⁸⁾.

A infecção pelo HTLV tem forte associação com a infecção pelo VHC, devido ao compartilhamento das vias de transmissão⁽²¹⁾. Entretanto, existem poucos estudos abordando o impacto deste vírus na história natural da hepatite C crônica. Alguns trabalhos apontam para um maior risco de hepatopatia incipiente, hepatocarcinoma e morte por doença hepática neste grupo⁽⁹⁰⁾. No nosso meio, Milagres⁽⁹¹⁾ não encontrou diferença histológica entre pacientes infectados pelo VHC, VHC e HTLV-1 e VHC e HTLV-2.

Em regiões endêmicas, a infecção pelo *Schistosoma mansoni* tem um impacto negativo na piora da inflamação hepática e na fibrogênese, uma vez que a presença deste helminto no parênquima hepático parece inverter a resposta celular do tipo Th1 para Th2, sendo esta pouco eficaz para o controle supressivo do VHC⁽⁹²⁾.

A influência da infecção pelo VHB na história natural da infecção crônica pelo VHC será abordada em seguida.

2. O vírus da hepatite B

2.1. Epidemiologia da infecção pelo vírus B

A infecção pelo VHB apresenta distribuição mundial devido principalmente a sua alta transmissibilidade. Existem atualmente cerca de dois bilhões de indivíduos infectados em todo o mundo, sendo a grande maioria constituída por moradores de regiões de alta e intermediária endemicidade (45% e 43% respectivamente)⁽⁹³⁾. Desta forma, aproximadamente um terço da população mundial tem marcadores sorológicos de contato pregresso com este vírus^(1,93-95).

Cerca de 350 a 400 milhões de pessoas em todo mundo são portadoras de infecção crônica pelo VHB. Quinze a quarenta por cento destes indivíduos invariavelmente acabam evoluindo para cirrose, com risco potencial de complicações, como o hepatocarcinoma e falência hepática. O VHB é responsável por 30% de todos os casos de cirrose e 53% dos casos de neoplasia hepática. A infecção crônica é considerada uma das 10 principais causas de mortalidade em todo mundo, sendo responsável por um milhão de mortes a cada ano, um terço delas pelo carcinoma. Assim, o VHB é classificado como um importante agente carcinogênico, perdendo apenas para o cigarro como causa de neoplasia pulmonar^(17,95).

De acordo com a prevalência sorológica do antígeno de superfície (HBsAg) em uma dada população e/ou pela presença de marcadores de infecção pregressa resolvida (anti-HBcAg), o mundo pode ser classificado em três regiões endêmicas distintas, segundo a OMS^(7,94,96):

1- Regiões de baixa endemicidade: onde a prevalência de HBsAg é menor que 2% e a infecção pregressa ocorre em menos de 20% da população. Caracterizam as seguintes áreas: América do Norte, Europa do Norte, Cone Sul-Americano, Nova Zelândia e grande parte da Austrália.

2- Regiões de endemicidade intermediária ou moderada: onde a prevalência de HBsAg está entre 2% e 6 % e a infecção pregressa ocorre entre 20% a 60% da população. Englobam: Norte da América do Sul, Europa Oriental, Mediterrâneo, Rússia e Japão.

3- Regiões de alta endemicidade: a prevalência de HBsAg é maior que 7% e a infecção pregressa ocorre em mais de 60% da população. Constituídas pela Bacia Amazônica (Amazônia Ocidental), África Subsaariana, Sudeste Asiático, parte da Oceania, comunidades de aborígenes australianos, Círculo Polar Ártico (Alasca, Groenlândia, norte do Canadá) e parte do Caribe.

No Brasil, a maioria dos dados obtidos é proveniente de inquéritos não populacionais, baseados em bancos de sangue. Contudo, os dados permitem ao menos extrapolar a situação endêmica local. No geral, nota-se um gradiente decrescente de endemicidade na direção Norte-Sul. Do ponto de vista epidemiológico, a infecção costuma ser dinâmica, uma vez que sua prevalência sofre influência das condições socioeconômicas, hábitos de vida, movimentos migratórios e grau de exposição ao risco^(96,97).

Desta forma, a região Norte do país é considerada hiperendêmica. Há grande heterogenicidade nas prevalências locais, mesmos em áreas consideradas próximas. Encontra-se alta frequência de marcadores sorológicos nas regiões dos afluentes da Bacia Amazônica, como o rio Juruás, Purus e Médio Solimões, em especial a cidade de Lábrea, notoriamente conhecida pelo grande número de casos agudos fatais decorrentes da co-infecção pelo vírus Delta (VHD). De fato, o VHD é muito prevalente nessa região brasileira, atuando como um fator complicador da infecção pelo VHB^(96,98).

A região Sudeste configura área de baixa prevalência. A cidade de São Paulo foi mapeada em um estudo populacional na década de 90, sendo que a prevalência obtida de HBsAg foi de 1,04 % (IC95% 0,43-1,65) e de anti-HBcAg de 4,90 % (IC 3,6-6,2)⁽⁹⁷⁾.

2.2. Vias de transmissão

O VHB é encontrado no sangue em altas concentrações. As vias parenteral e sexual são altamente efetivas para a transmissão. Sabe-se que o vírus é estável em superfícies inanimadas, podendo persistir viável no meio ambiente por cerca de sete dias, sem perder sua infectividade^(96,99). O VHB é passível de infecção quando localizado em soro, sêmen, secreção vaginal, exsudatos, serosas e líquido. Porém, o risco de infecção é baixo através do contato com saliva, urina, fezes, lágrima, suor e bile, devido ao baixo inóculo viral⁽¹⁾. Apesar de ser detectado em leite materno, a transmissão pela amamentação não se mostra efetiva⁽⁹⁹⁾. A via de transmissão não é identificada em cerca de 30-35% dos indivíduos infectados. Nestes casos, a aquisição

viral provavelmente é conseqüente a formas menos evidentes de transmissão parenteral^(1,17).

De acordo com a distribuição endêmica geográfica, é possível distinguir padrões típicos de transmissão^(1,93). Nas regiões de alta endemicidade predominam a transmissão vertical, principalmente durante o parto, período neonatal e primeira infância (menores de cinco anos), provavelmente por contato íntimo interpessoal^(1,99).

Nas regiões de moderada endemicidade, encontram-se padrões mistos de transmissão, tanto por via vertical como horizontal (contato interpessoal, sexual ou parenteral).

Nas regiões de baixa endemicidade impera a transmissão horizontal, onde o vírus circula predominantemente por via sexual ou sanguínea em grupos com comportamento de risco, como profissionais do sexo, usuários de drogas ilícitas intravenosas, homossexuais e heterossexuais promíscuos e indivíduos com histórico de doenças sexualmente transmissíveis. Nesta situação, a grande parcela dos acometidos é constituída por adolescentes ou adultos jovens^(1,98).

2.3. Virologia

O VHB é um membro da família *Hepadnaviridae*. Esta é constituída por vírus hepatotrópicos, tendo o DNA como constituinte de seu material genético. Infectam, além de humanos, aves e mamíferos (esquilos, marmotas e patos)⁽¹⁰⁰⁾. Estes agentes apresentam tropismo por células hepáticas, porém seu genoma tem sido identificado em sítios extra-hepáticos como rim, pâncreas, ductos biliares, músculo e células linfomononucleares⁽¹⁰¹⁾.

As partículas virais completas, ou partículas de Dane, são estruturas pequenas com cerca de 40 a 42 nm de diâmetro sendo constituídas por um envelope lipoprotéico externo, onde se encontram três formas distintas de glicoproteínas estruturais ou antígenos de superfície, denominados HBsAg, imersas em uma estrutura lipídica^(100,102).

Dentro deste envelope identifica-se o nucleocapsídeo viral ou core do vírus, de simetria icosaédrica. O core é constituído pela proteína estrutural denominada HBcAg. Esta contém no seu interior o genoma viral de 3,2 kb, com formação circular e relaxada, composto por duas fitas de DNA (rcDNA), sendo uma delas parcialmente completa (de polaridade positiva), além de uma proteína com características enzimáticas (polimerase), ligada a extremidade 5' da fita de DNA de polaridade negativa, resultante do processo inicial de replicação viral^(30,103).

Além da produção das partículas de Dane, as células infectadas sintetizam duas estruturas subvirais lipoprotéicas não infectantes. Uma assume forma esférica, com 20 nm e outra, característica filamentosa e alongada⁽¹⁰⁰⁾. Essas estruturas são constituídas somente por glicoproteínas do envelope (HBsAg) associadas a lipídeos e circulam de maneira excessiva em relação as partículas completas, numa razão de 1.000:1 a 10.000:1^(102,103).

2.3.1. Genoma viral

O genoma viral é otimizado para o pequeno tamanho do vírus. É constituído por 4 fases de leitura aberta ou ORFs. Assim, as informações genéticas são sobrepostas, de maneira que as mesmas codificam proteínas com diferentes funções, apesar da grande similaridade entre as seqüências nucleotídicas precursoras⁽¹⁰⁰⁾. A região pré-S – S (pré-superfície – superfície) do genoma codifica três tipos de antígenos de superfície, com tamanhos distintos, a partir de três diferentes códons de iniciação⁽¹⁰⁰⁾. A menor proteína (24 kD) é também a mais abundante, sendo chamada de S (*small*) ou *major*. A proteína M (*medium*) é codificada mediante a transcrição da região pré-S2, enquanto a leitura a partir do códon que marca o início da região pré-S1 leva a síntese da proteína L (*large*), que conjuntamente com a proteína S, permite a união viral com a célula hospedeira e compõe a estrutura do vírus, de modo que o mesmo possa ser liberado para a circulação⁽¹⁰³⁾. A proteína L interage com o nucleocapsídeo, estabilizando sua estrutura final⁽¹⁰⁴⁾. A síntese de grande quantidade dessa proteína relaciona-se diretamente a liberação de partículas virais completas (Dane), suprimindo a liberação de partículas subvirais não infectantes⁽¹⁰⁵⁾.

A região pré-C – C (pré-core – core) codifica os antígenos do core (HBcAg) e o antígeno solúvel “e” (HBeAg). A transcrição a partir do início da região C produz uma proteína de 21 kD, componente estrutural do capsômero viral, enquanto a leitura da região pré-C leva a síntese de uma proteína maior, com 24 kD, que por sua ação sinalizadora dirige-se à via secretora celular⁽¹⁰⁰⁾. No retículo endoplasmático e complexo de Golgi, proteases próprias do hospedeiro rompem a estrutura protéica, removendo 19 aminoácidos da posição aminoterminal e o domínio C terminal, rico

em arginina, resultando em dois subprodutos: HBeAg e HBcAg. O HBeAg, um fragmento de 16 kD, é secretado e possui funções ainda não bem esclarecidas. Todavia, sua presença não parece ser necessária para que haja replicação efetiva⁽¹⁰³⁾. Desta forma, a detecção sorológica do antígeno “e” é considerada um bom marcador de replicação e infectividade do vírus selvagem, sem mutações⁽¹⁰⁴⁾.

A região P codifica a polimerase viral, uma proteína multifuncional enzimática. Esta é subdividida em quatro regiões ou domínios: proteína terminal - um sítio de interação entre o capsídeo e o RNA pré-genômico; região espaçadora - sem função definida; polimerase – que sintetiza DNA dependente de DNA e DNA dependente de RNA (transcriptase reversa); e RNase H - que destrói a fita precursora de RNA^(13,103).

A polimerase é constituída por 344 aminoácidos, que definem regiões conservadas denominadas de A a F. O sítio catalítico ou motivo YMDD (Tirosina, Metionina, Asparagina, Asparagina) está localizado na região C⁽¹⁰³⁾.

A região X produz a proteína X (HBxAg), com funções ainda não totalmente reconhecidas, mas essenciais para replicação viral⁽¹⁰³⁾. Promove modulação de sinais necessários para a transcrição de seqüências genômicas através da regulação da BCP (*basal core promoter*) e de outras regiões promotoras, podendo ainda afetar, de maneira direta e indireta, a expressão de genes próprios da célula hospedeira, inclusive daqueles promotores de crescimento celular⁽¹⁰⁴⁾. Ainda, interage com proteínas de sinalização intracelular essenciais para o controle do ciclo celular⁽¹⁰⁰⁾.

2.3.2 Diversidade genética

A infecção pelo VHB é extremamente produtiva. A sua atividade replicativa em hepatócitos produz cerca de 10^{11} cópias virais / mL / dia. Isto, associado ao fato do processo de replicação viral ser dependente de transcriptase reversa, uma enzima sem mecanismos de correção, resulta no aparecimento de grande número de mutações, caracterizando um *pool* heterogêneo de partículas virais geneticamente correlacionadas ou quasispécies^(99,103). Estima-se que a taxa de mutações seja da ordem de $1,4$ a $3,2 \times 10^5$ substituições de nucleotídeos / sítio / ano^(99,104).

Na década de 70, este vírus era classificado em subtipos, de acordo com o polimorfismo de seqüências de aminoácidos (determinantes) mutuamente exclusivas presentes na proteína S viral (d, w, y, r), que delimitavam uma região altamente conservada denominada determinante a ou MHR (*Major Hydrophilic Region*) (aminoácidos 124-147 da proteína S)⁽¹⁰⁴⁾. Assim, foram caracterizados quatro subtipos (adw, ayw, adr, ayr), que se correlacionavam, por exemplo, com a distribuição geográfica do vírus e com a seqüência nucleotídica viral⁽¹⁰⁰⁾.

Com a evolução da virologia descritiva, foi possível a identificação genotípica através do sequenciamento genômico viral, muito mais fidedigna do que a classificação inicial em subtipos. Dessa forma, foram descritos 8 genótipos (A, B, C, D, E, F, G, H), distribuídos de acordo com divergência maior que 8% no genoma total e maior que 4% no gene S; além de diversos subgenótipos^(95,100,104).

Os mutantes do VHB podem ser selecionados de populações virais minoritárias através da intervenção terapêutica ou durante o curso natural da doença. As mutações podem se desenvolver na região genômica pré-core / core promoter, na

polimerase ou na região S (envelope)⁽¹⁰⁴⁾. Ainda há muita controversa em respeito ao impacto clínico e evolutivo das substituições nucleotídicas. Contudo, mesmo resultando em um menor *fitness* viral, a maior incidência de casos agudos graves e mesmo fulminantes pode estar associada à presença de variantes virais⁽¹⁰⁶⁾.

2.3.3. Replicação viral

A etapa inicial da infecção celular pode ser dividida em três estágios: ligação, fusão e entrada viral⁽¹⁰⁰⁾. O vírus liga-se a membrana da célula hospedeira através da interação com receptores específicos, ainda não bem conhecidos, mas provavelmente múltiplos e distribuídos nas proteínas de superfície S e L. A fusão do envelope viral a membrana celular decorre de dois mecanismos: interação com os constituintes da membrana celular, o que leva a liberação do nucleocapsídeo e pela formação de endossomos dirigidos para dentro do citoplasma, por um processo provavelmente dependente de redução de pH e da ação de enzimas proteolíticas capazes de induzirem a exposição pelo vírus de seqüências promotoras de fusão⁽¹⁰³⁾.

Após a fusão do envelope com a membrana e o desnudamento viral, o nucleocapsídeo se dirige pelo citosol até o núcleo, onde libera seu material genético após a perda da estrutura protéica do core⁽¹⁰³⁾. A partir daí, seu genoma (seqüência de DNA parcialmente dupla ou dsDNA) passa por um mecanismo de reparo da fita incompleta e é convertido da forma circular relaxada para uma forma circular episomal, fechada por ligação covalente, altamente estável e conjugada com proteínas nucleares. Aqui o genoma é denominado cccDNA⁽¹⁰⁷⁾. Este microsomo

atua como uma fonte para transcrição de RNAs virais através da ação da RNA polimerase II, sintetizada pelo próprio hospedeiro^(102,103).

O DNA viral dá origem a uma fita longa de RNA, com 3,5 kb, denominada de RNA pré genômico (pgRNA), que é transportada até o citoplasma onde atua como RNAm, sendo traduzida no retículo endoplasmático rugoso em proteínas do core, polipeptídeo e (HBcAg e HBeAg) e polimerase⁽¹⁰⁴⁾. Paralelamente, o cccDNA dá origem a RNAm de 2,4 e 2,1 kb, que darão origem as proteínas de superfície e a um RNAm de 0,7 kb, precursor do HBxAg⁽¹³⁾. Desta forma, a replicação do DNA viral ocorre de maneira indireta através da formação de uma fita longa de RNA (pgRNA), contendo uma estrutura em forma de loop (ϵ) capaz de ser reconhecida pela região amino terminal da polimerase. O RNA é então encapsidado (empacotado) juntamente com esta enzima, que inicia a transcrição reversa. A primeira fita de DNA sintetizada é de polaridade negativa e à medida que a mesma é formada, o RNA precursor é degradado por ação enzimática⁽¹⁰³⁾.

A presença de um oligoribonucleotídeo residual, complementar a uma região de onze nucleotídeos denominada DR1, serve de *primer* para a síntese da fita de DNA de polaridade positiva, após sofrer translocação para posição 30 da mesma fita, numa região denominada DR2. A síntese desta fita ocorre de forma parcial, sendo interrompida uma vez que o processo de formação do nucleocapsídeo é finalizado. Um sítio terminal redundante da fita negativa, de oito nucleotídeos, permite a conformação circular do genoma⁽¹⁰⁴⁾. Uma parcela do core recircula para o núcleo, alimentando o *pool* de cccDNA, que pode atingir até 50 cópias por célula (média de 1,5 cópia / célula), enquanto outra parte recebe o envelope viral, contendo os antígenos de superfície, no próprio retículo endoplasmático rugoso e se associa a

glicanos e lípidos do complexo de Golgi e membrana celular, sendo liberado para a circulação^(100,102,105). A taxa de liberação dos vírions por cada hepatócito infectado é de 1 a 10 a cada 24 horas, culminando numa taxa global de 10^{10} a 10^{12} partículas virais produzidas por dia, baseado na estimativa de infecção de 5 a 40% de aproximadamente 2×10^{12} hepatócitos presentes no fígado⁽¹⁰⁵⁾.

2.4. Mecanismos de persistência viral

Os elementos que definem a persistência da infecção pelo VHB são multifatoriais e estão relacionados às características próprias do vírus e de seu hospedeiro. A maioria das infecções primárias em adultos é autolimitada e resulta no clareamento viral, culminando em imunidade duradoura contra reinfecções. Porém, em menos de 5% dos adultos, a infecção não se resolve e torna-se persistente⁽¹⁰⁸⁾. Neste caso, a replicação viral continua principalmente no fígado, levando a uma viremia contínua⁽¹⁰³⁾.

A probabilidade de desenvolvimento de infecção crônica é maior quando mais precocemente se adquire o vírus⁽¹⁾. O motivo deste fato ainda não foi totalmente esclarecido. Especula-se sobre a maior imunotolerância dos recém-nascidos, seja pela imaturidade celular ou pela ação imunomoduladora do HBeAg⁽³⁶⁾.

As mutações são consideradas possíveis mecanismos de persistência⁽¹⁰⁸⁾. Mutações de escape envolvendo o determinante a do antígeno de superfície (vacina ou imunoglobulina induzidas) parecem ser mais relevantes do que aqueles que evadem a resposta imune celular. Assim, variantes com mutações em epítomos dominantes de células T são pouco frequentes tanto na infecção aguda como na

crônica, refletindo a fraca resposta imune e conseqüentemente a pouca pressão seletiva característica desse cenário. Desta forma, este tipo de mutação não parece afetar de forma marcante a resolução de uma infecção aguda ou exercer um papel definidor para a persistência viral⁽³⁰⁾.

O VHB-DNA mantém-se nos hepatócitos como epissomo (cccDNA) nas formas crônicas da infecção, mesmo em indivíduos submetidos a terapia com análogos nucleosídicos / nucleotídicos ou interferon, uma vez que trata-se de forma não replicativa e, portanto, não passível da ação por esses agentes^(109,110).

A alta estabilidade das moléculas de cccDNA, associada a longa meia vida dos hepatócitos (de 2 semanas a vários meses) e sua capacidade de transmiti-las a células filhas durante a mitose, sugere que a persistência hepática desta forma intermediária é possível, mesmo em indivíduos com histórico de infecção aguda remota. Vários estudos têm demonstrado esta teoria^(106,109,111-114).

Yuki et al.⁽¹¹⁵⁾, através do emprego de *primers* específicos para a região DR (*repeat region*) do genoma do VHB, foram capazes de amplificar este microssomo de forma altamente específica, em detrimento de outras formas replicativas intermediárias ou mesmo da seqüência integrada em amostras histológicas de 19 pacientes com infecção aguda progridente, demonstrando a presença deste epissomo em todas as biópsias estudadas. Mason et al.⁽¹¹⁶⁾ também demonstraram que o VHB-DNA hepático pode persistir por vários anos, tanto na forma replicativa como de maneira quiescente, em pacientes HBsAg (-) após um período de 3-67 meses após a recuperação de uma infecção aguda. Yuen et al.⁽¹¹³⁾ analisaram prospectivamente 16 pacientes com histórico de hepatite B resolvida, do ponto de vista bioquímico,

virológico e histológico. Em 37% dos mesmos foi possível a identificação do genoma viral intrahepático, sob a forma episomal.

Desta forma, evidências baseadas na presença do genoma viral em soro, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e em hepatócitos, aliada a expressão clínica de hepatite em indivíduos com sorologia compatível com infecção resolvida pelo VHB submetidos a tratamentos imunodepressores ou com patologias imunossupressoras de base submetem a possibilidade da presença de uma infecção latente pelo VHB, de baixíssimo grau replicativo (Tabela 1)^(106,111,115-117).

Tabela 1 - Possíveis situações de imunossupressão e reativação clínica do VHB

Neoplasias hematológicas

Infecção pelo HIV

Transplante de medula óssea

Transplante hepático

Transplante renal

Quimioterapia

Corticoterapia

Uso de anti-CD10 (Rituximab)

Uso de anti-CD52 (Alemtuzumab)

Uso de anti-TNF (Infliximab)

Adaptado de Raimondo et al., 2007 e Hollinger, 2008^(105,114)

A possibilidade da persistência residual do VHB após infecção resolvida começou a ser debatida há mais de 20 anos, quando foi publicado o primeiro relato de hepatite transfusional envolvendo um doador que possuía o anti-HBcAg como único marcador sorológico de infecção pelo VHB⁽¹¹⁸⁾.

Na grande maioria dos indivíduos imunocompetentes, o VHB residual não parece promover uma atividade inflamatória hepática intensa ou uma maior incidência de hepatocarcinoma. Porém, Yuki et al.⁽¹¹⁵⁾ descreveram um baixo grau de inflamação hepática em sete indivíduos coalescentes de infecção resolvida. Resultados semelhantes foram obtidos de modelos animais coalescentes de infecção aguda^(114,119).

Do prisma epidemiológico, o receio recai sobre a seleção de possíveis transmissores através da doação de sangue e órgãos. Há relatos de indivíduos positivos para o anti-HBcAg e negativos para o VHB-DNA, por técnicas diagnósticas comerciais de biologia molecular, que transmitiram o vírus durante doação de sangue. Contudo, a inoculação experimental do soro e células mononucleares infectadas pelo VHB em chimpanzés, provenientes de pacientes com sorologia compatível com infecção resolvida [HBsAg (-) e anti-HBsAg (+)] não produziu infecção⁽¹¹⁴⁾. Neste caso em especial, postulou-se se este desfecho teria sido influenciado pelo pequeno inóculo do material injetado, uma vez que a dose infectante mínima do VHB ainda não foi totalmente elucidada. Ainda, a real influência do genótipo viral, do provável acúmulo de mutações incapacitantes para a replicação e mesmo da neutralização das partículas por anticorpos circulantes no comprometimento da infectividade do VHB residual permanece indefinida^(105,106,120).

Traços de material genético do VHB foram encontrados tanto em pesquisa de soro como em PBMCs de indivíduos HBsAg (-) muito tempo após a recuperação sorológicas da infecção, situação esta caracterizada pela perda dos antígenos virais com conseqüente soroconversão^(105,106,115,119,121). De fato, Rehmann et al.⁽¹¹⁷⁾ demonstraram a persistência de CTLs após infecção aguda, por longos períodos (até

23 anos após o contágio) e, principalmente, com características fenotípicas compatíveis com atividade celular, após estimulação *in vitro* com múltiplos epítomos do VHB – remetendo a fase aguda da infecção. Este achado favorece a hipótese da exposição contínua destas células aos antígenos do VHB na vigência de baixa replicação viral⁽¹¹⁸⁾. Assim, através do uso de marcadores celulares e do emprego de métodos de fluorescência, confirmou-se a presença de CTLs que foram recentemente ativados, recuperados de indivíduos expostos a infecção aguda anos atrás. A indução de CTLs específicos para antígenos virais necessita da síntese de vírions por células infectadas, pois sua ativação é dependente da apresentação endógena de epítomos celulares via HLA classe I, ao contrário do estímulo para a produção de anticorpos, que parece ser mantido por células dendríticas que albergam antígenos virais residuais⁽¹¹⁷⁾.

Michalak et al.⁽¹¹¹⁾ descreveram a persistência no soro do VHB-DNA em 80% dos indivíduos após resolução clínica e sorológica da infecção aguda, de forma que o genoma viral foi capaz de manter sua capacidade replicativa inclusive em células linfomononucleares de sangue periférico, comprovada através da presença do VHB-RNA. Desta forma, as próprias células do sistema imune, além do fígado, seriam um sítio de persistência viral.

Marusawa et al.⁽¹²¹⁾ comprovaram a presença de formas replicativas do VHB em 20 casos que não apresentavam evidências bioquímicas de disfunção hepática, mas que eram portadores do anticorpo anti-HBcAg. Destes, 13 de 14 indivíduos com todos os marcadores sorológicos de eliminação viral (anti-HBsAg e anti-HBcAg) apresentavam o genoma do VHB detectável no hepatócito. Neste estudo, foi possível a discriminação da forma episomal cccDNA do rcDNA – forma relaxada presente no

interior da partícula de Dane - empregando enzimas capazes de digerir o rcDNA e pelo tipo de técnica de PCR, na qual utilizou-se sondas dirigidas a região X do genoma, englobando as seqüências DR1 e DR2, que se apresenta de forma contínua em ambas as fitas do cccDNA; além de amplificação de seqüências do VHB-RNA, indicativos de transcrição e replicação viral. Também foi possível demonstrar o DNA viral integrado ao genoma do hospedeiro, através da presença intacta da região DR1, de maneira similar à praticada pelos retrovírus⁽¹¹⁶⁾. Porém, os níveis de replicação e transcrição viral parecem ser reduzidos, uma vez que houve necessidade de realização de vários turnos de amplificação genômica para a detecção destes produtos. No mesmo estudo de Marusawa et al., não houve evidência de mutação na região pré-core e core promoter, indicando predominância de cepas selvagens, capazes de estimular a produção do anti-HBeAg e dos outros anticorpos contra estruturas virais.

Ainda há dúvidas se nesta situação a replicação do genoma é capaz de sintetizar partículas virais intactas, incluindo os elementos protéicos do nucleocapsídeo e do envelope, ou mesmo se o VHB-DNA identificado é constituinte do genoma completo do vírus⁽¹⁰³⁾. Michalak et al.⁽¹¹¹⁾ sugerem que não há somente a transcrição viral e síntese protéica como também a circulação sanguínea dos mesmos, possivelmente como partículas completas de Dane, que não seriam detectadas pelos métodos sorológicos habituais, pois estariam neutralizados pelo anti-HBsAg, em forma de imunocomplexos. A identificação do HBsAg e HBcAg em tecido hepático foi possível por técnica de imunohistoquímica em cerca de dois terços de indivíduos com sorologia compatível com infecção pregressa pelo VHB, corroborando, do ponto de vista também histológico, com a hipótese da síntese protéica ativa de antígenos estruturais⁽¹¹⁸⁾.

A replicação residual seria essencial para a manutenção da imunidade específica e duradoura contra o VHB em pacientes com infecção dita resolvida e auto-limitada. Desta forma, a imunoproteção resultaria da ação de anticorpos neutralizadores aliados à presença de traços do VHB, necessários para a conservação da imunidade humoral e celular específica, contrastando com a idéia de que apenas a persistência de células de memória T e B seriam suficientes para a construção de uma resposta altamente efetiva frente à re-exposição ao VHB⁽¹²²⁾. Zerbini et al.⁽¹²³⁾ estudando *in vitro* e *ex vivo* células T de pacientes anti-HBcAg (+), com ou sem VHB-DNA detectado em fígado, demonstraram que a magnitude da resposta imune foi compatível entre esses dois grupos, fortalecendo a hipótese de que indivíduos anti-HBcAg (+), independente da detectabilidade do VHB-DNA intrahepático, representam uma mesma entidade biológica correspondente a uma infecção pelo VHB resolvida, embora com uma eficiência variável do controle da replicação viral, através da maturação e manutenção altamente eficiente das células T de memória. Essa hipótese ganha plausibilidade uma vez que a terapia antiviral eficaz em pacientes cronicamente infectados promove a redução da reposta de linfócitos T de maneira significativa num período de 3 a 5 anos⁽³⁰⁾.

De fato, os mecanismos imunológicos atuam prevenindo a reativação efetiva do VHB, como em um equilíbrio dinâmico entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro. Assim, o repertório de cccDNA poderia, ao menos teoricamente, ser reduzido por mecanismo citolítico, no qual a célula infectada seria destruída e substituída por outra de uma linhagem não infectada⁽¹⁰⁷⁾. O mecanismo não citolítico também agiria através do controle da replicação viral pela ação de

citoquinas (TNF α e INF- γ), capazes de inibir fortemente a expressão genômica do VHB em um nível pós-transcrição^(101,114,115).

Desta forma, as fases aguda e crônica da infecção pelo VHB seriam extremos de um mesmo processo, diretamente influenciados pelo grau de eficácia da resposta imune celular^(114,119).

Portanto, a infecção persistente, sorologicamente silenciosa (HBsAg indetectável) seria uma consequência natural da infecção aguda resolvida. A este fenômeno convencionou-se denominar hepatite B oculta.

2.5. Hepatite B oculta

O conceito de hepatite B oculta, atualmente definido como a presença do genoma do VHB no tecido hepático e eventualmente em células linfomononucleares de sangue periférico e soro, em indivíduos soronegativos para o HBsAg, começou a ser explorado no final da década de 1980, sendo melhor caracterizado durante os anos de 1990 e 2000, com o advento de técnicas de biologia molecular altamente sensíveis^(114,122).

Esse tipo de infecção não tem sido associado somente a indivíduos que resolveram infecção aguda ou que responderam ao tratamento medicamentoso de infecção crônica, mas também a pacientes com hepatocarcinoma de origem indefinida, hepatite C crônica, hepatite criptogénica, indivíduos submetidos à hemodiálise, múltiplas transfusões (hemofílicos) e usuários de drogas intravenosas⁽¹¹⁸⁾.

Tabela 2 - Pacientes candidatos ao diagnóstico de infecção oculta pelo VHB

<i>Enzimas hepáticas alteradas com etiologia desconhecida (sorologias negativas)</i>	<i>Enzimas hepáticas normais</i>
Hepatite criptogénica Usuário de drogas ilícitas intravenosas Hemofílicos Paciente em hemodiálise Portadores de hepatite C crônica que responderam ao tratamento antiviral	Infecção pelo VHB resolvida

Adaptado de Carreño et al., 2008⁽¹²²⁾

A infecção oculta não é capaz de produzir HBsAg detectável por métodos sorológicos habituais. Uma das possíveis hipóteses diz respeito à heterogenicidade genômica do VHB, ou seja, à presença de mutações capazes de modificar a síntese da proteína S (*loop* hidrofílico ou mutação no determinante a do HBsAg na posição 145), impedindo sua detecção pela maioria dos testes de sorologia, ou por mutações capazes de inibir a expressão do gene S (região pré-S1/S2) ou mesmo a replicação viral^(105,106,122,124). Contudo, a presença dessas mutações não se aplica à maioria dos casos descritos. De fato, estas situações foram identificadas em populações específicas do Mediterrâneo.

O que parece ocorrer é a forte supressão imunológica da expressão genômica e conseqüentemente da replicação do VHB, fenômeno comprovado através da demonstração da manutenção da resposta vigorosa por parte de células T de memória específicas e pela reativação e reversão sorológica da infecção em situações de imunodepressão^(114,122,123).

Outra possível explicação relaciona-se a possibilidade das partículas virais circularem sob a forma de imunocomplexos estáveis. Contudo, um estudo falhou ao comprovar a presença dos mesmos no soro de pacientes que apresentavam o VHB-DNA detectável. Em ocasiões menos comuns, a falha na detecção do HBsAg e mesmo do anti-HBcAg deve-se a presença de imunossupressão associada a infecção pelo HIV ou após transplante⁽¹²²⁾.

A supressão da expressão do HBsAg é acompanhada por níveis reduzidos ou indetectáveis do VHB-DNA (geralmente abaixo de 100 cópias / mL)⁽¹¹⁹⁾. Todavia, o fato destes indivíduos apresentarem uma viremia residual não necessariamente implica em um menor quantidade de genoma viral no tecido hepático⁽¹²⁵⁾.

Mulrooney-Cousins e Michalak⁽¹¹⁹⁾ propuseram a distinção de infecção oculta em primária e secundária, através da observação de modelos animais. A infecção secundária seria considerada o habitual, na qual o vírus manteria seu tropismo por células hepáticas. A infecção primária seria aquela produzida por um baixo inóculo (abaixo de 1000 cópias / mL), que culminaria essencialmente em uma infecção do sistema linfático, embora o comprometimento hepatocelular fosse possível. O hospedeiro, bem como na infecção secundária, desenvolveria resposta celular do tipo T específica, contudo não seria capaz de sintetizar marcadores imunossorológicos de infecção. Não foram detectadas alterações hepáticas nesse tipo de infecção. Todavia, os indivíduos analisados foram considerados susceptíveis a nova infecção pelo VHB quando submetidos à reexposição.

Recentemente, mecanismos epigenéticos tem sido estudados quanto a possível regulação da replicação e transcrição do cccDNA, uma vez que este intermediário é organizado como um microssomo, sendo assim subjugado a atividade enzimática

atuante no processo de remodelação da cromatina, via ação de metilases e deacetilases. Neste contexto, a supressão viral poderia ser resultante de modificações funcionais e potencialmente reversíveis do ambiente intracelular, desencadeado por agentes co-infectantes (ex: VHC), químicos ou citocinas⁽¹¹⁴⁾.

Vivekanandan et al.⁽¹²⁶⁾ demonstraram a presença de múltiplas deleções e mutações através do sequenciamento do genoma viral isolado de cinco pacientes com infecção oculta pelo VHB, mas que foram semelhantes aquelas encontradas na infecção evidente pelo VHB. Porém, padrões de metilação diferiram entre esses dois grupos, não permitindo ainda uma clara definição causal.

Quanto ao aspecto clínico, como mencionado anteriormente, apesar de poucos estudos prospectivos disponíveis sobre o impacto histológico da hepatite aguda autolimitada em humanos, a permanência do VHB-DNA hepático pode estar correlacionada a uma atividade inflamatória leve e contínua capaz de contribuir para a progressão da fibrose em situações especiais⁽¹²²⁾.

Em relação ao desenvolvimento do hepatocarcinoma, alguns estudos, tanto em humanos quanto em modelos animais, tem demonstrado o efeito pró oncogênico do VHB residual de maneira semelhante à infecção HBsAg evidente^(114,119,122,127). Por exemplo, Pollicino et al.⁽¹²⁸⁾ detectaram o DNA viral, tanto em forma integrada como covalente (cccDNA), mantendo atividade replicativa em 63,5% de 107 casos avaliados de pacientes com hepatite C que desenvolveram hepatocarcinoma. Raimondo et al.⁽¹¹⁴⁾ demonstraram o VHB-DNA em 63,5% dos casos de hepatocarcinoma versus 32,8% em portadores de hepatopatia crônica ($p < 0.0001$; OR de 3,6). Squadrito et al.⁽¹²⁹⁾ detectaram o material genético do VHB no tecido hepático em oito de nove pacientes que desenvolveram hepatocarcinoma ($p = 0.002$).

No nosso meio, Alencar et al.⁽¹³⁰⁾ encontraram resultados divergentes, uma vez que em estudo do soro e tecido hepático obtido de 17 pacientes portadores de hepatite C crônica submetidos a transplante hepático, somente uma amostra de soro resultou positiva para o VHB-DNA, embora os autores discutam a influência do tamanho do fragmento hepático estudado e a forma de conservação do mesmo (em parafina) na sensibilidade do teste empregado.

2.6. Influência da infecção pelo VHB na história natural da hepatite C crônica

2.6.1. Co-infecção entre os vírus da hepatite B e C

A co-infecção crônica pelo VHB e VHC não é incomum, dado o compartilhamento por ambos de vias semelhantes de transmissão. Os dados de prevalência da nossa área geográfica ainda são escassos e pouco exatos. Outros inquéritos envolvendo pacientes portadores de infecção crônica pelo VHB demonstraram prevalências de infecção dupla em torno de 10-15 %⁽¹⁰⁾.

Do ponto de vista cronológico, esta modalidade de infecção pode se dar de duas maneiras: simultaneamente, quando o indivíduo é inoculado com os dois agentes em um mesmo momento; ou por superinfecção, quando um indivíduo previamente infectado pelo VHC acaba por adquirir o VHB, ou vice-versa. Neste caso, o vírus subjacente é capaz de promover hepatite fulminante^(10,99).

Na co-infecção, um vírus exerce papel de dominância sobre o outro. Essa definição hierárquica resulta da somatória de características dos próprios vírus com a qualidade da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Assim, a interação viral

acaba sendo influenciada diretamente pela seqüência cronológica da infecção, pelo status replicativo e pela presença de mutações no genoma viral⁽²⁾.

Todavia, a dominância do VHC sobre o VHB parece ser mais freqüente. Essa conclusão foi baseada em estudos que demonstraram a detecção de níveis reduzidos de VHB-DNA no soro destes pacientes co-infectados, além de uma menor atividade da polimerase viral e ausência dos antígenos HBsAg e HBcAg em tecido hepático, identificados por técnicas de imunohistoquímica⁽¹⁰⁾.

As proteínas do core e NS2 do VHC parecem ser capazes de inibir a síntese de novas partículas do VHB. A proteína do core é considerada um modulador da transcrição viral do gene do VHB. Esta é capaz de se ligar e inibir a ação da proteína X (HBx), necessária para a ativação da transcrição do VHB e fazer o mesmo com a sua polimerase. Do ponto de vista estrutural, possui três sítios com ação sinalizadora na sua porção N-terminal (nuclear localization signals ou NLS). Como esta proteína viral é restrita ao citoplasma celular, assume-se que estes sítios interajam com receptores nucleares (NR) neste local, impedindo que os mesmos se liguem a regiões ativadoras (*Enhancer*) no genoma do VHB, necessárias para a transcrição do RNA pré-genômico (pgRNA) e dos genes core e X do VHB⁽²⁾. Além disso, o core também é capaz de suprimir a replicação do VHB através da inibição do processo de encapsulamento do pgRNA, vital para a síntese do rcDNA via ação da transcriptase reversa⁽²⁾. Já a proteína NS2 parece interferir na atividade de fatores de transcrição celular essenciais para ativação dos genes promotores do VHB⁽¹³¹⁾.

Por outro lado, alguns autores sugerem a inibição do VHC pelo VHB, baseados em achados que correlacionaram a replicação ativa do VHB com uma menor carga viral do VHC ou mesmo com a indetectabilidade do mesmo^(10,132,133).

Pontisso et al.⁽¹³⁴⁾ identificaram uma taxa de eliminação maior deste vírus (VHC-RNA) nos co-infectados do que em monoinfectados (71% versus 14%). Ainda, há a possibilidade da interferência simultânea de ambos os vírus, uma vez que um estudo demonstrou que ambas as cargas virais eram relativamente mais baixas quando comparadas as de monoinfectados pelo VHB e VHC⁽¹³⁵⁾. Portanto, três situações são efetivamente possíveis na co-infecção B e C, configurando um modelo dinâmico, ou seja, com capacidade de alternância das dominâncias⁽¹⁰⁾.

2.6.2. Infecção progressa pelo VHB em portadores de infecção crônica pelo VHC

A prevalência do marcador sorológico de contato do VHB (anti-HBcAg) em pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC é alta. No passado, considerava-se que o VHB-DNA tinha sido eliminado totalmente pelo hospedeiro. Todavia, como revisto anteriormente, métodos de detecção molecular altamente sensíveis têm demonstrado a persistência do genoma viral em uma significativa proporção de indivíduos com hepatite B resolvida, especialmente naqueles com infecção crônica pelo VHC^(129,136).

Neste cenário, a resposta imune dirigida contra o vírus suprimido poderia contribuir para prejudicar o curso evolutivo da doença hepática provocada pelo VHC⁽¹¹⁴⁾. Entretanto, o impacto clínico dessa “infecção silenciosa” em pacientes com hepatite C crônica ainda permanece incerto, de forma que esta modalidade de infecção tem sido associada à doença ativa progressiva e cirrose, atuando como fator complicador do prognóstico^(122,133,137). Outros estudos sugerem inclusive que a

resposta terapêutica ao interferon, em especial a taxa de resposta sustentada, seria menor nesses pacientes^(133,138,139). Os mecanismos promotores desta menor resposta ainda não foram totalmente compreendidos. Especula-se sobre o papel da interferência viral em proteínas celulares com atividade antiviral e a redução da expressão intrahepática de receptores para o interferon⁽²⁸⁾. Por outro lado, alguns estudos falharam ao demonstrar a infecção pregressa pelo VHB neste grupo de paciente como fator determinante de diferenças clínicas, bioquímicas e histológicas em relação ao grupo de monoinfectados pelo VHC^(136,140).

Sabe-se que tanto o VHB quanto o VHC podem coexistir em um mesmo hepatócito. Rodriguez-Íñigo et al.⁽¹⁴¹⁾ demonstraram, por técnica de hibridização *in situ* em amostras hepáticas de seis pacientes, a presença de células contendo o VHB, VHC e ambos. Contudo, a imunobiologia da interação viral que se desenvolve em uma mesma célula ainda não foi estudada em detalhes⁽¹¹⁴⁾. Desta maneira, ainda é questionável se a presença do VHB é capaz de restaurar a resposta T citotóxica específica contra o VHC ou mesmo se as citocinas (INF- γ e TNF- α) secretadas mediante estímulo do VHB contribuem para o controle do VHC, ou vice-versa^(122,123).

Quanto ao desenvolvimento de hepatocarcinoma, diversos estudos demonstraram o impacto negativo da infecção pregressa pelo VHB (anti-HBcAg) no desenvolvimento desta neoplasia^(129,142,143). Ikeda et al.⁽¹⁴²⁾, através do acompanhamento prospectivo de uma coorte de 846 pacientes – 275 cirróticos – com hepatite C crônica, demonstraram que o anticorpo contra o antígeno do core (anti-HBcAg) foi considerado fator de risco independente para o desenvolvimento de hepatocarcinoma. Squadrito et al.⁽¹²⁹⁾, avaliando biopsias hepáticas de 135 pacientes com VHB-DNA detectável em tecido hepático, observaram uma maior prevalência de

cirrose neste grupo ($p=0,01$). Destes, 53 pacientes foram acompanhados por um mínimo de 50 meses, sendo que no período 8 indivíduos desenvolveram neoplasia hepática ($p=0,002$). No Brasil, um estudo realizado no Rio Grande do Sul demonstrou a presença do VHB, por imunohistoquímica, em 19,5% dos pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC e em 77,7% dos mesmos que desenvolveram hepatocarcinoma⁽¹⁴⁴⁾.

Desta forma, é bem possível que a presença do VHB-DNA, integrada ao genoma do hospedeiro, mantenha suas propriedades pró-oncogênicas através da transcrição de diversos peptídeos como a proteína X, da mesma maneira da infecção típica HBsAg (+), aliado ao papel indireto exercido por uma atividade necroinflamatória persistente e aditiva àquela desencadeada pelo VHC que, ao menos teoricamente, poderia contribuir para o desenvolvimento de cirrose^(122,128).

Quanto a este tema, a heterogenicidade dos estudos científicos disponíveis contribui em grande parte para a atual ausência de conclusões. Sendo assim, ainda não está claro se a persistência residual do VHB poderia de algum modo influenciar no grau de lesão hepática ou mesmo promover maior incidência de complicações em pacientes portadores de hepatite C crônica⁽¹¹⁸⁾.

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Vários estudos têm fornecido evidências cada vez mais fortes sobre a persistência da replicação viral residual do VHB, mesmo em pacientes com infecção pregressa e resolvida por este vírus.

Em indivíduos mono infectados e imunocompetentes, este fato aparentemente não repercute do ponto de vista clínico. Entretanto, os pacientes portadores de hepatite C crônica estão submetidos constantemente a uma atividade pró-inflamatória, de forma que a soma da resposta imune supressora da replicação residual do VHB poderia acentuar a lesão hepática destes indivíduos.

Portanto, é necessário que haja a contribuição de mais estudos como tentativa de esclarecimento da real influência da infecção pregressa pelo VHB na história natural da hepatite C crônica. É fundamental que os mesmos sejam realizados em regiões de baixa endemicidade para o VHB, adequando os achados disponíveis atualmente ao perfil da nossa população.

OBJETIVOS

1. Retratar as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais encontradas em pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus da hepatite B;
2. Avaliar a associação entre a infecção pregressa pelo vírus da hepatite B nos portadores de hepatite C crônica e o dano histológico hepático, dentro de sua história natural;
3. Identificar possíveis fatores preditores de fibrose hepática avançada.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Definições

Definiu-se infecção crônica pelo vírus C como aquela de ocorrência em indivíduos com viremia detectável (VHC-RNA), através de técnica de biologia molecular (reação em Cadeia pela Polimerase), por um período igual ou maior que seis meses.

Foram considerados indivíduos com história progressiva de infecção pelo vírus B todos aqueles que apresentaram os marcadores sorológicos anti-HBcAg presente, HBsAg ausente e o anti-HBsAg detectável ou não.

2. Tipo de delineamento

O estudo realizado foi do tipo transversal e foram revistos retrospectivamente prontuários de pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da FMUSP, no período compreendido entre 01/01/2006 a 31/12/2006.

3. Local do estudo

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo é uma instituição terciária de assistência, ensino e pesquisa considerada maior da América Latina e de referência não só em seu estado, mas também em todo território brasileiro.

O atendimento aos portadores de hepatite C é voltado principalmente aos pacientes provenientes do município de São Paulo. Ao todo, três principais departamentos acolhem essa demanda: o Serviço de Gastroenterologia Clínica; o Serviço de Cirurgia Experimental / Grupo de Fígado e o Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

O Ambulatório de Hepatites Virais do DMIP, ativo desde 1987, assiste número considerável de pacientes portadores dessa infecção dentro da dinâmica hospitalar, com cerca de 4.000 indivíduos matriculados e média de 800 consultas anuais. O atendimento é feito por médicos assistentes, pós-graduandos e residentes em Infectologia.

4. Indivíduos em estudo

Os pacientes atendidos em sua grande maioria foram referenciados a partir de serviços de Bancos de Sangue, especialmente do Pró-sangue Hemocentro de São Paulo, unidade ligada ao Hospital das Clínicas. Obrigatoriamente, esses serviços realizam a triagem sorológica para infecção pelo vírus HIV, HTLV 1/2, vírus da hepatite B (pesquisa do anticorpo contra antígeno do core – anti-HBcAg e do

antígeno de superfície – HBsAg), infecção pelo *Treponema pallidum* e *Trypanossoma cruzi* além da dosagem de alaninoaminotransferase (ALT).

Os candidatos a doação soropositivos para hepatite C são aconselhados a procurar atendimento médico em um dos serviços credenciados do HC-FMUSP. O ambulatório recebe também pacientes provenientes de outros departamentos do próprio hospital e de serviços externos, quando o paciente reside em área de cobertura de acordo com o mapa de atendimento da Secretaria de Saúde do Município de São Paulo.

5. Dinâmica do atendimento ambulatorial

O acompanhamento dos pacientes segue a rotina de condutas relativas ao manejo clínico e tratamento preconizada pelo Programa Nacional de Hepatites Virais⁽¹⁴⁵⁾.

Na primeira consulta, obtém-se uma anamnese onde todos os dados clínicos pertinentes são investigados, além do histórico epidemiológico e laboratorial quando disponível. É realizado exame físico de abordagem, seguido pela solicitação de exames complementares, geralmente análise hematológica e bioquímica de sangue, pesquisa viral através de técnicas de biologia molecular (VHC-RNA qualitativo), investigação radiológica (ultra-sonografia abdominal e endoscopia digestiva alta) e anatomopatológica (biópsia hepática), podendo ser individualizada de acordo com as necessidades do momento.

Segundo os resultados disponíveis, em especial sobre os critérios histológicos, é optado pelo acompanhamento clínico laboratorial periódico ou pelo

tratamento, utilizando-se interferon- α (peguilado ou convencional) associado ou não a ribavirina. Portanto, o número de retornos e conseqüentemente a quantidade de exames solicitados são bastante variáveis.

6. Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais de bioquímica sanguínea como dosagem de enzimas hepáticas e canaliculares, bilirrubinas, análise de função hepática e renal, bem como as sorologias para doenças infecciosas, exames de autoimunidade e hematológicos foram realizados pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas FMUSP, através de metodologia automatizada.

Quanto ao diagnóstico sorológico da hepatite C, utilizou-se teste imunoenzimático de segunda e terceira geração (*Abbott[®] HCV EIA 2.0 e 3.0*) para rastreamento, sendo que alguns resultados inconclusivos foram submetidos a teste suplementar por técnica de imunoblot (RIBA) através da visualização das frações antigênicas, o que confere maior especificidade⁽⁵⁴⁾.

Quanto a hepatite B, foi realizada a detecção qualitativa dos anticorpos totais contra o antígeno do core (anti-HBcAg total) através de ensaio imunoenzimático (MEIA competitivo) baseado em micropartículas (*Abbott[®] Laboratories Diagnostics Division*), teste semi quantitativo para a detecção do antígeno de superfície (HBsAg) (*Abbott[®] Laboratories Diagnostics Division*) e teste imunoenzimático qualitativo e quantitativo do anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite B (anti-HBsAg) (*Abbott[®] Laboratories Diagnostics Division*). Este último foi quantificado através de uma curva padrão do calibrador com capacidade de detecção de

concentrações variando entre zero e 1000 UI/mL, sendo considerado reagente quando os valores obtidos ultrapassaram 10 UI/mL. Na pesquisa do anti-HBcAg, o resultado obtido foi considerado reagente quando o índice S/CO da amostra foi menor ou igual a 1,0. Em relação à detecção do HBsAg, a amostra foi considerada reagente quando seu índice S/CO foi maior ou igual a 1,0.

7. Detecção viral através de técnica de biologia molecular

Todos pacientes com sorologia positiva para o VHC são submetidos à testagem molecular para pesquisa do material genético viral, visando a comprovação de viremia. A *Nested* PCR para o VHC foi realizada no Laboratório de Hepatites Virais (LIM-47) do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A descrição deste processo, bem como da detecção genótipica do VHC, encontra-se no ANEXO A.

8. Análise do fragmento hepático

Os portadores de infecção crônica pelo VHC devem ser submetidos à biópsia hepática para avaliação do real dano hepático, de acordo com a normatização vigente⁽¹⁴⁵⁾. Constitui exceção os casos que não se enquadram nos critérios de segurança para a realização do mesmo, como os portadores de discrasias sanguíneas (ex: hemofilias), de infecções intra-abdominais, de tumores hepáticos vasculares; pacientes com tempo de protrombina 3 a 5 segundos acima do valor de controle (ou

menor que 60%), com plaquetopenia (contagem abaixo de 50.000 / mm³), com tempo de sangramento maior que 10 minutos e com histórico de uso – 7 a 10 dias antes – de medicações capazes de alterar a hemostasia (ex: AAS)⁽¹⁴⁶⁾.

Nos indivíduos estudados, o procedimento foi realizado através de punção percutânea guiada por ultra-sonografia, em hospital-dia, utilizando-se agulhas especiais do tipo TruCut. No Departamento de Anatomia Patologia do Hospital das Clínicas, a amostra colhida e posteriormente fixada em formol a 10% foi emblocada, submetida à microtomia e corada com hematoxilina-eosina, tricômio de Masson ou pelos métodos de Perls e Gomori para detecção de ferro e fibras de reticulina. Este Departamento considera a amostra histológica como representativa aquela que contém no mínimo 10 espaços porta, tendo como hábito descrever em laudo se a mesma foi considerada insatisfatória ou não para análise^(147,148).

A classificação histopatológica foi baseada na proposta formulada por Gayotto, adotada pelo Consenso Nacional sobre a Classificação das Hepatites Crônicas das Sociedades Brasileiras de Patologia / Hepatologia⁽¹⁴⁹⁾.

Trata-se de uma classificação semiquantitativa padronizada na qual o estadiamento é dado pela variável alteração estrutural (valores de 0 a 4) e a atividade necroinflamatória é dada pela análise de três variáveis em conjunto – infiltrado inflamatório portal, atividade peri-portal / peri-septal e atividade parenquimatosa (valores de 0 a 4 atribuídos a cada uma).

Alterações estruturais:

- 0 Nenhum dano significativo a arquitetura lobular;
- 1 Expansão fibrosa dos espaços-porta;
- 2 Expansão fibrosa portal com septos porta-porta;
- 3 Preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e centro-porta, podendo ser vistos ocasionais esboços de nódulos;
- 4 Cirrose, plenamente identificada ou transformação nodular parcial, com predomínio de áreas nodulares em relação a lóbulos remanescentes.

Infiltrado inflamatório portal:

- 0 Linfócitos portais em quantidade habitual;
- 1 Aumento discreto do número de linfócitos portais;
- 2 Aumento moderado do número de linfócitos portais;
- 3 Aumento acentuado do número de linfócitos portais;
- 4 Aumento muito acentuado do número de linfócitos portais.

Atividade peri-portal / peri-septal:

- 0 Ausência de lesões da interface espaço-porta / parênquima;
- 1 Extravasamento de linfócitos para a interface (spill-over), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados;

- 2 Necrose em saca-bocados discreta (pequenas áreas em poucos espaços-porta);
- 3 Necrose em saca-bocados moderada (extensas áreas em poucos espaços-porta ou pequenos focos em muitos espaços-porta);
- 4 Necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços-porta.

Atividade parenquimatosa:

- 0 Hepatócitos normais, isomorfos;
- 1 Alterações discretas de hepatócitos, incluindo tumefação ou retração acidofílica, eventualmente acompanhada de infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose;
- 2 Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios;
- 3 Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente;
- 4 Necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios, associada a necrose confluyente extensa / múltipla.

A análise histológica compreende, em conjunto, a pesquisa de marcadores etiológicos, citando: agregados ou folículos linfóides portais, agressão ao epitélio de ductos biliares, esteatose e componente necro-inflamatório lobular como indicativos

de infecção pelo VHC⁽²¹⁾. Já hepatócitos hialinizados (“*ground-glass*”), núcleos pálidos e granuloso (“*sanded nuclei*”) e anisonucleose são sugestivos de infecção pelo VHB⁽⁹⁹⁾. Infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico, necrose confluyente e transformação acinar sugerem hepatite auto-imune⁽¹⁵⁰⁾. Hepatócitos periportais com núcleos vacuolizados, lipofucsina, corpúsculos de Mallory e depósito de cobre sugerem Doença de Wilson^(21,99,149).

A pesquisa de pigmentos pode revelar bile, lipofucsina e hemossiderina.

A esteatose hepática é classificada de acordo com o grau de infiltração, em porcentagem, dos hepatócitos presentes na amostra avaliada:

Grau 1: esteatose em até 33 % dos hepatócitos;

Grau 2: esteatose de 33 a 66 % dos hepatócitos;

Grau 3: esteatose em mais de 66 % dos hepatócitos

9. Amostragem

Após contato com o Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME HC-FMUSP), obteve-se uma lista com o nome, número do registro de matrícula e data de nascimento de todos pacientes atendidos pelas unidades pertencentes ao Grupo de Hepatites da Divisão de Clínicas de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, durante o tempo estabelecido.

Como esses indivíduos são acompanhados periodicamente, com média de uma a três consultas anuais, a escolha desse período (ano 2006) torna-se adequada, pois permite uma amostragem representativa da população cujo atendimento encontra-se em atividade, reduzindo assim a probabilidade de perda de informações

pertinentes e conseqüentemente a descrição insatisfatória da distribuição das variáveis em estudo.

10. Seleção de pacientes

Com base na primeira lista fornecida pelo SAME HC-FMUSP, foram aplicados os seguintes critérios de seleção. Com isso, foi possível uma triagem dos indivíduos de interesse, primeiramente por via eletrônica através do acesso a rede interna do hospital (HCNET), para posterior análise, agora através da revisão física dos prontuários médicos.

1. Critérios de inclusão:

- 1.1. Idade superior a 18 anos;
- 1.2. Infecção crônica pelo vírus da hepatite C;
- 1.3. Sorologia conhecida para hepatite B (ao menos anti-HBcAg, HBsAg e anti-HBsAg);
- 1.4. Histórico epidemiológico e exames laboratoriais disponíveis: hemograma, dosagem de plaquetas, bioquímica de sangue e avaliação de função hepática;
- 1.5. Presença da análise anatomopatológica hepática, considerada satisfatória pelo Departamento de Anatomia Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP

2. Critérios de exclusão:

- 2.1. Infecção pelo vírus HIV;
- 2.2. Infecção evidente pelo vírus B (portadores de sorologia positiva para HBsAg);
- 2.3. Hepatite auto-imune;
- 2.4. Doenças hepáticas metabólicas (Doença de Wilson, Deficiência de alfa 1 antitripsina, hemocromatose)

Ressalta-se que quanto aos itens 2.3 e 2.4, as informações coletadas foram baseadas em relatos transcritos no prontuário médico, não sendo realizada busca ativa, por exemplo, em exames laboratoriais como dosagem de auto-anticorpos.

11. Instrumento

Um questionário foi formulado visando coletar informações capazes de responder as principais questões do estudo (vide ANEXO B), baseadas em variáveis definidas previamente. Até a sua versão final, considerada a mais adequada, vários modelos foram desenvolvidos como tentativa de se reduzir ao máximo a ocorrência de erros, permitindo assim a validade dos resultados obtidos.

Tais fichas foram preenchidas pelo próprio autor, a partir de dados obtidos da análise de prontuários. A grande maioria das informações referentes aos aspectos clínicos e epidemiológicos, incluindo aquelas relacionadas a potenciais fatores modificadores da história natural da infecção como etilismo e tabagismo, foi obtida a

partir da anamnese de admissão do serviço, portanto antes da realização da biópsia hepática.

Em relação às informações sorológicas referentes ao VHB, deu-se preferência àquelas obtidas logo ou justa a admissão, pelo menos antes da realização da biópsia hepática. Igualmente, considerou-se o registro da situação sorológica descrita antes de uma possível interferência vacinal como fator modificador da presença ou não do anti-HBsAg.

Nos casos onde os pacientes tenham sido submetidos à terapia baseada em interferon, foram registradas as informações laboratoriais obtidas anteriormente à mesma, a fim de se evitar sua eventual interferência na história natural da doença.

11.1. Dados coletados

1. Identificação:

- a. Iniciais do nome próprio;
- b. Registro de matrícula do paciente no HC-FMUSP

2. Informações demográficas:

- a. Sexo;
- b. Data de nascimento

3. Comorbidades:

- a. Presença de hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, infecção pelo HTLV e outras patologias presentes simultaneamente à infecção em estudo ou capazes de influenciar a evolução clínica da doença

4. Aquisição da infecção pelo VHC:

- a. Ano da primeira sorologia positiva;
- b. Ano provável da infecção de acordo com os fatores de risco em potencial (ex: data de realização de hemotransfusão)

5. Perfil sorológico do VHB:

- a. Presença do anti-HBcAg e anti-HBsAg.
- b. Leitura do teste anti-HBcAg (relação S/CO)
- c. Histórico vacinal para VHB se disponível

6. Fatores de risco em potencial para a aquisição do VHC:

- a. Transfusão de sangue e/ou hemocomponentes, acompanhada da data de realização;
- b. Cirurgia ou procedimento invasivo, acompanhada da data de realização;
- c. Uso de droga inalatória, pregresso ou atual;

- d. Uso de droga injetável, pregresso ou atual;
- e. Realização de tatuagem e/ou “piercing”;
- f. Contato sexual de risco, definido como múltiplas exposições sem uso de preservativo ou exposição a indivíduo sabidamente portador do VHC;
- g. Exposição ocupacional a sangue ou hemoderivados;
- h. Contato intradomiciliar com portador de VHC

7. Fatores modificadores da história natural:

- a. **Etilismo:** uso atual ou pregresso. Discriminado em:
 - Leve-moderado: ingestão menor que 40 g de etanol por dia para homens e 20 g / dia para mulheres;
 - Acentuado: ingestão maior que 40 g dia para homens e 20 g / dia para mulheres;
 - Indeterminado.

O etilismo social, definido como a ingestão menor que 40 g de etanol por semana para homens e menor que 10 g por semana para mulheres, não foi registrado⁽⁷⁶⁾. Para a decodificação da quantidade de álcool ingerido, foi utilizada a seguinte tabela:

Tabela 3 - Correspondência entre o tipo de bebida consumida e conteúdo alcoólico

<i>Bebidas</i>	<i>Concentração de álcool / gramas de álcool</i>
1 lata de cerveja - 350 ml	5% = 17 gramas de álcool
1 dose de aguardente - 50 ml	50% = 25 gramas de álcool
1 copo de chope - 200 ml	5% = 10 gramas de álcool
1 copo de vinho – 90 ml	12% = 10 gramas de álcool
1 garrafa de vinho - 750 ml	12% = 80 gramas de álcool
1 dose de destilados (uísque, aguardente, vodca) – 50 ml	40%-50% = 20g - 25g de álcool
1 garrafa de destilados - 750 ml	40%-50% = 300g-370 gramas de álcool

FONTE: Berenstein, 2007⁽¹⁵¹⁾

b. **Tabagismo:** atual ou pregresso, categorizado em “anos / maço”, ou seja, o produto do número de maços de cigarro utilizados por dia e o tempo de uso em anos. Classificado em⁽¹⁵²⁾:

- Leve-moderado: até 20 anos / maço;
- Acentuado: acima de 20 anos / maço;
- Indeterminado

8. Exames laboratoriais:

- a. Leucograma;
- b. Contagem de plaquetas;
- c. Dosagem de aspartatoaminotransferase e alaninoaminotransferase (AST, ALT), em U/L a 37 C;
- d. Fosfatase alcalina e gamaglutiltransferase, em U/L a 37 C;

- e. Bilirrubinas totais e frações (direta e indireta), em mg/dL;
- f. Proteínas totais e albumina, em g/dL;
- g. Tempo de atividade de protrombina (equivalente em porcentagem) e INR (Índice Internacional Normalizado)

Estas variáveis foram registradas em dois momentos distintos, separadas por um intervalo mínimo de três meses, devido às flutuações habituais que as mesmas apresentam. Considerou-se, para efeito de análise, a média aritmética desses valores, tentando-se desta maneira aumentar a precisão dos dados em relação à representatividade dos fenômenos observados.

9. Análise de fragmento hepático:

Foram registradas a data de realização do procedimento e a pontuação recebida nos itens: alteração estrutural, infiltrado inflamatório portal, atividade periportal e atividade parenquimatosa.

Considerou-se também a graduação da esteatose, bem como marcadores etiológicos, quando presentes.

12. Cálculo da taxa de progressão de fibrose

Em 1997, Poynard et al.⁽⁷⁶⁾ sugeriram um modelo para a estimativa de velocidade de ocorrência do dano hepático, secundário a ação do VHC. Este consistia no cálculo da razão entre a alteração estrutural descrita na análise

anatomopatológica e a duração da infecção, em anos, relativa à data da primeira biópsia a partir da época provável de infecção (ex: data de realização de hemotransfusão).

A taxa obtida foi expressa em unidades de fibrose / ano, assumindo que a progressão ocorre de maneira constante. Somente os casos graduados de 1 a 3 foram considerados para o cálculo, uma vez que a cirrose (alteração estrutural grau 4) poderia estar presente por tempo prolongado antes da realização da biópsia.

13. Análise estatística

Os dados colhidos foram codificados e digitados em banco de dados, onde tiveram sua consistência averiguada.

Essas variáveis foram primeiramente submetidas à análise univariada, sendo que os indivíduos em estudo foram classificados de acordo com o status sorológico do anti-HBcAg (presente ou ausente).

Os dados nominais e ordinais foram descritos através de suas frequências absolutas e relativas. Os dados contínuos tiveram suas médias e medianas calculadas como medidas de tendência central, juntamente com os respectivos desvios-padrão como medidas de dispersão, além da determinação de seus valores mínimos e máximos.

Como provas de significância estatística para comparação de proporções, foram utilizados os testes do qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher, quando valores esperados foram abaixo de cinco. Também foram calculadas as medidas de associações na análise bivariada, utilizando-se as razões de chance (Odds ratio) como

estimativa dos riscos relativos e seus respectivos intervalos de confiança a 95%. Algumas variáveis ordinais e contínuas, para efeito de análise, foram categorizadas em dois ou mais grupos de mesmo intervalo, permitindo o reconhecimento das freqüências de cada um. Além disso, o agrupamento das variáveis histopatológicas possibilitou minimizar as possíveis variações intra e interobservador decorrentes da análise do fragmento hepático.

A duração da infecção relativa à data da biópsia e a taxa de progressão de fibrose, expressadas através de suas médias, medianas e intervalos interquartis, foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para a avaliação de possíveis preditores de fibrose hepática acentuada (variável dependente), correspondente a alteração estrutural 3 e 4 no exame histopatológico, realizou-se análise estatística por Regressão Logística não-condicional univariada, num primeiro momento. As variáveis que apresentaram $p < 0,20$ foram incluídas na análise multivariada, realizada através do modelo de Regressão Logística seqüencial, para o controle de seus possíveis efeitos interferentes (confundimento ou interação).

Os valores calculados para o “p” foram bicaudados, sendo considerado o valor menor que 0,05 estatisticamente significativo.

Para a construção do banco de dados foi utilizado o software Epidata versão 3.1 (*EpiDATA Association, 2001*). A análise dos dados foi realizada com o software SPSS versão 15.0 (*SPSS Inc, 2006*).

14. Aspectos éticos

Como o estudo foi descritivo, retrospectivo e baseado na obtenção de dados provenientes de prontuários, não foi solicitada aos indivíduos elegíveis a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação no protocolo. Porém, as informações foram coletadas por profissionais da área médica, sob sigilo e com respeito ao anonimato, de acordo com a conduta preconizada pelo Código de Ética Médica. O seguinte projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, sendo aprovado em ambos (Protocolo de Pesquisa número 0738/07 – CAPPesq HC-FMUSP).

15. Revisão bibliográfica

Para pesquisa bibliográfica de periódicos foram utilizados os principais bancos e bases de dados disponíveis eletronicamente, além de literatura corrente disponibilizada em livros texto. Visando uma maior eficiência na obtenção dos resultados, além do uso de palavras-chave relevantes ao assunto abordado, foram utilizados descritores MESH e DeCS indexados respectivamente pelas bases MEDLINE e LILACS. Também foram revistas algumas publicações citadas por autores em suas referências. A estrutura dos elementos textuais contidos nessa dissertação respeitou os preceitos contidos no Guia Oficial do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo⁽¹⁵³⁾.

RESULTADOS

Foi fornecida pelo SAME HC-FMUSP uma lista inicial contendo 857 registros de indivíduos atendidos pelas principais unidades responsáveis pela assistência aos portadores de infecção pelo vírus da hepatite C, ligadas ao Ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, durante o período compreendido entre 01/01/2006 e 31/12/2006.

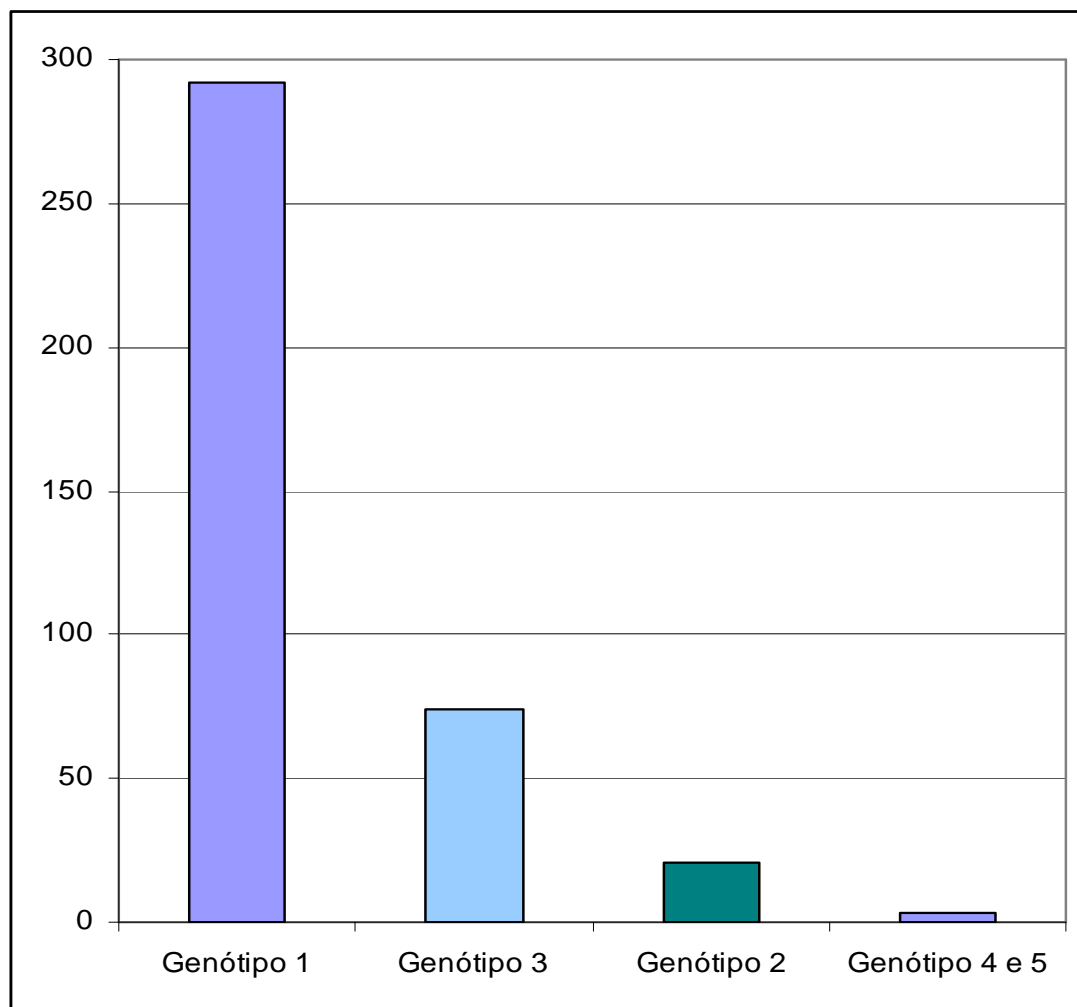
Foram excluídos 36 pacientes portadores de hepatite B crônica e 5 pacientes infectados pelo vírus HIV (monoinfecção).

Desse restante, 728 pacientes apresentavam sorologia positiva para o VHC com comprovação virológica através da detecção do VHC-RNA, via técnica de PCR. Porém, três pacientes (0,4%) apresentam sorologia positiva concomitante para infecção crônica pelo VHB e trinta e três pacientes (4,5%) eram co-infectados pelo vírus HIV, sendo excluídos do estudo.

Desta forma, foram admitidos 692 registros para a procura de infecção pregressa pelo VHB. Estes eram constituídos por 327 (47,25 %) indivíduos do sexo masculino e por 365 (52,75 %) do sexo feminino. A idade mínima foi de 18 anos e a máxima de 83 anos, com média de 46,10 (\pm 12,43) anos e mediana de 47 anos.

O genótipo 1 foi encontrado de forma mais freqüente (292 casos), seguido pelo 3 (74 casos) e pelo 2 (21 casos). Foram encontrados também os genótipos 4 e 5, respectivamente um e dois casos. Trezentos e dois pacientes não apresentaram exame de genotipagem do VHC.

Gráfico 1 - Genótipos do vírus C em pacientes atendidos pelo DMIP-HC FMUSP - 2006



Através da revisão, primeiramente eletrônica via rede interna HCNET seguida da análise *in loco* de prontuários, foram encontrados 574 registros nos quais a pesquisa sorológica do anti-HBcAg, HBsAg e anti-HBsAg estava disponível (Gráficos 2 e 3). Deste grupo, foi recuperado um total de 215 registros que obedeciam aos critérios de seleção propostos pelo estudo. Noventa e oito pertenciam à pacientes com sorologia positiva para o anti-HBcAg.

Cento e dezessete pacientes portadores somente de infecção crônica pelo VHC [anti-HBcAg (-)] foram selecionados para a etapa analítica da pesquisa. Este grupo foi emparelhado por frequência ao grupo de estudo [anti-HBcAg (+)], de acordo com a distribuição aproximada dos indivíduos quanto ao sexo e faixa etária à época da realização da biópsia hepática, agrupada em decênios. A Figura 3 demonstra a dinâmica de seleção dos pacientes elegíveis ao estudo:

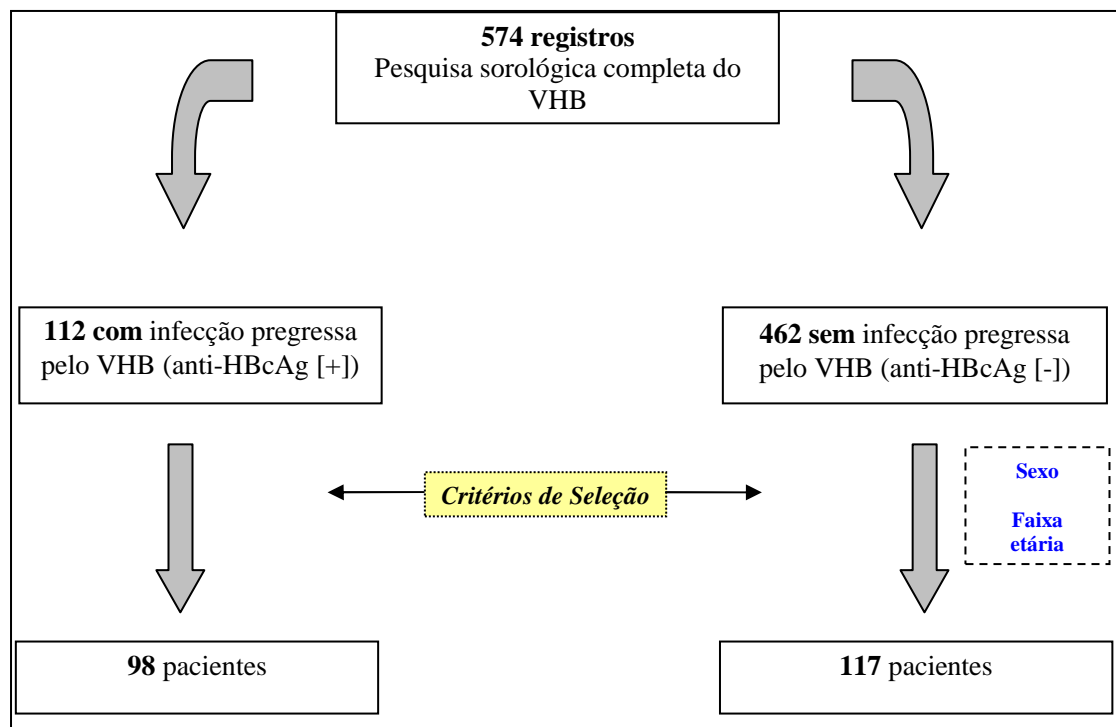


Figura 3 – Seleção dos indivíduos em estudo de acordo com os critérios adotados

Gráfico 2 - Proporção de pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C quanto à infecção pregressa pelo vírus B atendidos pelo ambulatório de DMIP-HC FMUSP – 2006

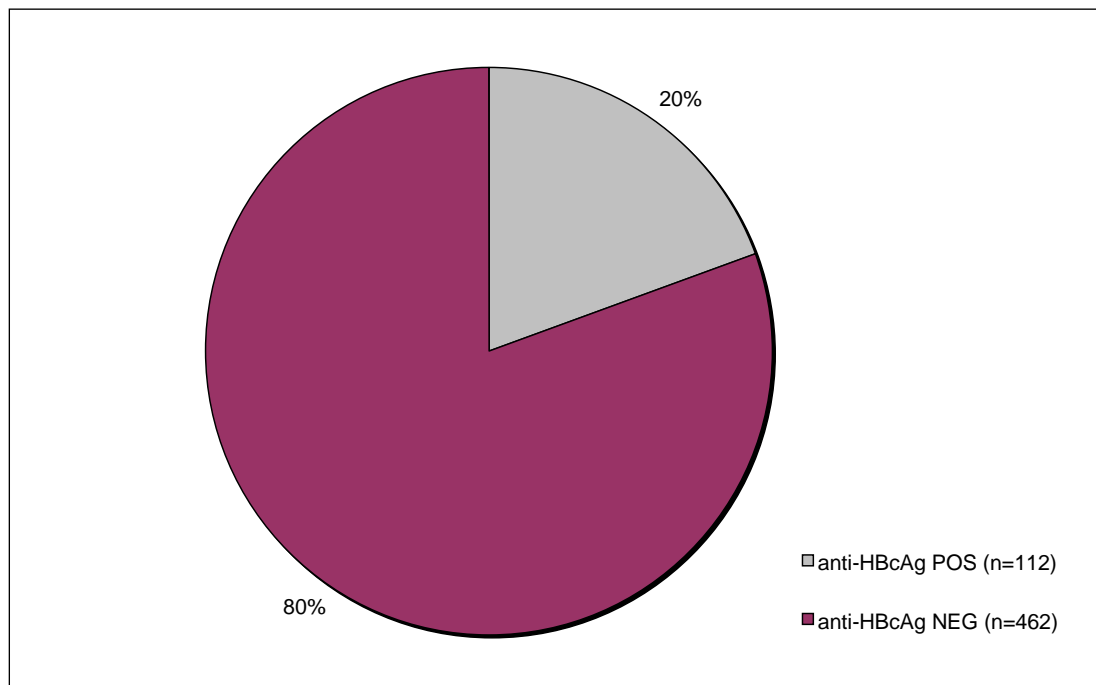


Gráfico 3 - Proporção de pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C e infecção pregressa pelo vírus B em relação à presença do anti-HBsAg atendidos pelo ambulatório de DMIP-HC FMUSP – 2006

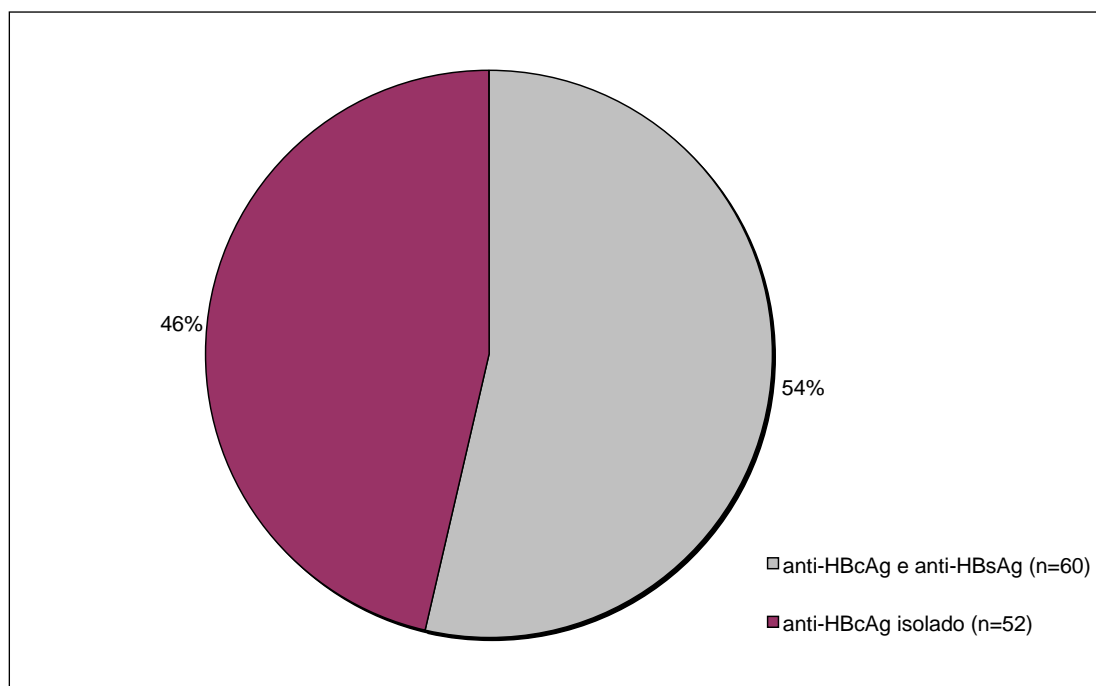


Tabela 4 - Distribuição das frequências dos indivíduos com sorologia anti-HBcAg isolado de acordo com índice S/CO do método empregado HC FMUSP - 2006

<i>Índice S/CO</i>	<i>Frequência</i>	<i>%</i>	<i>% acumulada</i>
0 - 0,25	30	57,7	57,7
0,26 - 0,50	5	9,6	67,3
0,51 - 0,75	0	0,0	67,3
0,75 - 1	3	5,8	73,1
Indeterminado	14	26,9	100,0
Total	52	100,0	

1. Caracterização dos indivíduos portadores de hepatite C crônica e infecção progressa pelo vírus B

Foram identificados 112 pacientes portadores de sorologia positiva para o anti-HBcAg. Contudo, 8 indivíduos não dispunham da análise histopatológica hepática (três por contra-indicação ao procedimento invasivo, dois por apresentarem evidências clínico-laboratoriais de cirrose, três por terem se negado a realizar a biópsia) e 6 possuíam prontuários incompletos, de modo que 98 pacientes foram selecionados de acordo com os critérios adotados por este estudo.

Deste grupo, cinquenta pacientes eram do sexo masculino e quarenta e oito do sexo feminino. A idade média à época da realização da biópsia hepática foi de 43,5 anos ($\pm 11,23$), com mediana de 50 e moda de 52. A menor idade encontrada foi 19 enquanto a maior foi 72 anos.

As comorbidades identificadas estão descritas na tabela abaixo, por ordem de frequência, sendo as mais comuns hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus.

Tabela 5 - Comorbidades encontradas em pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B - DMIP-HC FMUSP - 2006

<i>Comorbidade</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
Hipertensão arterial sistêmica	25	25,51
Diabetes mellitus	10	10,20
Hipotireoidismo	5	5,10
Colagenose (doença reumatóide, lupus)	4	4,08
Vasculopatias (aneurisma, acidente vascular cerebral, vasculites)	3	3,06
Neoplasias (tireóide, estômago)	4	4,08
Infecção pelo vírus HTLV 1/2	3	3,06
Cardiopatias (arritmias, insuficiência cardíaca)	3	3,06
Nódulo tireoidiano	2	2,04
Nódulo mamário	2	2,04
Asma brônquica	2	2,04
Labirintopatia	2	2,04

Também foram descritos casos isolados de: esquistossomose tratada, pancreatite crônica, hipertireoidismo, osteoporose, anemia falciforme, vitiligo e sífilis pregressa.

Os possíveis fatores de risco relacionados à aquisição do VHC mais encontrados foram transfusão de sangue / hemoderivados e histórico de cirurgia / procedimento invasivo. Em 12 dos 31 casos (38,7%) com histórico de hemotransfusão houve a concomitância da realização de procedimento invasivo. A distribuição está relatada na Tabela 6:

Tabela 6 - Fatores de risco associados à aquisição de infecção pelo vírus C em pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B - DMIP-HC FMUSP - 2006

<i>Fator de risco</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
Transfusão de sangue / hemoderivados	31	31,63
Cirurgia / procedimento invasivo	28	28,57
Contato sexual de risco	10	10,20
Uso de droga injetável	8	8,16
Tatuagem / piercing	6	6,12
Uso de droga inalatória	6	6,12
Contato intradomiciliar portador VHC	5	5,10
Exposição ocupacional	2	2,04
Desconhecido	32	32,65

Trinta e seis pacientes (36,7%) apresentaram registros de tabagismo e trinta e um (31,6%) relataram ingestão de bebida alcoólica. Em relação ao tempo de uso (atual ou pregresso), 55 % dos tabagistas e 41,2 % dos etilistas relatavam uso das respectivas substâncias na ocasião da coleta dos dados. A maioria dos indivíduos era do sexo masculino, respectivamente 23 (63,8%) e 25 (80,6%) pacientes. Foi possível estimar a intensidade do uso em 32 casos de tabagismo e 29 de etilismo. As distribuições das frequências de tabagismo e etilismo estão relatadas nas tabelas abaixo:

Tabela 7 - Distribuição de pacientes com histórico de tabagismo quanto à intensidade de uso - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
Tabagismo¹		
Leve-moderado	17	47,2%
Acentuado	15	41,7%
Indeterminado	4	11,1%
Total	36	100 %

¹ Tabagismo: Leve-moderado: até 20 anos / maço; Acentuado: acima de 20 anos / maço;

Tabela 8 - Distribuição de pacientes com histórico de etilismo quanto à intensidade de uso - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
Etilismo²		
Leve-moderado	17	54,8%
Acentuado	12	38,7%
Indeterminado	2	6,5%
Total	31	100 %

² Etilismo: Leve-moderado: ingestão menor que 40 g de etanol por dia para homens e 20 g / dia para mulheres; Acentuado: ingestão maior que 40 g dia para homens e 20 g / dia para mulheres.

Setenta e seis pacientes possuíam exame de genotipagem do VHC, sendo o tipo 1 o mais comum, seguido pelo 3 e 2. A distribuição total está representada na Tabela 9:

Tabela 9 - Frequência dos genótipos do vírus C em portadores de infecção pregressa pelo vírus B - DMIP-HC FMUSP - 2006

<i>Genótipos</i>	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
1, 1a, 1b, 1a/1b	52	68,4%
3a	16	21,1%
2, 2b, 2a/2c	8	10,5%

Quanto aos achados dos exames laboratoriais, os resultados hematológicos, de bioquímica e função hepática estão descritos na Tabela 10:

Tabela 10 - Frequências, medidas de tendência central e dispersão dos exames laboratoriais - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
AST (UI/L)	54,86	40,00	47,65	14,50	390,00
ALT (UI/L)	69,80	51,25	55,88	15,50	320,50
FALC (UI/L)	77,24	73,75	25,02	34,50	169,00
GAMGT (g/dL)	68,05	49,50	58,62	11,50	316,50
BT (mg/dL)	0,74	0,65	0,33	0,30	2,00
BD (mg/dL)	0,20	0,19	0,12	0,10	0,85
ALB (g/dL)	4,31	4,37	0,38	3,20	5,00
TAP (%)	93,00	94,75	12,65	59,40	116,50
INR	1,05	1,02	0,11	0,90	1,45
LEUCO (/mm ³)	6.677	6.450	2.181	1.805	17.790
PLT (/mm ³)	220.357	214.250	76.844	72.000	691.000

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanino aminotransferase; FALC: fosfatase alcalina; GAMAGT: gamaglutiltransferase; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; ALB: albumina; TAP: tempo de atividade de protrombina; INR: índice internacional normatizado; LEUCO: leucócitos; PLT: plaquetas

Quanto aos achados histopatológicos da análise hepática, houve predomínio de hepatite leve à moderada, tanto em relação ao estadiamento quanto a graduação necroinflamatória. Quarenta e seis indivíduos (47%) eram portadores de anti-HBcAg isolado enquanto cinquenta e dois (53%) apresentavam sorologia completa (anti-HBcAg e anti-HBsAg).

As variáveis relacionadas à graduação estrutural hepática foram categorizadas em três grupos, para a aplicabilidade do teste estatístico para proporções. Esses foram: alteração estrutural leve, compreendendo os graus 0 e 1; alteração moderada, contendo o grau 2 e alteração acentuada, constituída pelos graus 3 e 4 (cirrose). O mesmo formato de categorização foi utilizado para as três variáveis relacionadas à atividade necroinflamatória: infiltrado inflamatório portal, atividade periportal, atividade parenquimatosa.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre pacientes portadores de somente anti-HBcAg e aqueles portadores deste associado ao anti-HBsAg em relação às variáveis utilizadas na classificação histológica do fragmento hepático, como pode ser visto a seguir:

Tabela 11 - Relação entre os achados anatomopatológicos de pacientes portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B distribuídos de acordo com a presença do anticorpo anti-HBsAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg isolado n (%)</i>	<i>anti-HBcAg anti-HBsAg n (%)</i>	<i>Total n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
AE graus 0 – 1	26 (56,5)	36 (69,2)	62 (63,3)	Referência	0,213
AE grau 2	12 (26,1)	10 (19,2)	22 (22,4)	0,60 (0,22-1,60)	
AE graus 3 – 4	8 (17,4)	6 (11,5)	14 (14,3)	0,54 (0,16-1,75)	
$\chi^2 = 1,554$					
IPP graus 0 – 1	13 (28,3)	13 (25)	26 (26,5)	Referência	0,682
IPP grau 2	19 (41,3)	28 (53,8)	47 (48,0)	1,47 (0,56-3,86)	
IPP graus 3 – 4	14 (30,4)	11 (21,2)	25 (25,5)	0,78 (0,26-2,36)	
$\chi^2 = 0,168$					
APP graus 0 – 1	17 (37,0)	16 (30,8)	33 (33,7)	Referência	0,920
APP grau 2	18 (39,1)	26 (50,0)	44 (44,9)	1,53 (3,81-0,62)	
APP graus 3 – 4	11 (23,9)	10 (19,2)	21 (21,4)	0,96 (0,32-2,89)	
$\chi^2 = 0,010$					
AP graus 0 – 1	25 (54,3)	31 (59,6)	56 (57,1)	Referência	0,883
AP grau 2	19 (41,3)	15 (28,8)	34 (34,7)	0,64 (0,27-1,50)	
AP graus 3 – 4	2 (4,3)	6 (11,5)	8 (8,2)	2,42 (0,45-3,04)	
$\chi^2 = 0,022$					

AE: alt. estrutural; IPP: infiltrado inflamatório portal; APP: ativ. periportal; AP: ativ. parenquimatosa

Em relação aos marcadores etiológicos histopatológicos, observou-se esteatose hepática em trinta e três fragmentos de biópsia (33,7%), agregados linfóides em vinte e três (23,5%), agressão ductal em quatro (4,1%) e siderose em 2 casos (2%). Sua distribuição absoluta e relativa está descrita na Tabela 12:

Tabela 12 - Marcadores etiológicos histológicos em portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo vírus B - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>Frequência</i>	<i>Porcentagem</i>
Esteatose		
Grau 0	65	66,3
Grau 1	22	22,4
Grau 2	8	8,2
Grau 3	3	3,1
Agregados linfóides		
Sim	23	23,5
Não	75	76,5
Agressão ductal		
Sim	4	4,1
Não	94	95,9

2. Análise comparativa entre portadores de hepatite C crônica de acordo com a infecção pregressa pelo vírus B

Foram selecionados cento e dezessete pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC sem contato pregresso com o VHB para comparação com os 98 indivíduos do grupo em estudo, seguindo o emparelhamento por sexo e faixa etária (Tabela 13).

Quanto ao sexo, houve uma relação de 1:1,16 para o gênero masculino e 1:1,22 para o gênero feminino em relação ao grupo de estudo.

Em relação à faixa etária, a média de idade encontrada foi de 40,7 (+/- 11,94) anos, com mediana de 43. A menor idade encontrada foi 19 e a maior 62 anos.

Tabela 13 - Distribuição dos indivíduos quanto ao sexo e faixa etária (variáveis de emparelhamento) de acordo com o status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg (+)</i> <i>n (%)</i>	<i>anti-HBcAg (-)</i> <i>n (%)</i>
Sexo		
Masculino	50 (51,0)	58 (49,6)
Feminino	48 (49,0)	59 (50,4)
Faixa etária		
18 – 30	17 (17,35)	24 (20,51)
31 – 40	17 (17,35)	20 (17,09)
41 – 50	36 (36,73)	42 (35,09)
> 50	28 (28,57)	31 (26,50)

As distribuições em relação às comorbidades descritas, em ordem de frequência, estão referidas na Tabela 14. Houve predomínio de indivíduos hipertensos entre os pacientes portadores de infecção pregressa pelo VHB.

Tabela 14 - Distribuição dos indivíduos quanto às comorbidades de acordo com o status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg</i>	<i>anti-HBcAg</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
	(+) <i>n (%)</i>	(-) <i>n (%)</i>		
Comorbidades				
HAS	25 (25,5)	12 (10,3)	2,99 (1,41-6,34)	0,003
DM	10 (10,2)	5 (4,3)	2,54 (0,84-7,71)	0,089
HTLV 1/2	3 (2,7)	2 (2)	1,35 (0,22-8,24)	0,745
Hipotireoidismo	5 (5,1)	3 (2,6)	2,04 (0,47-8,77)	0,327
Cardiopatía	3 (2,7)	3 (3)	0,89 (0,17-4,51)	0,888

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: Diabetes mellitus

Em relação aos possíveis fatores de risco relacionados à aquisição da infecção, houve uma maior frequência de pacientes com histórico de uso de droga intravenosa no grupo dos pacientes portadores de hepatite C e infecção pregressa pelo VHB (Tabela 15).

Tabela 15 - Fatores de risco potenciais à aquisição de infecção de acordo com o status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg</i>		<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
	(+) <i>n (%)</i>	(-) <i>n (%)</i>		
Transfusão de sangue ou hemoderivados	31 (31,6)	50 (42,7)	0,62 (0,35-1,08)	0,094
Cirurgia ou procedimento invasivo	28 (28,6)	30 (25,6)	1,16 (0,63-2,12)	0,630
Uso droga injetável	8 (8,2)	2 (1,7)	5,11 (1,05-24,66)	0,025
Uso droga inalatoria	6 (6,1)	8 (6,8)	0,88 (0,29-2,65)	0,832
Tatuagem ou <i>piercing</i>	6 (6,1)	5 (4,3)	1,46 (0,43-4,94)	0,540
Contato sexual de risco	10 (10,2)	6 (5,1)	2,10 (0,73-6,00)	0,158
Exposição ocupacional	2 (1,8)	3 (3,0)	0,58 (0,09-3,59)	0,668
Contato intradomiciliar portador de VHC	5 (4,5)	7 (7,0)	0,62 (0,19-2,02)	0,425
Desconhecido	32 (32,7)	34 (29,1)	1,18 (0,66-2,11)	0,569

No que diz respeito ao histórico de uso acentuado de álcool e cigarro, não houve diferença estatística entre os dois grupos, conforme tabela abaixo:

Tabela 16 - Comparação entre o uso acentuado de álcool e cigarro de acordo com status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg</i>		<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
	(+) <i>n (%)</i>	(-) <i>n (%)</i>		
Etilismo	12 (12,2)	6 (5,1)	2,58 (0,93-7,15)	0,061
Tabagismo	15 (15,3)	16 (13,7)	1,14 (0,53-2,44)	0,735

Quanto ao genótipo do VHC, houve uma menor frequência de casos infectados pelo tipo 1 no grupo anti-HBcAg (+), com uma maior proporção relativa de indivíduos portadores de genótipo 2 e 3 (não 1) (Tabela 17).

Tabela 17 - Genótipos do vírus C distribuídos de acordo com a detecção do anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg (+)</i>	<i>anti-HBcAg (-)</i>	<i>OR</i>	<i>p</i>
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>(IC 95%)</i>	<i>valor</i>
Genótipo				
1	52 (68,4)	85 (81,7)	0,48 (0,24-0,97)	0,039
não 1	24 (31,6)	19 (18,3)		
Total	76 (100)	104 (100)		
$X^2=3,248$				

Em relação aos exames laboratoriais, não foi constatada diferença estatisticamente relevante em relação às transaminases, enzimas canaliculares, provas de função hepática, leucograma e plaquetas entre os dois grupos estudados (Tabela 18).

Tabela 18 - Exames laboratoriais distribuídos de acordo com status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg</i>	<i>anti-HBcAg</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
	(+)	(-)		
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>		
AST (UI/L)				
até LSN	50 (51,0)	55 (55,0)	Referência	0,273
de LSN até	41 (41,8)	43 (43,0)	0,95 (0,53-1,69)	
3x LSN				
> 3x LSN	7 (7,1)	2 (2,0)	0,26 (0,05-1,30)	
Total	98 (100)	100 (100)		
$X^2=1,203$				
<i>Tendência linear</i>				
ALT (UI/L)				
até LSN	34 (34,7)	31 (31,0)	Referência	0,860
de LSN até	49 (50,0)	59 (59,0)	1,32 (0,71-2,44)	
3x LSN				
> 3x LSN	15 (15,3)	10 (10,0)	0,73 (0,28-1,86)	
Total	98 (100)	100 (100)		
$X^2=0,031$ -				
<i>Tendência linear</i>				
FALC (UI/L)				
até 130	93 (94,9)	99 (99,0)	0,18 (0,02-1,63)	0,117
> 130	5 (5,1)	1 (1,0)		
Total	98 (100)	100 (100)		
<i>Teste exato de Fisher</i>				

AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanino aminotransferase; FALC: fosfatase alcalina;
 LSN: limite superior da normalidade

continua

Tabela 18 - Exames laboratoriais distribuídos de acordo com status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP – 2006 (continuação)

	<i>anti-HBcAg</i>	<i>anti-HBcAg</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
	(+)	(-)		
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>		
GAMGT (g/dL)				
até 60	57 (58,8)	60 (60,0)	0,95 (0,53-1,67)	0,860
> 60	40 (41,2)	40 (40,0)		
Total	91 (100)	100 (100)		
<i>X²=0,031</i>				
BT (mg/dL)				
até 1,00	83 (85,6)	82 (83,7)	1,15 (0,53-2,52)	0,714
> 1,00	14 (14,4)	16 (16,3)		
Total	97 (100)	98 (100)		
<i>X²=0,134</i>				
ALB (g/dL)				
até 3,5	3 (3,1)	2 (2,1)	1,50 (0,24-9,18)	1,000
> 3,5	95 (96,9)	95 (97,9)		
Total	98 (100)	97 (100)		
<i>Teste exato de Fisher</i>				
TAP				
até 70%	6 (6,2)	4 (4,0)	1,58 (0,43-5,79)	0,533
> 70 %	91 (93,8)	96 (96,0)		
Total	97 (100)	100 (100)		
<i>Teste exato de Fisher</i>				

GAMAGT: gamaglutiltransferase; BT: bilirrubina total; ALB: albumina;
TAP: tempo de atividade de protrombina

continua

Tabela 18 - Exames laboratoriais distribuídos de acordo com status sorológico anti-HBcAg - DMIP-HC FMUSP – 2006 (conclusão)

	<i>anti-HBcAg</i>	<i>anti-HBcAg</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p</i> <i>valor</i>
	(+) <i>n (%)</i>	(-) <i>n (%)</i>		
INR				
até 1,20	89 (90,8)	88 (88,0)	1,34 (0,54-3,36)	0,520
> 1,20	9 (9,2)	12 (12,0)		
Total	98 (100)	100 (100)		
$X^2=0,414$				
LEUCO (/mm³)				
até 5.000	18 (18,6)	17 (17,0)	1,11 (0,53-2,31)	0,775
> 5.000	79 (81,4)	83 (83,0)		
Total	97 (100)	100 (100)		
$X^2=0,082$				
PLT (/mm³)				
até 150.000	12 (12,2)	6 (6,0)	2,18 (0,78-6,07)	0,126
> 150.000	86 (87,8)	94 (94,0)		
Total	98 (100)	100 (100)		
$X^2=2,336$				

INR: índice internacional normatizado; LEUCO: leucócitos; PLT: plaquetas

2.1. Comparação histológica entre pacientes portadores de hepatite C crônica em relação à infecção pregressa pelo vírus B

Após comparação entre as variáveis relacionadas ao estadiamento e graduação necroinflamatória, categorizadas em leve, moderada e acentuada, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com ou sem infecção pregressa pelo VHB quanto às variáveis supracitadas, tampouco em relação à frequência encontrada de cada um dos marcadores etiológicos (Tabela 19). Estes últimos, para efeito comparativo, foram agrupados nas categorias “presente” e “ausente”.

Tabela 19 - Relação entre os achados anatomopatológicos em portadores de hepatite C crônica com e sem infecção pregressa pelo VHB - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>anti-HBcAg (+)</i> <i>n (%)</i>	<i>anti-HBcAg (-)</i> <i>n (%)</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>
AE graus 0 – 1	62 (63,3)	70 (59,8)	Referência	0,404
AE grau 2	22 (22,4)	24 (20,5)	0,96 (0,49-1,89)	
AE graus 3 – 4	14 (14,3)	23 (19,7)	1,45 (0,68-3,07)	
$X^2=0,397$				
IIP graus 0 – 1	26 (26,5)	31 (26,5)	Referência	0,987
IIP grau 2	47 (48,0)	56 (47,9)	0,99 (0,52-1,91)	
IIP graus 3 – 4	25 (25,5)	30 (25,6)	1,00 (0,47-2,11)	
$X^2=0,000$				
APP graus 0 – 1	33 (33,7)	50 (42,7)	Referência	0,709
APP grau 2	44 (44,9)	36 (30,8)	0,54 (0,29-1,00)	
APP graus 3 – 4	21 (21,4)	31 (26,5)	0,97 (0,48-1,97)	
$X^2=0,140$				
AP graus 0 – 1	56 (57,1)	60 (51,3)	Referência	0,538
AP grau 2	34 (34,7)	48 (41,0)	1,31 (0,74-2,33)	
AP graus 3 – 4	8 (8,2)	9 (7,7)	1,05 (0,37-2,91)	
$X^2=0,379$				

AE: alt. estrutural; IIP: infiltrado inflamatório portal; APP: ativ. periportal; AP: ativ. parenquimatosa

continua

Tabela 19 - Relação entre os achados anatomopatológicos em portadores de hepatite C crônica com e sem infecção pregressa pelo VHB - DMIP-HC FMUSP - 2006 (conclusão)

	<i>anti-HBcAg</i>	<i>anti-HBcAg</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p valor</i>
	(+)	(-)		
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>		
Esteatose graus 1, 2 e 3 $X^2=0,206$	33 (33,7)	36 (30,7)	1,14 (0,64-2,02)	0,650
Agregados linfóides $X^2=1,763$	23 (23,5)	37 (31,6)	0,66 (0,36-1,21)	0,184
Agressão ductal $X^2=2,326$	4 (4,1)	11 (9,4)	0,41 (0,12-1,33)	0,127

2.2. Taxa de progressão da fibrose hepática

Foi possível calcular o tempo de infecção relativo à data de realização da biópsia e conseqüentemente a taxa de progressão de fibrose em 93 pacientes, sendo 42 com infecção progressiva pelo VHB e 51 monoinfectados pelo VHC.

O tempo médio de infecção para o primeiro grupo foi de 20,93 anos, com mediana de 21,50 (intervalo interquartil: 15,75-26). A taxa média de progressão foi de 0,080 unidades de fibrose / ano, com mediana de 0,062 (intervalo interquartil: 0,036-0,094).

No grupo dos monoinfectados, a duração média da infecção foi de 21,46 anos, com mediana de 21 (intervalo interquartil: 17-25,75). A taxa média de progressão foi de 0,065 unidades de fibrose / ano e mediana de 0,060 (intervalo interquartil: 0,007-0,098).

Não houve diferença estatística, pelo teste de Mann-Whitney, em relação à duração da infecção ($p=0,994$), tampouco progressão estrutural mais acentuada de um grupo em detrimento ao outro ($p=0,611$) (Gráficos 4 e 5).

Gráfico 4 - Comparação do tempo de infecção pelo vírus C entre pacientes com e sem infecção progressiva pelo vírus B ($p=0,994$) - DMIP-HC FMUSP - 2006

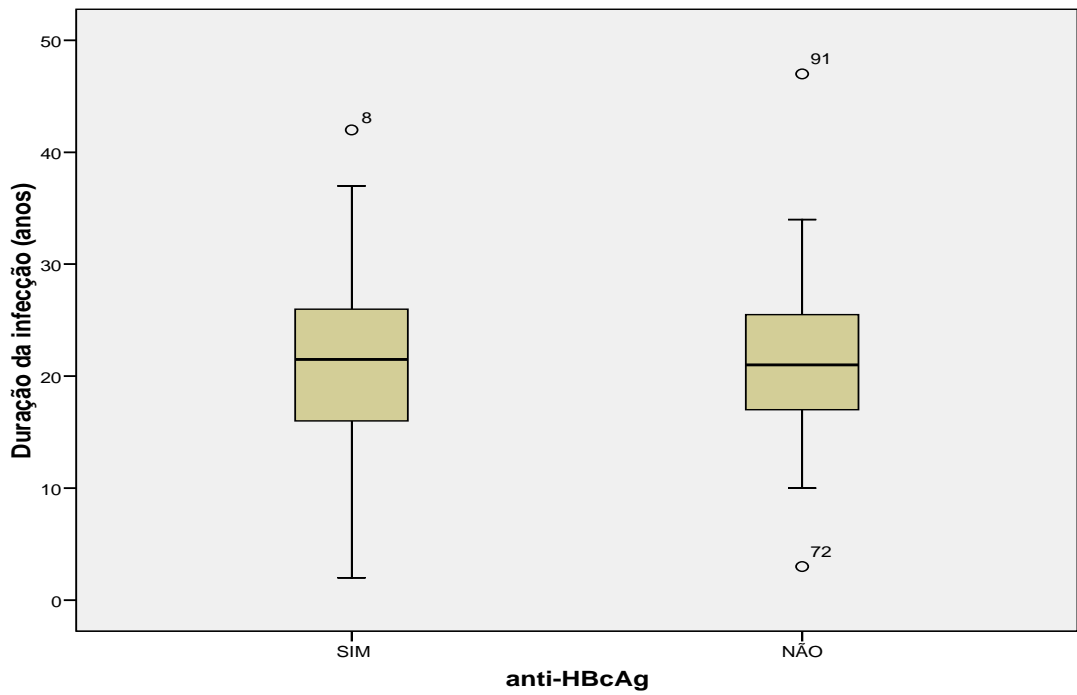
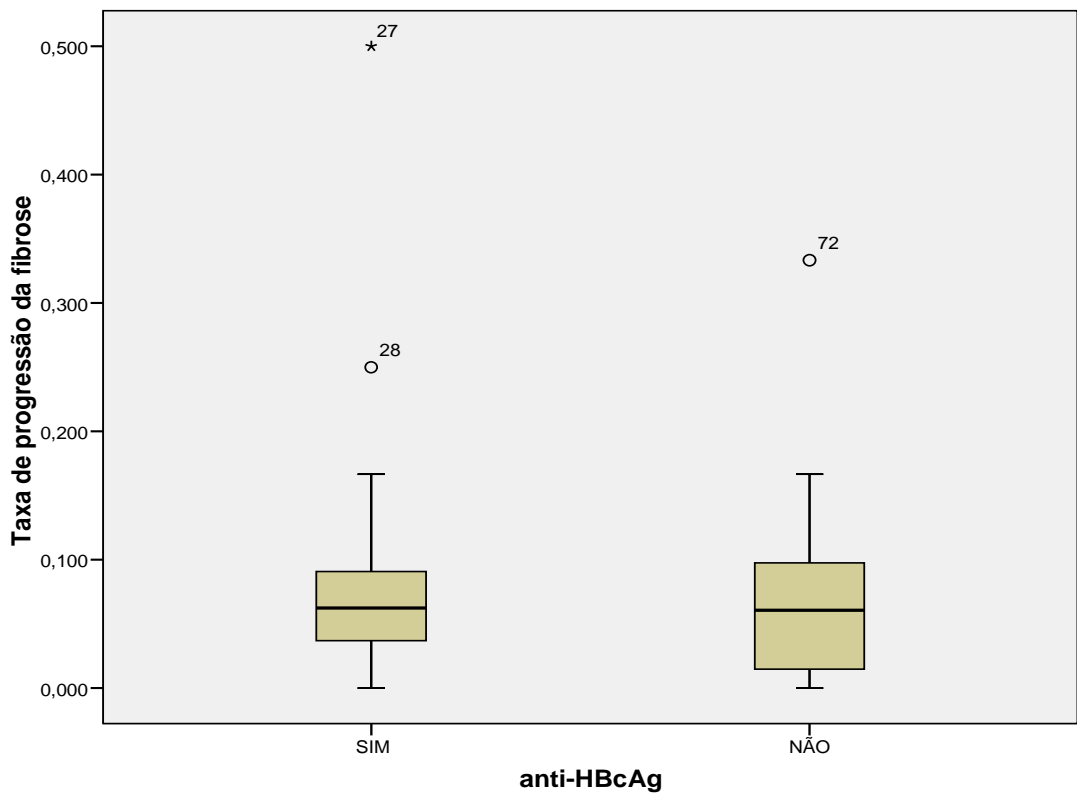


Gráfico 5 - Comparação da taxa de progressão de fibrose hepática entre pacientes com e sem infecção progressiva pelo vírus B ($p=0,611$) - DMIP-HC FMUSP - 2006



3. Fatores preditores de fibrose hepática acentuada

3.1. Análise univariada

Para avaliação dos possíveis preditores de fibrose avançada, utilizou-se como ferramenta estatística o método de Regressão Logística binária, sendo considerada como variável dependente a presença de fibrose acentuada (graus 3 e 4) e as seguintes variáveis como preditores: sexo, idade na época da realização da biópsia (categorizada em maiores e menores de 40 anos), etilismo e tabagismo acentuados, presença do marcador sorológico anti-HBcAg, dosagem de aspartatoaminotransferase (AST) e alaninoaminotransferase (ALT), de gamaglutiltransferase, bilirrubinas totais, albumina sérica, INR (Índice Internacional Normalizado) para atividade de protrombina, leucopenia e plaquetopenia.

Além destas, avaliou-se também a atividade necroinflamatória hepática como preditor independente, sendo aqui representada pela atividade periportal maior ou igual a 2, ou seja, pela presença de necrose em saca-bocado (Tabela 20).

Para essa etapa foram selecionados 145 indivíduos, baseados na data de coleta dos exames laboratoriais escalados como variáveis explanatórias no modelo. Foram aceitos aqueles realizados no máximo até 74 semanas antes ou após a data de realização da biópsia.

Após análise, foram considerados preditores independentes: idade acima de 40 anos (OR: 2,66; IC95%: 1,05-6,74), aumento de transaminases (AST: OR 1,04; IC95%: 1,02-1,06; ALT: OR 1,02; IC95%: 1,01-1,03), de gamaglutiltransferase (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,02) e de bilirrubinas totais (OR 3,07; IC95%: 1,02-9,26), INR acima de 1,20 (OR 3,57; IC95%: 1,22-10,43); contagem de leucócitos abaixo de 5.000 / mm³ (OR 4,40; IC95%: 1,73-11,17), de plaquetas abaixo de 150.000 / mm³ (OR 15,20; IC95%: 3,71-62,22) e atividade periportal hepática maior ou igual a 2 (OR 8,12; IC95%: 1,83-35,90).

As variáveis sexo masculino (OR: 2,22; IC95%: 0,93-5,31), tabagismo acentuado (OR 2,52; IC95%: 0,95-6,69) e etilismo acentuado (OR 2,96; IC95%: 0,88-9,88) não foram consideradas estatisticamente significantes, embora tenham apresentado p-valor bem próximo do nível de significância adotado pelo estudo.

Tabela 20 - Análise univariada de possíveis preditores de fibrose hepática acentuada, por método de Regressão Logística binária - DMIP-HC FMUSP - 2006

	<i>n</i> (%)	<i>OR</i> (<i>IC</i> 95%)	<i>p</i> -valor
Sexo masculino	76 (52,4)	2,22 (0,93-5,31)	0,073
Idade (> 40 anos)	83 (57,2)	2,66 (1,05-6,74)	0,034
Tabagismo ¹	24 (16,6)	2,52 (0,95-0,69)	0,063
Etilismo ²	13 (9)	2,96 (0,88-9,88)	0,077
anti-HBcAg (+)	62 (42,7)	0,84 (0,36-1,94)	0,679
AST (UI/L) (média ± DP)	49,7 (± 39,8)	1,04 (1,02-1,06)	<0,001
ALT (UI/L) (média ± DP)	66,6 (± 50,1)	1,02 (1,01-1,03)	<0,001
GAMGT (g/dL) (média ± DP)	63,9 (± 58,1)	1,01 (1,00-1,02)	<0,001
BT (mg/dL) (média ± DP)	0,78 (± 0,33)	3,07 (1,02-9,26)	0,046
ALB (g/dL) (média ± DP)	4,36 (± 0,40)	0,75 (0,26-2,15)	0,595
INR (>1,20)	17 (11,7)	3,57 (1,22-10,43)	0,020
LEUCO (< 5.000/mm ³)	26 (17,9)	4,40 (1,73-11,17)	0,002
PLT (< 150.000/mm ³)	11 (7,6)	15,20 (3,71-62,22)	<0,001
APP ≥ 2	98 (67,5)	8,12 (1,83-35,90)	0,006

¹ > 20 anos/maço; ² ingestão > que 40 g dia para homens e 20 g dia para mulheres; DP: d. padrão; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanino aminotransferase; GAMGT: gamaglutiltransferase; BT: bilirrubina total; ALB: albumina; INR: índice internacional normatizado; LEUCO: leucócitos; PLT: plaquetas; APP: atividade periportal

3.2. Análise multivariada

Para a confecção do modelo de Regressão Logística multivariado foram selecionadas as variáveis cuja significância estatística (p-valor) revelou-se menor que 0,20 na análise univariada. Portanto foram considerados: sexo masculino, idade acima de 40 anos, tabagismo e etilismo acentuados, dosagem de transaminases (aqui representada pela ALT, devido sua maior especificidade para doença hepática), de gamaglutiltransferase e de bilirrubinas totais, INR acima de 1,20; contagem de leucócitos abaixo de $5.000 / \text{mm}^3$, de plaquetas abaixo de $150.000 / \text{mm}^3$ e atividade periportal histológica ≥ 2 . A variável “presença do anti-HBcAg” também foi considerada, independente do seu grau de significância a análise univariada.

Inicialmente todas as variáveis foram incluídas no modelo. Aquelas que quando testadas não apresentaram significância estatística, baseada no teste de razão de verossimilhança, foram removidas sequencialmente.

O modelo final foi aquele que apresentou menor discrepância em relação às frequências observadas e estimadas, através do teste de Hosmer e Lemeshow⁽¹⁵⁴⁾. Sua capacidade de determinação para a fibrose acentuada foi obtida através do cálculo do R^2 de Nagelkerke. A avaliação da significância de cada coeficiente da função logística obtida foi realizada através do teste de Wald⁽¹⁵⁵⁾. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 21.

Determinou-se a acurácia discriminatória, ou seja, o tão bem o modelo consegue distinguir pacientes com fibrose acentuada daqueles com fibrose leve-moderada, através do cálculo da área sobre a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), descrita no Gráfico 6⁽¹⁵⁶⁾.

A equação matemática do modelo final ajustado pode ser representada por:

$$\text{Logit}(p) = - 5,151 + (1,255 \times \text{tabagismo}) + (- 0,936 \times \text{anti-HBcAg}) + \\ (0,017 \times \text{ALT}) + (0,010 \times \text{gamagt}) + (1,822 \times \text{leucócitos}) + \\ (1,859 \times \text{plaquetas}) + (1,1414 \times \text{APP} \geq 2)$$

As variáveis sexo masculino, idade acima de 40 anos, etilismo acentuado, dosagem de bilirrubinas totais, INR acima de 1,20 e atividade periportal ≥ 2 perderam significância estatística na análise multivariada.

A presença do anti-HBcAg manteve-se sem significância estatística.

Foram considerados preditores independentes de fibrose hepática avançada: tabagismo acentuado (OR 4,40; IC95%: 1,30-14,87), aumento de ALT (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,03), aumento de gamaglutiltransferase (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,01) e leucócitos abaixo de 5.000 / mm³ (OR 7,75; IC95%: 2,13-28,23).

Tabela 21 - Análise multivariada de possíveis preditores de fibrose hepática acentuada, por método de Regressão Logística seqüencial, modelo final - DMIP-HC FMUSP - 2006

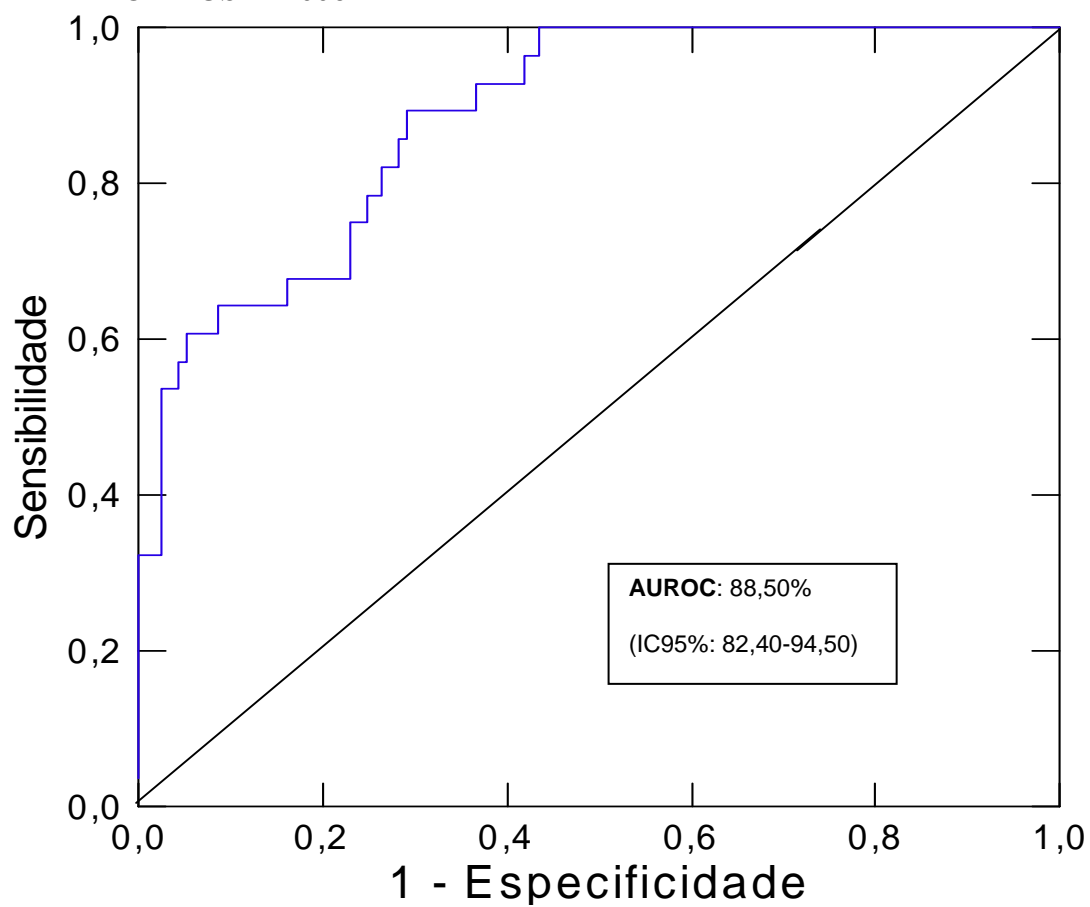
	β	p-valor	OR	IC 95%	
				Mínimo	Máximo
Tabagismo	1,255	0,048	3,50	1,01	12,17
anti-HBcAg (+)	- 0,936	0,110	0,38	0,11	1,24
ALT (UI/L)	0,017	0,007	1,01	1,00	1,03
GAMGT (g/dL)	0,010	0,047	1,01	1,00	1,02
LEUCO ($< 5.000/\text{mm}^3$)	1,822	0,008	6,18	1,61	23,60
PLT ($< 150.000/\text{mm}^3$)	1,859	0,059	6,41	0,93	44,30
APP ≥ 2	1,1414	0,096	4,11	0,77	21,75
Constante	-5,151	0,000	0,006		

ALT: alanino aminotransferase; GAMAGT: gamaglutiltransferase;

LEUCO: leucócitos; PLT: plaquetas; APP: atividade periportal

NOTA: Teste de Hosmer and Lemeshow: $X^2=6,654$. $p=0,574$; R^2 Nagelkerke=0,50

Gráfico 6 - Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para preditores de fibrose avançada, de acordo com modelo de Regressão Logística multivariado - DMIP-HC FMUSP - 2006



DISCUSSÃO

A seguinte dissertação teve como interesse o estudo das características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C com histórico de infecção pregressa pelo vírus da hepatite B. Trata-se de tema relevante, uma vez que o levantamento destas informações, além de contribuir aos estudos disponíveis sobre este tema, permite maior embasamento científico dos conceitos atualmente estabelecidos, respeitando as condições epidemiológicas de nossa região.

O desenho adotado por este estudo tem grande utilidade na descrição das variáveis e de seus padrões de distribuição. Em alguns casos, podemos utilizá-lo para examinar associações, como realizado na segunda parte do nosso protocolo. De fato, as inferências acabam sendo mais seguras para dados constitucionais como sexo e raça, por exemplo. Porém, é possível definir variáveis preditoras e de desfecho baseadas em hipóteses de causa-efeito formuladas a partir do conhecimento prévio dessas associações, obtido de estudos publicados ou então pela plausibilidade biológica do evento de interesse. Nesta dissertação, consideramos a possibilidade da realização de tais inferências, relacionadas à infecção pregressa pelo VHB em portadores de hepatite C crônica, justamente devido ao grande número de trabalhos disponíveis sobre esse assunto, alguns inclusive adotando o mesmo delineamento aqui utilizado.

Um ponto fraco dos estudos transversais é o estabelecimento das relações causais temporais. Apesar de terem sido tomados os devidos cuidados para, ao menos, controlar a influência do tempo em relação às variáveis em análise (como a

coleta dos dados epidemiológicos antes da realização da biópsia hepática), não podemos dizer o mesmo para outras situações dependentes do tempo como o uso de álcool e o tabagismo. Podemos apenas realizar suposições baseadas nos dados obtidos, pois neste caso as evidências sobre a causalidade tornam-se mais fracas.

Todo estudo realizado em ambulatórios de especialidade acaba sofrendo com o viés de seleção, principalmente com o de admissão, o que dificulta a generalização dos resultados obtidos para a população geral, ou seja, compromete a validade externa dos achados. O controle deste viés é possível somente através da realização de grandes estudos de base populacional, que geralmente apresentam maior duração e custos; contudo são mais fidedignos. O estudo transversal é mais factível por ser rapidamente concretizado, ter menor custo, ser capaz de medir vários desfechos e servir como base inicial para um estudo de coorte⁽¹⁵⁷⁾.

Nosso protocolo foi retrospectivo, de modo que os dados registrados foram obtidos da transcrição de prontuários médicos. Houve uma grande variação na qualidade das informações colhidas, pois muitos dos prontuários avaliados estavam incompletos, sendo desta forma excluídos durante o processo de amostragem. Ainda, não foi possível descartar possíveis vieses do observador, decorrentes da interpretação subjetiva destes registros, principalmente em relação aos dados epidemiológicos.

A persistência da infecção pelo VHB em indivíduos com sorologia compatível com infecção resolvida é possível, como já relatado previamente em casos de reativação clínica da infecção em indivíduos imunodeprimidos, principalmente após reconstituição imunológica (infecção pelo HIV em uso de terapia antiretroviral da alta potência - HAART, leishmaniose após tratamento e após transplante de medula

óssea)⁽¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾ ou através de relatos de hepatite pós transfusional ou seguida à doação de órgãos no qual o doador apresentava sorologia compatível com infecção pregressa⁽¹²¹⁾. Dickson et al.⁽¹⁶¹⁾ relataram que 78% dos receptores de fígado proveniente de pacientes HBsAg(-) / anti-HBcAg(+) foram infectados pelo VHB, com alta taxa de cronificação e maior mortalidade quando comparados com receptores de fígado anti-HBcAg (-), inclusive naqueles com o anti-HBsAg(+), indicando que a imunidade humoral não foi absoluta e capaz de impedir a infecção através do enxerto hepático. Ainda, vários estudos confirmaram a persistência do VHB tanto no soro quanto em hepatócitos de pacientes que apresentavam sorologia compatível com infecção pregressa^(133,137,138,140,143,162,163).

A infecção pelo VHC não é rara em nosso meio. Como pode ser visto, foram atendidos 728 pacientes portadores deste vírus somente no ambulatório de DMIP-HC FMUSP em 2006. Porém, a prevalência brasileira acaba sendo muito maior do que a notificada oficialmente, devido à presença na comunidade de casos não diagnosticados decorrentes da natureza assintomática da infecção. Contudo, um estudo de base populacional realizado na cidade de São Paulo comprovou que esta é uma região considerada de baixa endemicidade tanto para a infecção pelo VHC quanto para o VHB⁽⁹⁷⁾.

O grupo de pacientes monoinfectados pelo VHC (692) era constituído por proporções equivalentes de homens e mulheres, com uma idade média de 46,10 anos. O genótipo viral 1 foi o mais freqüente, seguido pelo tipo 3 e 2, achados esses compatíveis com a literatura vigente^(9,164).

Não é incomum a presença de indivíduos com hepatite C crônica que possuem marcadores sorológicos de infecção pregressa pelo VHB. De fato, esse padrão

sorológico parece ser mais comum em indivíduos infectados pelo VHC do que na população em geral^(17,97). No nosso estudo, 20% de 567 pacientes atendidos no período de um ano apresentavam pelo menos um marcador sorológico de contato com o VHB, o anti-HBcAg. Este achado foi compatível com outros estudos internacionais, realizados em regiões onde a distribuição epidemiológica do VHB e VHC é similar à nossa situação.

Em um estudo italiano, 140 pacientes com hepatite C crônica, num total de 390 atendimentos (35%), apresentavam sorologia positiva para anticorpo do core do VHB⁽¹³⁸⁾. Em dois outros inquéritos realizados nos Estados Unidos, também de caráter transversal, 32% de 285 indivíduos e 35% de 133 pacientes apresentavam o mesmo marcador^(133,165). Outro estudo transversal, italiano, relatou uma prevalência de 40% de infecção pregressa pelo VHB em pacientes com hepatite C crônica⁽¹³⁷⁾.

Um protocolo brasileiro, baseado em Campinas – SP, realizou a pesquisa de anticorpos contra o VHB em 790 potenciais doadores de sangue cuja sorologia foi positiva para infecção pelo VHC, revelando uma prevalência de 30 % para o anti-HBcAg⁽¹⁶⁶⁾.

Por outro lado, deve-se considerar a validade interna da prevalência obtida pelo nosso estudo, uma vez que 17 % dos indivíduos atendidos em 2006 não apresentavam análise sorológica para detecção do anti-HBcAg. Acreditamos que a maioria era negativa para esse marcador, pois grande parcela destes pacientes foi encaminhada pelos bancos de sangue, de modo que nas transcrições dos prontuários médicos havia anotações somente sobre a infecção pelo VHC e não se fazia menção ao status sorológico do VHB, quando somente da pesquisa do anti-HBsAg para fins

de vacinação. Para não comprometer a qualidade da pesquisa, optamos por considerar esses dados como indeterminados e excluí-los da nossa análise.

A identificação sorológica do anti-HBcAg como único marcador de infecção pelo VHB (forma isolada) é observada freqüentemente em situações específicas como em usuário de drogas intravenosas, em infectados pelo HIV, pelo VHC e em gestantes, devendo-se a muitas razões⁽¹⁶⁷⁾. Estima-se que cerca de 10 a 40% dos indivíduos com este padrão sorológico apresentem viremia pelo VHB^(168,169). No Brasil, em um inquérito realizado em 150 doadores de sangue anti-HBcAg (+), encontrou-se a presença do material genético viral no soro de 3,3% destes indivíduos⁽¹⁷⁰⁾. Outra análise semelhante, realizada no nordeste brasileiro, encontrou proporção equivalente (7,7%) (Arraes, 2003 apud Silva, 2004^(170,171)).

Estudos realizados na Espanha e Estados Unidos estimaram uma prevalência de 10-20% de anti-HBcAg como único marcador de infecção pregressa pelo VHB⁽¹⁷²⁾. De maneira semelhante, um estudo italiano identificou que 1,8% de 6.544 doadores de sangue, considerados indivíduos de baixo risco, apresentavam esse padrão sorológico, contrastando com a prevalência de 21,5% encontrada em portadores de hepatocarcinoma⁽¹⁷³⁾. No Brasil, inquéritos realizados em bancos de sangue na Região Sudeste demonstraram prevalências do anticorpo em forma isolada que variavam de 18,1 a 24,2%^(174,175). Por outro lado, um estudo realizado na Região Sul brasileira, no qual foram analisados 150 candidatos a doação de sangue com infecção pregressa pelo VHB, revelou este anticorpo isoladamente em 42,7% destes indivíduos⁽¹⁷⁰⁾.

Weber et al.⁽¹⁶⁹⁾ concluíram que em 65,4% dos indivíduos analisados com anti-HBcAg isolado, a principal causa foi associação com a infecção pelo VHC. A relação inversa também foi relatada, de modo que a presença deste anticorpo por si só já justificaria a procura pelo VHC^(167,172,176). Nossa casuística demonstrou que 46 % dos pacientes com infecção pregressa apresentavam unicamente o anti-HBcAg como marcador sorológico. Esta proporção foi bem maior do que aquela relatada por Cacciola (20%) e Wedemeyer (21%)^(138,177). Por outro lado, mais se aproximou das prevalências descritas por Sagnelli et al.⁽¹⁷⁸⁾, em um estudo transversal realizado com 185 portadores de infecção crônica pelo VHC – 47,6%; e pelos seguintes autores: Giannini et al.⁽¹³⁷⁾ – 54,2% e De Maria et al.⁽¹³³⁾ – 41,1%; sendo os dois primeiros estudos italianos.

Muito tem se discutido sobre o real significado dessa entidade nos últimos anos, especialmente no cenário da hepatite C crônica^(177,178). Suspeita-se que a produção do anti-HBsAg poderia estar reduzida pela própria atividade replicativa do VHC^(176,177). Tanto a imunidade celular quanto humoral são induzidas pela ativação de células dendríticas. É sabido que na infecção crônica pelo VHC, a função destas células encontra-se comprometida. Ainda, a cascata inflamatória desencadeada pelo VHC seria capaz de reduzir o *pool* de linfócitos B e plasmócitos produtores do anti-HBsAg⁽¹⁷⁷⁾.

Por outro lado, o anti-HBcAg isolado pode compor uma situação onde os títulos do anti-HBsAg decaíram abaixo do nível de detecção com o passar do tempo⁽¹⁶⁹⁾. Sabemos que a resposta imunológica se reduz com os anos, devido essencialmente a alterações funcionais nas células T, com repercussão direta na

produção de anticorpos contra o HBsAg, levando a ausência de sua síntese e/ou redução de sua titulação (anticorpos residuais)⁽¹⁶⁷⁾.

Em regiões de baixa endemicidade e mesmo na associação com a infecção pelo VHC, o anti-HBcAg isolado pode significar um resultado falso-positivo, por reação imunodiagnóstica cruzada^(97,99). Uma das principais razões do falso-positivo é a ativação não específica de linfócitos B prematuros, resultando na produção de moléculas relacionadas de IgA e IgM sem exposição prévia ao VHB⁽¹⁶⁹⁾. Na casuística do nosso estudo, 67,3 % das sorologias apresentaram o índice *cutoff* (S/CO) abaixo de 0,5, desta forma distante do ponto de corte. Contudo, a possibilidade de resultado falso-positivo nestes casos foi real, não sendo possível afastá-la totalmente, uma vez que habitualmente não se identificam fatores de risco para aquisição viral em uma considerável parcela destes indivíduos.

O grupo de estudo foi composto por 98 pacientes, com proporções equivalentes de homens e mulheres e com média de idade de 43,5 anos. As comorbidades mais encontradas foram hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus, não se diferindo da prevalência esperada na população geral. Não houve grande participação de patologias que eventualmente poderiam alterar a evolução da doença e interferir nos objetivos propostos pelo estudo. Portanto, todos estes casos foram elegíveis para as análises propostas.

Os principais fatores de risco relacionados à infecção viral foram a transfusão de sangue / hemoderivados e cirurgia / procedimento invasivo. Estes achados foram compatíveis com a literatura vigente^(5,6,21). Ressalta-se o fato destes procedimentos, especialmente as transfusões, terem sido realizados em grande parcela dos indivíduos antes da década de 90, quando o controle dos hemoderivados relativo ao VHC

deixava a desejar. Ainda, em 38,7% dos casos que relataram transfusão como fator predisponente para infecção houve a coexistência de cirurgia. Aqui, considera-se o primeiro fator como a provável via de transmissão. O fator de risco foi desconhecido em uma considerável parcela dos indivíduos (32,65%). De fato, em cerca de 40% dos indivíduos infectados não é possível a identificação de tais situações predisponentes, sendo que nestes casos a infecção é resultante provavelmente de vias menos evidentes de transmissão parenteral⁽¹⁾.

Como o VHB e o VHC apresentam meios semelhantes de aquisição, não foi possível determinar a época de infecção específica para cada vírus. Nos frequentes casos onde há transmissão parenteral, a infecção simultânea é aceitável, embora seja pouco provável na atualidade, o que nos leva a pensar que o VHB, por ter uma maior facilidade de transmissão pela via sexual e ser mais prevalente que o VHC, provavelmente tenha sido adquirido em outra ocasião, não passível de identificação. Deve-se considerar, ainda, o viés do observador, pois cada profissional médico apresenta uma forma singular de conduzir uma anamnese clínica e o da falsa-resposta, pela possibilidade de ocultação dessas informações por parte do paciente⁽¹⁵⁷⁾.

Em relação ao tabagismo, escolhemos por caracterizá-lo em anos/maço, por ser esta medida capaz de correlacionar a quantidade de cigarros utilizados com o tempo de uso. Registrou-se que 36,7% dos pacientes confirmaram o uso de tabaco. Destes, 41,7% o faziam de forma acentuada. Quanto ao etilismo, 31,6% dos pacientes relataram uso de álcool, atual ou pregresso, sendo que 38,7% utilizaram-no de forma acentuada. Devido à característica transversal do estudo, a definição temporal entre as variáveis de interesse e de desfecho ficou comprometida. Apesar de estas informações

terem sido colhidas antes da biópsia, pode ter havido a redução da relação anos/maço para tabagismo ou da quantidade ingerida de álcool e mesmo a cessação de seu uso até a data do exame anatomopatológico.

Quanto aos marcadores bioquímicos de lesão hepática, a amostra analisada foi constituída por indivíduos com ligeiras alterações na média das transaminases e de enzimas canaliculares. Do mesmo modo, os marcadores sorológicos de função hepática como a albumina e o tempo de protrombina apresentaram valores dentro da faixa de normalidade. A contagem de leucócitos e de plaquetas também apresentou valores normais. Isso denota que a população, em média, foi constituída na sua grande maioria por indivíduos com doença hepática estável e compensada.

Dos pacientes submetidos à biópsia hepática, 46 indivíduos (47%) apresentavam o marcador anti-HBcAg de forma isolada enquanto o restante (52 indivíduos) portava anti-HBsAg e anti-HBcAg. Estes dois subgrupos foram comparados entre si de acordo com a pontuação recebida nos critérios histológicos de estadiamento e graduação necroinflamatória, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos. Desta forma, esses subgrupos constituíram uma só população, que por sua vez foi utilizada para as análises comparativas, agora com pacientes infectados somente pelo VHC [anti-HBcAg (-)]. Sagnelli et al.⁽¹⁷⁹⁾, em um estudo multicêntrico e prospectivo realizado na Itália, compararam 18 casos com infecção crônica pelo VHC e sorologia completa para infecção resolvida pelo VHB (anti-HBsAg e anti-HBcAg) com 26 casos de anti-HBcAg isolado, não encontrando diferenças em relação às lesões necroinflamatórias. Contudo, diferente do nosso estudo, fibrose acentuada foi mais freqüente naqueles com anti-HBcAg isolado (50% x 24%, $p < 0,05$).

Quando comparados com 117 indivíduos mono infectados pelo VHC, emparelhados por frequência em relação ao sexo e idade, a proporção de indivíduos hipertensos foi maior no grupo de infecção pregressa pelo VHB, embora a hipertensão arterial também tenha sido bastante descrita no grupo anti-HBcAg (-). De fato, nossa amostra foi constituída predominantemente por pacientes de maior faixa etária (acima de 40 anos), sendo a hipertensão arterial essencial uma entidade que se inicia principalmente na meia idade, não guardando relação causal direta com a presença do anti-HBcAg⁽¹⁸⁰⁾.

Quanto aos fatores de risco potenciais à aquisição viral, a transmissão através do uso de droga intravenosa foi mais frequente nos pacientes com histórico de infecção pregressa pelo VHB. Este grupo em especial apresenta um maior risco comportamental para aquisição de múltiplas infecções, pois muitas vezes compartilham hábitos considerados de risco como uso de substâncias ilícitas inalatórias, multiplicidade de parceiros sexuais e o uso conjunto de material parenteral (seringas e agulhas)⁽⁹⁵⁾.

Importante relatar que, na nossa amostra, 75% (6 em 8) dos indivíduos com infecção pregressa pelo VHB e histórico de droga intravenosa apresentavam o padrão anti-HBcAg isolado. De maneira semelhante, Grob e Pontisso (1997) apud Grob et al.⁽¹⁷²⁾ demonstraram, em uma amostra de 377 usuários de drogas intravenosas, que 180 pacientes (47%) apresentavam marcadores sorológicos de infecção pelo VHB. Destes, 47% apresentam o anticorpo contra o HBcAg de forma isolada.

Não houve diferença quanto às provas laboratoriais, nas análises de acordo com a presença ou ausência de infecção pregressa pelo VHB. Nossos achados foram compatíveis com os de outros estudos que se propuseram realizar avaliações

semelhantes^(133,137,163,179,181). A proporção de pacientes com hepatite leve-moderada e acentuada foi similar entre os dois grupos, de forma que os achados característicos de fibrose hepática acentuada, como elevação de enzimas hepáticas, plaquetopenia e alargamento do tempo de atividade de protrombina não se evidenciaram em um grupo em detrimento ao outro. De qualquer forma, a presença do anti-HBcAg por si só não parece promover uma atividade inflamatória capaz de elevar os níveis de transaminases ou mesmo alterar a homeostase da síntese de elementos figurados do sangue.

A comparação histológica entre esses dois grupos não demonstrou diferenças estatisticamente significativas relativas aos escores de estadiamento e graduação necroinflamatória, mesmo havendo uma maior proporção de indivíduos infectados pelo genótipo 1 no grupo de mono infectados anti-HBcAg (-). A associação entre o genótipo viral e lesão histológica é tema controverso, de forma que a literatura vigente demonstra resultados conflitantes. Por outro lado, é importante ressaltar que a frequência de indivíduos com histórico de tabagismo e etilismo acentuados, conhecidos fatores de risco independentes de maior dano hepático, foi semelhante entre esses grupos^(18,58).

Do mesmo modo, Myers et al.⁽¹³⁶⁾ não identificaram diferenças na atividade inflamatória, fibrose avançada e na taxa de progressão de fibrose em 51 pacientes com infecção pregressa pelo VHB quando comparados com 81 pacientes mono infectados pelo VHC. Porém esse mesmo estudo detectou uma tendência, embora não estatisticamente significativa, a uma maior prevalência de cirrose entre os pacientes anti-HBcAg (+).

De forma oposta, De Maria et al.⁽¹³³⁾ evidenciaram uma maior prevalência de anti-HBcAg em pacientes cirróticos e Giannini et al.⁽¹³⁷⁾ descreveram uma maior frequência de marcadores de infecção pregressa pelo VHB, especialmente anti-HBcAg isolado, em pacientes cirróticos quando comparados com portadores de hepatite C crônica com menores graus de fibrose (57% versus 33%, $p=0,03$). Além disso, os pacientes com infecção pregressa apresentaram maior dano estrutural e atividade necroinflamatória.

Os potenciais mecanismos responsáveis por uma atividade necroinflamatória e fibrótica mais acentuada nos indivíduos portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo VHB ainda não foram totalmente elucidados pelos autores que demonstraram este fenômeno. Todavia, a grande maioria aponta para uma teoria imunológica na qual a replicação do VHB, em quantidades pequenas e muitas vezes imperceptíveis, levaria a ativação, via citocinas pró-inflamatórias, de linfócitos T citotóxicos previamente sensibilizados que contribuiriam com sua ação ao dano hepatocítico^(30,163). Além disso, este ataque seria mais intenso quanto menor fosse a exposição a antígenos virais na membrana do hepatócito, levando a uma maior imunoreatividade celular⁽¹⁶³⁾. De fato, o antígeno HBcAg é considerado altamente imunogênico, estimulando resposta de linfócitos T tanto de maneira dependente como independente, além de promover a estimulação de linfócitos B com alta eficiência. Desta forma, a replicação viral do VHB em níveis reduzidos seria consequência da resposta supressora de origem imunológica, num equilíbrio perene entre a resposta imune e a atividade viral^(117,172).

Por outro lado, o controle da replicação do VHB residual parece ser dependente da ação não citolítica por parte dos CTLs, que liberam citocinas capazes

de suprimir a transcrição viral sem provocar dano hepatocelular e, portanto, não acentuam a atividade fibrogênica e necroinflamatória^(30,114). Ainda, formas replicativas do VHB já foram descritas em sítios extra-hepáticos. Desta maneira, traços do VHB de origem não hepatocítica estimulariam continuamente células T específicas que, em contrapartida, preveniriam a disseminação viral e reinfecção de proporção ainda maior de hepatócitos⁽¹⁰¹⁾.

Em relação à análise histológica de marcadores etiológicos, não evidenciamos diferenças entre as frequências encontradas de esteatose, agregados linfóides e agressão ductal, ao contrario de Sagnelli et al.⁽¹⁶³⁾, que descreveram uma maior proporção de agregados linfóides, agressão ductal e apoptose hepatocelular nos portadores de infecção pregressa, sugerindo correlação destes achados com a presença do anticorpo circulante contra o HBcAg.

Realizamos o estudo de possíveis preditores de fibrose avançada (alteração estrutural grau 3 e 4). A escolha das variáveis que comporam o modelo estatístico foi baseada em estudos que comprovaram a plausibilidade biológica das mesmas em promover ou acompanhar o dano histológico hepático^(18,58,62). Muitos destes fatores são bem conhecidos e estão claramente associados à hepatopatia, como a ingestão de álcool. Outros têm papel ainda indefinido quanto a sua real influência negativa em pacientes portadores de hepatite C crônica, como a variável de estudo principal (anti-HBcAg).

A segunda etapa da avaliação foi constituída pela análise multivariada para o ajuste estatístico das variáveis com potencial de confusão. Este modelo foi considerado satisfatório quanto a seu ajuste final, de acordo com o teste de Hosmer-Lemeshow ($X^2=6,654$, 8 graus de liberdade, $p=0,574$) e também útil para a

determinação da variável resposta (fibrose acentuada) baseada nas variáveis explanatórias (R^2 de Nagelkerke=0,5). O cálculo da área sobre a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) obtido foi de 88,23% (IC95% 85,21-91,25), indicando uma boa acurácia discriminatória⁽¹⁵⁵⁾.

Portanto, foram considerados fatores de risco independentes de fibrose hepática avançada para a amostra estudada: tabagismo acentuado (OR 4,40; IC95%: 1,30-14,87), aumento de ALT (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,03), aumento de gamaglutamiltranspeptidase (OR 1,01; IC95%: 1,00-1,01) e leucócitos abaixo de 5.000 / mm³ (OR 7,75; IC95%: 2,13-28,23).

Dentre os fatores ambientais capazes de modificar a evolução natural da hepatopatia causada pelo VHC, o tabagismo vem ganhando força nos últimos anos devido a seu impacto negativo, tanto do ponto de vista inflamatório como fibrótico. Ainda, o tabagismo tem sido correlacionado a um risco seis vezes maior de desenvolvimento de hepatocarcinoma, conseqüente a presença da substância carcinogênica 4-aminobifenil^(77,152,182). A fisiopatologia de sua ação ainda não é totalmente conhecida, porém está associada a efeitos tóxicos diretos e indiretos, incluindo ainda sua ação imunológica e oncogênica. Os efeitos diretos são decorrentes principalmente da metabolização hepática de substâncias citotóxicas como a nicotina, que é rapidamente absorvida pelos alvéolos pulmonares e lançada na corrente sanguínea. Estudos experimentais em ratos demonstraram que essa substância foi capaz de provocar esteatose e necrose hepática focal / confluyente, além de acentuar a lesão celular provocada pelo tetracloreto de carbono, presente no cigarro. A nicotina parece também promover dano através do stress oxidativo

relacionado à peroxidação de lipídeos, capaz de provocar a ativação de células estreladas relacionadas ao processo de fibrogênese^(78,152).

Os efeitos indiretos estão associados às conseqüências da policitemia, que no ambiente hepático promove a sobrecarga de ferro, devido ao catabolismo de hemácias e ao aumento da absorção intestinal estimulada pela síntese de eritropoetina. A nicotina é capaz também de bloquear a proliferação e diferenciação de linfócitos através da inibição da sinalização que promove a ativação de células T CD4+. Além disso, induz a apoptose de linfócitos via cascata Fas-Fas ligante, aumento do número de linfócitos T CD8+ e de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α)⁽¹⁵²⁾.

O aumento das transaminases (AST e ALT) é considerado um dos principais marcadores séricos de lesão hepática e decorre principalmente da perda do controle da permeabilidade dessas substâncias pela membrana celular do hepatócito, produzindo extravasamento para o plasma⁽¹⁸³⁾. Sabe-se que a ALT apresenta maior especificidade para dano hepático devido a sua maior concentração no citosol desse tecido. Ainda, sua elevação parece se correlacionar com a formação de necrose periportal^(60,184). Contudo, em pacientes cirróticos e com hepatopatia alcoólica, parece haver inversão da relação entre essas enzimas, com um aumento proporcionalmente maior da AST em comparação a ALT devido a uma redução do clareamento dessa substância pelas células sinusoidais ou por disfunção mitocondrial^(6,183,185).

A gamaglutamiltranspeptidase, que está presente nos hepatócitos e no epitélio biliar, tem sido classificada como um marcador sorológico de fibrose hepática, especialmente de etiologia viral. Sua associação com fibrose acentuada bem como necrose hepatocítica já foi demonstrada no nosso meio, em um estudo realizado no estado de São Paulo^(185a,186). Os motivos para o aumento dos níveis dessa enzima

neste cenário ainda não foram completamente elucidados. Algumas hipóteses foram levantadas, como a própria lesão ductal biliar, freqüentemente presente na hepatite C e o aumento da liberação do fator de crescimento de hepatócitos - uma citocina secretada por células mesenquimais. Este último participa na fibrogênese através da sua ação em células epiteliais e endoteliais, via uma cascata de ativação e inibição de diversas moléculas como TGF α 1, α -2-macroglobulina e haptoglobulina^(136,187). O papel da colestase canalicular como fator desencadeante para o aumento desta enzima constitui assunto controverso, uma vez que alguns estudos demonstraram que este fenômeno é incomum em pacientes com hepatite C. Ainda, na infecção viral, é possível haver dissociação entre o aumento dos níveis de gamaglutamiltranspeptidase, de fosfatase alcalina e de bilirrubinas^(185a).

Os indivíduos hepatopatas crônicos podem apresentar citopenias, de etiologia multifatorial, muitas vezes proporcional ao grau de lesão estrutural histológica. De fato, um estudo americano populacional envolvendo 16.196 indivíduos, sendo 390 infectados pelo VHC, demonstrou uma maior freqüência de leucopenia, neutropenia e plaquetopenia neste grupo quando comparados com indivíduos não infectados. Na análise multivariada, a sorologia positiva para VHC ficou associada de forma independente a leucopenia (valores abaixo de $2.1 \times 10^9/L$) (OR: 2,09; IC95% 1,08-4,02) e plaquetopenia (OR: 2,33; IC95% 1,08-50,2) de maneira que os autores sugeriram que citopenias de origem indefinida, bem como aumento de transaminases, seriam indicativas para a pesquisa sorológica de infecção pelo VHC⁽¹⁸⁸⁾.

No nosso estudo, é provável que a leucopenia encontrada, em especial a neutropenia, esteja relacionado ao hiperesplenismo, comum em pacientes cirróticos. Este é definido como uma síndrome na qual há esplenomegalia associada à redução

de elementos do sangue periférico, com celularidade normal ou aumentada da medula óssea. É caracterizada por trombocitopenia em maior frequência, seguidas de leucopenia e anemia. Outros possíveis mecanismos relacionados à citopenia seriam a replicação viral no interior de leucócitos periféricos e, mais raramente, o desenvolvimento de neutropenia autoimune, supressão medular e síndromes mielodisplásicas^(189,190). Ainda, o nosso estudo pode ter sofrido influência de viés de informação relativa à raça, uma vez que a neutropenia parece ser mais freqüente e por muitas vezes constitucional em indivíduos da raça negra^(191,192).

A infecção pregressa pelo VHB não ficou associada ao risco de desenvolvimento de fibrose acentuada, em contraste ao estudo de Metwalli et al.⁽¹⁶⁵⁾ que, na tentativa de se construir um escore capaz de prever a fibrose avançada em pacientes com hepatite C crônica, demonstrou a associação entre sorologia positiva para o anti-HBcAg e alteração estrutural graus 3 e 4, quando controlados à análise multivariada para cofatores como plaquetopenia, albumina sérica, níveis de AST e histórico de transfusão de sangue. Porém, o anti-HBcAg, mesmo considerado variável independente, não foi incluído no modelo final proposto devido ao seu reduzido valor de p e por não aumentar poder preditivo do escore proposto.

Apesar de alguns estudos relatarem o sexo masculino, idade avançada (acima de 40 anos), hiperbilirrubinemia à custa da fração conjugada, hipoalbuminemia, plaquetopenia e necrose em saca-bocado como preditores de cirrose, nossa amostra não foi capaz de evidenciar essas associações de maneira independente^(136,165,184,189). Se a proporção de indivíduos com doença hepática mais avançada fosse maior, talvez conseguiríamos observar tais associações, visto que algumas dessas variáveis geraram

um valor de p muito próximo ao de significância estatística adotado, como o sexo masculino, etilismo e plaquetopenia.

Por outro lado, outras variáveis potencialmente preditoras de fibrose acentuada não foram avaliadas nesse estudo, citando: raça, índice de massa corporal (IMC) e a resistência insulínica (HOMA R)^(18,79). Como o delineamento foi baseado na análise retrospectiva de prontuários médicos, não foi possível a obtenção da descrição destes dados na maioria dos casos. Desta forma, optamos por mantê-los fora do modelo analítico proposto. Contudo, aceitamos que a inclusão dessas variáveis poderia modificar as associações encontradas⁽¹⁶⁵⁾.

Foi possível a determinação do tempo de infecção pelo VHC e da taxa de progressão de fibrose hepática em 93 pacientes, sendo 42 com marcadores de infecção pregressa pelo VHB e 51 monoinfectados pelo VHC. Ambos os valores obtidos foram semelhantes ($p=0,994$ e $p=0,611$, respectivamente), de forma que a presença do anti-HBcAg não promoveu uma progressão mais rápida da fibrose. Igualmente, Myers et al.⁽¹³⁶⁾ não evidenciaram uma progressão acelerada da fibrose hepática quando portadores de hepatite C crônica foram comparados em relação ao status sorológico do anti-HBcAg (0,112 versus 0,125 unidades / ano; $p=0,77$). Neste mesmo estudo, a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier não revelou diferenças na progressão fibrótica de pacientes com ou sem este marcador sorológico ($p=0,83$). Contudo, não conseguimos determinar o tempo de infecção e conseqüentemente a taxa de progressão da fibrose em 118 pacientes (55,6%) pelo fato de não terem sido identificados o modo e a data provável de infecção. A adição destes casos poderia de fato alterar os resultados descritos pelo aumento da amostra analisada⁽¹⁾.

Nesse estudo, consideramos a sorologia positiva para a pesquisa do anticorpo anti-HBcAg como marcador de infecção pregressa. Não realizamos a pesquisa do VHB-DNA em soro e tecido hepático, pois acreditamos que o registro do material genético viral, apesar de ser uma informação valiosa, não é condição necessária para definir a infecção oculta. Logo, alguns estudos demonstraram que apenas a presença do anti-HBcAg, independente da pesquisa genética do vírus, foi capaz de influenciar o grau de lesão hepática^(137,163,179).

De fato, a detecção do VHB-DNA é diretamente influenciada pela sensibilidade da metodologia laboratorial utilizada, pelo sítio onde é feita a sua procura (soro, tecido hepático) e mesmo pela interferência supressiva do VHC sobre a replicação do VHB, o que demandaria um planejamento metodológico diferente do adotado por este estudo^(106,143,179). A procura do material genético do VHB parece ter maior rendimento quando é realizada em tecido hepático, como comprovado por Sagnelli et al.⁽¹⁷⁹⁾ que demonstraram que a pesquisa do VHB-DNA neste compartimento resultou positiva em cerca de 90% dos casos de infecção oculta. De qualquer forma, a presença do anti-HBcAg em pacientes HBsAg (-) é uma pista real de contato pregresso com VHB⁽¹⁸¹⁾.

Quanto à correlação entre a detecção do VHB-DNA e o estudo sorológico do VHB em indivíduos portadores de hepatite C crônica, Sagnelli et al.⁽¹⁷⁹⁾ encontraram o VHB-DNA em 80% dos indivíduos com anti-HBcAg isolado, em 61% dos indivíduos com sorologia completa para infecção resolvida (anti-HBsAg e anti-HBcAg) e em 11% daqueles sem qualquer marcador. Além deste, outros inquiridos sugeriram a possibilidade de se detectar o material genético do VHB independentemente da presença do anti-HBcAg, chegando até 20% em algumas

casuísticas, fortalecendo a hipótese de que a resposta imune humoral contra o VHB pode estar globalmente deprimida nestes pacientes^(137,138). Baseado neste fato, alguns autores preconizam a investigação do DNA viral, ao menos em dois sítios distintos (PMBC e tecido hepático), em pacientes com perfil clínico e laboratorial não explicado somente pela ação do VHC^(140,179).

Quanto ao impacto clínico da detecção do VHB-DNA relativa aos marcadores bioquímicos e histológicos em pacientes infectados pelo VHC com sorologia compatível com infecção pregressa pelo VHB, os resultados obtidos pelos estudos atualmente disponíveis têm sido bastante divergentes. Alguns associaram a gravidade das lesões histológicas à detecção do VHB-DNA, enquanto outros não evidenciaram tais correlações^(138,140,170,193). Quanto à resposta terapêutica, até o momento há carência de estudos prospectivos que analisem o uso combinado de interferon peguilado e ribavirina, associação considerada o padrão ouro no tratamento da hepatite C crônica, em pacientes com e sem a detecção do VHB-DNA. Desta forma, a eficácia farmacológica neste cenário necessita ser totalmente reavaliada⁽¹¹⁴⁾.

São vários os motivos nos quais os estudos fornecem conclusões tão discrepantes: amostras pequenas, fonte e seleção dos casos e controles, tipo de delineamento adotado, diferenças nos métodos laboratoriais para a detecção e quantificação do VHB-DNA, natureza do material testado, análises estratificadas para o anti-HBsAg e anti-HBcAg, critérios diagnósticos distintos, diferentes estágios clínicos de doença hepática, falha no controle de fatores de confusão e perda de seguimento. Possivelmente, com a padronização dos métodos de detecção do VHB-DNA, com especial atenção aos marcadores de transcrição viral (pgRNA), de preferência realizados em tecido hepático (padrão ouro) e PBMC, os resultados

produzidos serão mais fidedignos e reprodutíveis, permitindo a real avaliação do impacto da baixa replicação do VHB nos pacientes cronicamente infectados pelo VHC⁽¹⁷³⁾.

A possível influência negativa da infecção pregressa pelo VHB no curso clínico da hepatite C crônica constitui importante questão a ser avaliada no cenário dos fatores modificadores da história natural desta infecção. Seu esclarecimento definitivo é fundamental, visto a grande prevalência de marcadores sorológicos do VHB encontrada em pacientes infectados pelo VHC. Neste contexto, considerando-se que a maioria dos estudos disponíveis são transversais (prevalência, séries de casos e caso-controle), a melhor abordagem seria através da realização de estudos prospectivos, metodologicamente corretos, com acompanhamento de uma coorte selecionada randomicamente, onde seria possível a mensuração periódica de marcadores sorológicos e laboratoriais. Além disso, estes deveriam incluir a análise de possíveis fatores ambientais e genéticos envolvidos no desenvolvimento de infecção oculta pelo VHB, cirrose e hepatocarcinoma, uma vez que cada vez mais evidências sugerem uma maior incidência de neoplasia neste grupo⁽¹¹⁴⁾. Para a comprovação laboratorial da infecção oculta, o ideal é que estes estudos fossem de caráter multicêntrico, devido à baixa prevalência desta entidade na nossa região.

CONCLUSÕES

A prevalência de marcadores sorológicos de infecção pregressa pelo VHB em pacientes portadores de hepatite C crônica foi de 20%, valor este compatível com os achados de inquéritos realizados em regiões de endemicidade semelhante à deste estudo.

A presença do anti-HBcAg de forma isolada dentre os pacientes com marcadores sorológicos de infecção pregressa pelo VHB foi alta (46%), refletindo uma possível supressão da imunidade humoral contra o VHB frente à replicação ativa do VHC.

A frequência de pacientes com histórico de uso de drogas injetáveis foi maior em pacientes com sorologia compatível com infecção pregressa pelo VHB, sugerindo um comportamento compatível com maior risco para aquisição de múltiplas infecções.

Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao estadiamento e graduação necroinflamatória entre os portadores de hepatite C crônica e infecção pregressa pelo VHB e pacientes monoinfectados pelo VHC.

A taxa de progressão da fibrose hepática foi semelhante entre esses dois grupos. Desta forma, a infecção pregressa pelo VHB não parece acentuar ou acelerar o dano histológico hepático em pacientes portadores de hepatite C crônica no nosso meio, indicando um possível controle não citotóxico da replicação residual do VHB, caso o mesmo esteja presente nos hepatócitos.

A análise multivariada revelou os seguintes preditores de fibrose hepática acentuada: tabagismo acentuado, aumento dos níveis de ALT, aumento dos níveis de gamaglutamiltranspeptidase e contagem de leucócitos abaixo de $5.000 / \text{mm}^3$. O anti-HBcAg não foi considerado fator de risco independente na amostra estudada. A variável plaquetopenia aproximou-se do valor de p adotado, enquanto a atividade histológica periportal maior que 2 manteve-se sem significância estatística.

ANEXO A: Reação em cadeia pela polimerase para o VHC (Nested PCR)

O sangue dos pacientes foi coletado por punção venosa a vácuo, com uso de tubo seco de 10 ml. Destas amostras foram separados os soros, em prazo máximo de 4 horas após colheita, por centrifugação a 1.500 rpm/10min, aliqüotados e conservados a -70°C até o uso.

A) Região 5'NC – VHC:

O teste da nested PCR-HCV, método "*in-house*" tem por base a detecção da região 5'NC do genoma do VHC.

Para a PCR, foram utilizados iniciadores de seqüência da região 5'NC do genoma viral; os dois pares de iniciadores, internos e externos, utilizados na reação foram os relatados por Garson et al.⁽¹⁹⁴⁾, como descritos abaixo.

PTC1- 5'CGT TAG TAT GAG TGT CGT G3'

NCR2-5'ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT3'

PTC3- 5'AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG3'

NCR4-5'CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT3'

B) Extração do RNA e síntese do DNA complementar (cDNA) do VHC:

O RNA do VHC foi extraído a partir de 100 µl de soro somados a 250 µl de Trizol LS (*Gibco BRL*). Após rápida agitação, acrescentou-se 50 µl de Clorofórmio (ChCl₃) e o tubo foi submetido novamente a agitação vigorosa. Em seguida, a solução foi centrifugada por 5 minutos. Com a separação da fase aquosa, transferida

para um novo tubo contendo 300 µl de Isopropanol, houve uma centrifugação de 10 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado resultante lavado com Etanol.

Após a retirada do volume líquido, com a secagem completa do Etanol residual, o precipitado de RNA foi submetido a uma reação de Transcrição Reversa para obtenção do cDNA.

Os componentes da solução para a Transcrição Reversa foram:

5µl de tampão 5x concentrado para enzima Transcrição Reversa (*Gibco BRL*)

2µl de dithiothreitol (DTT) 0,1 M (*Gibco BRL*)

2µl de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM

(*Pharmacia Biotech*)

1µl de inibidor de ribonuclease clonado (*Gibco BRL*) 10U/µl

1µl de enzima Transcrição Reversa (*Super Script II - Gibco BRL*)

0,5µl de iniciador NCR2 a 50pmol/µl

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 25µl

A reação de Transcrição Reversa ocorreu a uma temperatura de 42°C por

60 minutos, seguido por 15 minutos a 95°C.

O cDNA resultante foi submetido a nested-PCR nas seguintes condições:

Primeira amplificação:

Ao volume de 10µl de cDNA, foi adicionado 40µl de uma solução contendo:

5µl de tampão da enzima Taq-DNA-polimerase 10x concentrado (*Gibco BRL*)

2µl de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10mM

(Pharmacia Biotech)

1,2µl de MgCl₂, 50mM (*Gibco BRL*)

0,5µl de iniciador (externo) PTC1 á 50 pmol/µl

0,5µl de iniciador (externo) NCR2 á 50pmol/µl

0,5µl de enzima Taq-DNA-polimerase (*Gibco BRL*)

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 40µl

Este cDNA foi submetido ao primeiro ciclo de amplificação, em termociclador automático (*Pharmacia LKB-Gene ATAQ Controler*), de acordo com as seqüências de tempo e temperatura descritas a seguir na Tabela 1A.

Tabela 1A - Ciclos de temperatura e tempo da reação *nested* PCR

Temperatura	Tempo	Número de ciclos
94°C	40 seg	25 vezes
55°C	40 seg	
Seguidos por		
72°C	7 min	1 vez

Segunda amplificação:

Ao volume de 5 µl resultante da primeira amplificação, foi adicionado 45 µl de uma solução contendo:

5 µl de tampão da enzima Taq-DNA-polimerase 10x concentrado (*Gibco BRL*)

3 μ l de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTP) 10 mM

(*Pharmacia Biotech*)

1,2 μ l de $MgCl_2$, 50 mM (*Gibco BRL*)

0,5 μ l de iniciador (interno) PTC3 á 50 pmol/ μ l

0,5 μ l de iniciador (interno) NCR4 á 50 pmol/ μ l

0,5 μ l de enzima Taq-DNA-polimerase (*Gibco BRL*)

Água Milli-Q, tratada com DEPC até completar o volume de 45 μ l

Os ciclos de temperatura foram os sugeridos para o primeiro ciclo de amplificação (Tabela 1A).

Somente o produto da segunda amplificação foi submetido à corrida eletroforética, em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo (*Gibco BRL*) e visualizado através de radiação ultravioleta. A positividade, ou seja, a presença de fragmentos amplificados foi evidenciada com a visualização de uma banda fluorescente localizada a altura de 187 pb. Foi utilizado, como referência, padrão de peso molecular de 100 pb (Figura 1A).

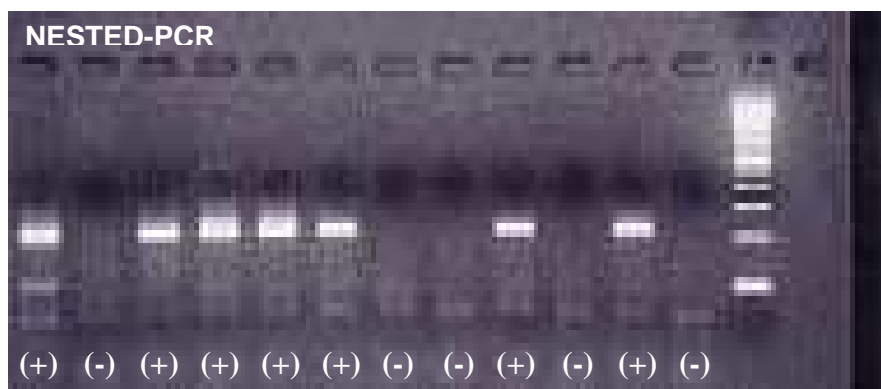


Figura 1A - Resultados da PCR em gel de agarose corados com brometo de etídeo

Genotipagem

Quando há indicação de início de terapêutica antiviral, a realização de genotipagem tem sua importância tanto para a definição da formulação de interferon a ser utilizada, quanto para prever a probabilidade de resposta sustentada.

Genotipagem (INNO-LIPA HCV) Versant (Siemens, Tarrytownny, USA)

Este teste determina *in vitro* o diagnóstico dos genótipos do VHC de 1 a 6 e seus subtipos 1a-c, 2a-d, 3a-f, 4a-k, 5a e 6a. O princípio do método é a hibridação reversa sendo utilizado na reação o produto gerado pelo teste AMPLICOR HCV monitor (Roche Diagnostic, Mannheim) baseado na região 5'NC do VHC.

Os reagentes devem estar à temperatura ambiente.

A) Hibridização (Banho-maria com agitação a 50°C)

Foi adicionado 10 µl da solução desnaturante a 10 µl do produto amplificado e homogeneizado com a pipeta em canaletas padronizadas pelo fabricante.

Incubou-se durante 5min a temperatura ambiente e adicionou-se 2 ml da solução de hibridização, as fitas de nitrocelulose marcadas foram colocadas na solução, tendo-se o cuidado de estarem totalmente submersas.

As canaletas foram então encubadas em banho-maria sob agitação por 1 hora a 50°C.

B) Lavagem (Banho-maria com agitação a 50°C)

O líquido das canaletas foi aspirado com bomba a vácuo. As fitas foram lavadas duas vezes com 2 ml da solução de lavagem e agitou-se manualmente por 1 minuto.

Adicionou-se 2 ml da solução de lavagem e incubou-se em banho-maria sob agitação por 30 minutos a 50°C.

Durante a incubação foram preparadas a solução rinse (1:5 em água destilada) e o conjugado (1:100 em diluente do conjugado fornecido).

C) Desenvolvimento de cor (agitação a temperatura ambiente)

A solução de lavagem foi aspirada e as fitas foram lavadas duas vezes com a solução de rinse, para cada lavagem foi agitado por 1 minuto.

A solução de rinse foi aspirada e adicionou-se 2 ml do conjugado diluído e incubou-se sob agitação por 30 minutos.

A solução de rinse foi aspirada e as fitas foram lavadas duas vezes com solução de rinse e uma vez com diluente de substrato, após cada lavagem foi agitado por 1 minuto.

O diluente do substrato foi aspirado e adicionou-se 2 mL do Substrato Diluído e incubou-se por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente.

O substrato diluído foi aspirado e as fitas foram lavadas com água destilada duas vezes com agitação de 3 minutos após cada lavagem.

ANEXO B: Ficha para coleta de dados**IDENTIFICAÇÃO:**

NOME (INICIAIS): _____

REGISTRO: _____

SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO: _____

ANO PRIMEIRA SOROLOGIA PARA VHC: _____

ANO PROVÁVEL DA INFECÇÃO PELO VHC [SE DISPONÍVEL]: _____

SOROLOGIA PARA VHB: anti-HBcAg RELAÇÃO S/CO: _____ anti-HBsAg PRÉ VACINAL anti-HBsAg INDEFINIDO**VACINAÇÃO PARA VHB:** SIM NÃO INDEFINIDA**COMORBIDADES:** HAS DM HTLV OUTRO: _____**FATORES DE RISCO PARA AQUISIÇÃO DO VHC:** TRANSFUSÃO DE SANGUE – ANO: _____ CIRURGIA OU PROCEDIMENTO INVASIVO – ANO: _____ USO DE DROGA INJETAVÉL USO DE DROGA INALATÓRIA TATUAGEM / PIERCING CONTATO SEXUAL DE RISCO EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL CONTATO INTRADOMICILIAR PORTADOR DE VHC**ETILISMO ^a:** PREGRESSO ATUAL LEVE-MODERADO ACENTUADO INDETERMINADO**TABAGISMO ^b:** PREGRESSO ATUAL LEVE-MODERADO ACENTUADO INDETERMINADO**CARACTERÍSTICAS INFECÇÃO PELO VÍRUS C:**GENÓTIPO: _____ INDEFINIDO**EXAMES LABORATORIAIS PRÉ-TRATAMENTO:**

DIA/MÊS/ANO:	DIA/MÊS/ANO:	DIA/MÊS/ANO:
AST/ALT:	AST/ALT:	AST/ALT:
FA/ γ gt:	FA/ γ gt:	FA/ γ gt:
BT/D:	BT/D:	BT/D:
PT/ALB:	PT/ALB:	PT/ALB:
TAP/INR:	TAP/INR:	TAP/INR:
LEUCOGRAMA:	LEUCOGRAMA:	LEUCOGRAMA:
PLAQUETAS:	PLAQUETAS:	PLAQUETAS:

BX HEPÁTICA:

MÊS/ANO: _____

AE: ___ IIP: ___ APP: ___ AP: ___

MARCADORES ETIOLÓGICOS:

ESTEATOSE (GRAU): ___

A. LINFÓIDES: ___

A. DUCTAL: ___

OUTROS: _____

MÊS/ANO: _____

AE: ___ IIP: ___ APP: ___ AP: ___

MARCADORES ETIOLÓGICOS:

ESTEATOSE (GRAU): ___

A. LINFÓIDES: ___

A. DUCTAL: ___

OUTROS: _____

TRATAMENTO REALIZADO POR PERÍODO MÍNIMO PRECONIZADO: SIM NÃO

DATA TÉRMINO DO TRATAMENTO: _____

a. Leve-moderado (ingestão < 40 g de etanol / dia homens e 20 g / dia mulheres), acentuado (ingestão > 40 g dia homens e 20 g / dia mulheres).

b. Leve-moderado, acentuado (acima de 20 anos / maço).

REFERÊNCIAS

- 1 Guirao AA, Yuste SR, Regueiro BJ. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(4):264-76.
- 2 Lin L, Verslype C, van Pelt JF, van Ranst M, Fevery J. Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(12):1311-9.
- 3 Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine*. 1999;17(13-14):1730-3.
- 4 Shiffman ML. Chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 2004;24(2):1-2.
- 5 Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):1-16.
- 6 Afdhal NH. Natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis*. 2004;24(2):3-8.
- 7 Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13(17):2436-41.
- 8 Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):96-102.
- 9 Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):41-9.
- 10 Crockett SD, Keeffe EB. Natural history and treatment of HBV and HCV virus coinfection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2005;13(4):13.

-
- 11 Ibarra, RT. Treatment of HBV–HCV coinfection. *Annals of Hepatology*. 2006; 5(1): S49-S52.
 - 12 Alter H. Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology. *Am J Med*.1999;107(6B):16S-20S.
 - 13 Mandel, GL; Bennet, JE; Dolin, R. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious disease*. 6. ed, New York, Churchill Livingstone, 2005.
 - 14 Berk PD. Introduction Hepatitis C: The Virus that Created Hepatology. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):1-2.
 - 15 Pavio N, Lai MM. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci*. 2003;28(3):287-304.
 - 16 Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*. 1999;6(1):35-47.
 - 17 Dehesa-Violante R, Nuñez-Nateras R. Epidemiology of Hepatitis Virus B and C. *Archives of Medical Research*. 2007;38(6):606-611.
 - 18 Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1699-714.
 - 19 Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(9):558-67.
 - 20 Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmissíveis. *Hepatitis virais* [site da Internet]. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=25340.

Acessado em 10 de julho de 2008.

- 21 de Araújo ES, Mendonça JS, Barone AA, Gonçalves FL Jr, Ferreira MS, Focaccia R, Pawlotsky JM. Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the management and treatment of hepatitis C. *Braz J Infect Dis*. 2007;11(5):446-50.
- 22 Rosini, N., et al., Seroprevalence of HBsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis*. 2003;7(4):262-7.
- 23 Focaccia R. *Prevalência das hepatites virais A, B, C e E. Estimativa de prevalência na população geral da cidade de São Paulo, medida por marcadores séricos, em amostragem populacional estratificada com sorteio aleatório e coleta domiciliar* [Tese de Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.
- 24 Quaglio GL, Lugoboni F, Pajusco B, Sarti M, Talamini G, Mezzelani P, Des Jarlais DC; GICS. Hepatitis C virus infection: prevalence, predictor variables and prevention opportunities among drug users in Italy. *J Viral Hepat*. 2003;10(5):394-400.
- 25 Wong T, Lee SS. Hepatitis C: a review for primary care physicians. *CMAJ*. 2006;174(5):649-59.
- 26 Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gible J, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 1996;334:1691-1696.
- 27 Ferreira-Gonzalez A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis*. 2004;24(2):9-18.

-
- 28 Raimondo G, Brunetto MR, Pontisso P, Smedile A, Maina AM, Saitta C, Squadrito G, Tono N; Associazione Italiana Studio Fegato Cooperative Group. Longitudinal evaluation reveals a complex spectrum of virological profiles in hepatitis B virus/hepatitis C virus-coinfected patients. *Hepatology*. 2006;43(1):100-7.
- 29 Branch AD. Hepatitis C virus RNA codes for proteins and replicates: does it also trigger the interferon response? *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):57-68.
- 30 Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):215-29.
- 31 Barth H, Liang TJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology*. 2006;44(3):527-35.
- 32 Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):103-26.
- 33 Simmonds P, Smith DB, McOmish F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS, Holmes EC. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol*. 1994;75(5):1053-61.
- 34 Gowans EJ. Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis*. 2000;20(1):85-102.
- 35 Araya V, Rakela J, Wright T. Hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology*. 1997;112(2):575-82.
- 36 Thomas CH, Lemon S, Zucherman A. *Viral hepatitis*. 3 ed, Blackwell Publishing, 2005.

-
- 37 Racanelli V, Manigold T. Presentation of HCV antigens to naive CD8+T cells: why the where, when, what and how are important for virus control and infection outcome. *Clin Immunol.* 2007;124(1):5-12.
- 38 Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern Med.* 2006;45(4):183-91.
- 39 Golden-Mason L, Rosen HR. Natural killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transpl.* 2006;12(3):363-72.
- 40 Herzer K, Sprinzl MF, Galle PR. Hepatitis viruses: live and let die. *Liver Int.* 2007;27(3):293-301.
- 41 Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194(10):1395-406.
- 42 Bantel H, Lügering A, Poremba C, Lügering N, Held J, Domschke W, Schulze-Osthoff K. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2001;34(4-1):758-67.
- 42 Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, Walker CM. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2003;197(12):1645-55.
- 43 Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and CD8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology.* 2003;37(3):577-89.

-
- 44 Lai ME, Mazzoleni AP, Argioli F, De Virgili S, Balestrieri A, Purcell RH, Cao A, Farci P. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet*. 1994;343(8894):388-90.
- 45 Nascimbeni M, Mizukoshi E, Bosmann M, Major ME, Mihalik K, Rice CM, Feinstone SM, Rehermann B. Kinetics of CD4+ and CD8+ memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J Virol*. 2003;77(8):4781-93.
- 46 Bowen DG, Walker CM. Mutational escape from CD8+ T cell immunity: HCV evolution, from chimpanzees to man. *J Exp Med*. 2005;201(11):1709-14.
- 47 Cox AL, Mosbrugger T, Mao Q, Liu Z, Wang XH, Yang HC, Sidney J, Sette A, Pardoll D, Thomas DL, Ray SC. Cellular immune selection with hepatitis C virus persistence in humans. *J Exp Med*. 2005;201(11):1741-52.
- 48 Timm J, Lauer GM, Kavanagh DG, Sheridan I, Kim AY, Lucas M, Pillay T, Ouchi K, Reyor LL, Schulze zur Wiesch J, Gandhi RT, Chung RT, Bhardwaj N, Klenerman P, Walker BD, Allen TM. CD8 epitope escape and reversion in acute HCV infection. *J Exp Med*. 2004;200(12):1593-604.
- 49 Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trépo C, Inchauspé G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*. 2001;120(2):512-24.
- 50 Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med*. 2000;191(9):1499-512.

-
- 51 Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2002;169(6):3447-58.
- 52 Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.* 2004;113(7):963-72.
- 53 Kuo G, Choo Q-L, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science.* 1989;244(4902):362-364.
- 54 Brandão Ajacio Bandeira de Mello, Fuchs Sandra Costa, Silva Mauro Alberto dos Anjos, Emer Letícia Fanck. Diagnosing hepatitis C in clinical practice: a literature. *Rev Panam Salud Publica.* 2001;9(3):161-168
- 55 Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology.* 2002;122(6):1554-68.
- 56 Anonymous. Management of hepatitis C. *NIH Consensus Statement.* 1997;15:1-41.
- 57 Bouchardeau F, Cantaloube JF, Chevaliez S, Portal C, Razer A, Lefrère JJ, Pawlotsky JM, De Micco P, Laperche S. Improvement of Hepatitis C Virus (HCV) Genotype Determination with the New Version of the INNO-LiPA HCV Assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1140-5.
- 58 Delahooke TE. Hepatitis C: What is the nature of the problem? *J Viral Hepat.* 2004;11 Suppl 1:5-11.

-
- 59 Alberti A, Benvegnù L, Boccato S, Ferrari A, Sebastiani G. Natural history of initially mild chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis.* 2004;36(10):646-54.
- 60 Akkaya O, Kiyici M, Yilmaz Y, Ulukaya E, Yerci O. Clinical significance of activity of ALT enzyme in patients with hepatitis C virus. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(41):5481-5.
- 61 Shiffman ML, Stewart CA, Hofmann CM, et al. Chronic infection with hepatitis C virus in patients with elevated or persistently normal serum alanine aminotransferase levels: comparison of hepatic histology and response to interferon therapy. *J Infect Dis.* 2000;182:1595-1601.
- 62 Massard J, Ratziu V, Thabut D, Moussalli J, Lebray P, Benhamou Y, Poynard T. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2006;44(1):S19-24.
- 63 Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, Di Martino V, Bedossa P, Opolon P. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: detection and significance. *Semin Liver Dis.* 2000;20(1):47-55.
- 64 Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology.* 1997;112:463-472.
- 65 Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2001;34(5):730-9.
- 66 Tovo PA, Pembrey LJ, Newell ML. Persistence rate and progression of vertically acquired hepatitis C infection. European Paediatric Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis.* 2000;181:419-424.

-
- 67 Kim WR, Gross JBJ, Poterucha JJ, et al. Outcome of hospital care of liver disease associated with hepatitis C in the United States. *Hepatology*. 2001;33:201–206.
- 68 Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, et al. A comparison of the spectrum of chronic hepatitis C virus between Caucasians and African Americans. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:469-473.
- 69 Bonacini M, Groshen MD, Yu MC, et al. Chronic hepatitis C in ethnic minority patients evaluated in Los Angeles County. *Am J Gastroentero*. 2001;96:2438–2441
- 70 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis. *Hepatology*. 2000;31:828-833.
- 71 Gutierrez-Reyes G, Gutierrez-Ruiz MC, Kershenovich D. Liver fibrosis and chronic viral hepatitis. *Arch Med Res*. 2007;38(6):644-51.
- 72 Adinolfi LE, Gambardella M, Andreana A, Tripodi MF, Utili R, Ruggiero G. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. *Hepatology*. 2001;33(6):1358-64.
- 73 Rubbia-Brandt L, Fabris P, Paganin S, et al. Steatosis affects chronic hepatitis C progression in a genotype specific way. *Gut*. 2004;53:406-412.
- 74 Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1996;23:1334-1340.
- 75 Bhattacharya R, Shuhart MC. Hepatitis C and alcohol: interactions, outcomes, and implications. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36(3):242-52.

-
- 76 Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*. 1997;349:825-32.
- 77 Pessione F, Ramond MJ, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, Rueff B, Valla DC, Degos F. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001;34(1):121-5.
- 78 Hézode C, Lonjon I, Roudot-Thoraval F, Mavier JP, Pawlotsky JM, Zafrani ES, Dhumeaux D. Impact of smoking on histological liver lesions in chronic hepatitis C. *Gut*. 2003;52(1):126-9.
- 78a Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, et al. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2008;134:432-439.
- 79 Björnsson E, Angulo P. Hepatitis C and steatosis. *Arch Med Res*. 2007;38(6):621-7.
- 80 Brunt EM, Ramrakhiani S, Cordes BG, Neuschwander-Tetri BA, Janney CG, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Concurrence of histologic features of steatohepatitis with other forms of chronic liver disease. *Mod Pathol*. 2003;16(1):49-56.
- 81 Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter? *Gut*. 2006;55(1):123-30.
- 82 Hwang SJ, Luo JC, Chu CW, et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C virus infection: prevalence and clinical correlation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16:190-195.

-
- 83 Coral G, Mattos AA, Mattos AZ, Santos DE. Esteatose e esteatohepatite não-alcoólica nos pacientes com hepatite crônica pelo vírus da hepatite C. *Arq. Gastroenterol.* 2006; 43(4):265-268.
- 84 Fartoux L, Poujol-Robert A, Guéchet J, Wendum D, Poupon R, Serfaty L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut.* 2005;54(7):1003-8.
- 85 Walsh MJ, Jonsson JR, Richardson MM, et al. Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut.* 2006;55:529–535.
- 86 Urbani S, Amadei B, Fisicaro P, et al. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology.* 2006;44:126-139.
- 87 Sterling RK, Sulkowski MS. Hepatitis C virus in the setting of HIV or hepatitis B virus coinfection. *Semin Liver Dis.* 2004;24(2):61-8.
- 88 Graham CS, Baden LR, Yu E, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2001;33:562-569.
- 89 Weber R, Sabin CA, Friis-Moller N, et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. *Arch Intern Med.* 2006;166:1632-1641.
- 90 Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H, Mueller N.A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis.* 2000;181(1):35-41.

-
- 91 Milagres, FAP. *Coinfecção pelo vírus da hepatite C (VHC) e vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 ou 2 em ambulatório de referência de São Paulo. Avaliação epidemiológica, clínica, laboratorial e histológica* [Dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.
- 92 Kamal SM, Bianchi L, Al Tawil A, et al. Specific cellular immune response and cytokine patterns in patients coinfecting with hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*. 2001;184:972–982.
- 93 Alter MJ. Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 2003;23(1):39-46.
- 94 Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):97-107.
- 95 Lok AS, McMahon BJ; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45(2):507-39.
- 96 Souto FJD. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. *Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva*. 1999;18(4):143-150.
- 97 Focaccia R. *Tratado de Hepatites Virais*. 2 ed, Rio de Janeiro, Atheneu, 2007.
- 98 Fonseca JC. Natural history of chronic hepatitis B. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(6):672-7.

-
- 99 de Araújo ES, Barone AA, Junior FL, Ferreira JS, Focaccia R. I consensus for the management and treatment of hepatitis B carried out by the Brazilian society of infectious diseases. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(1):2-5.
- 100 Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Semin Liver Dis.* 2003;23(1):5-20.
- 101 Rehermann B. Immune responses in hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis.* 2003;23(1):21-38.
- 102 Lu X, Block T. Study of the early steps of the Hepatitis B Virus life cycle. *Int J Med Sci.* 2004;1(1):21-33.
- 103 Ganem D; Prince, Alfred M. Mechanisms of Disease: Hepatitis B Virus Infection - Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med.* 2004;351(12):351.
- 104 Harrison TJ. Abstract Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Semin Liver Dis.* 2006;26(3):304-5.
- 105 Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion.* 2008;48(5):1001-26.
- 106 Lin ZM, Yatsunami H, Daikoku M, Hamada R, Nakao R, Fukuda M, Koga M, Yano M. Hepatitis B virus of genotype C persistence after recovery from acute hepatitis B virus infection in Japan. *Hepatol Res.* 2003;25(3):244-253.
- 107 Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol.* 2005;42(3):302-8.

-
- 108 Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 2008;48(2):335-52.
- 109 Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Litwin S, Furman PA, Jilbert AR, Mason WS. Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol.* 2001;75(1):311-22.
- 110 Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology.* 2006;44(3):694-702.
- 111 Michalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1994;94(2):907.
- 112 Ribeiro RM, Lo A, Perelson AS. Dynamics of hepatitis B virus infection. *Microbes Infect.* 2002;4(8):829-35.
- 113 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, Siu CW, Sander TJ, Bourne EJ, Hall JG, Condey LD, Lai CL. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology.* 2004;39(6):1694-701.
- 114 Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007;46(1):160-70.
- 115 Yuki N, Nagaoka T, Yamashiro M, Mochizuki K, Kaneko A, Yamamoto K, Omura M, Hikiji K, Kato M. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology.* 2003;37(5):1172-9.

-
- 116 Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo RP. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology*. 1998;27(6):1736-42.
- 117 Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*. 1996;2(10):1104-8.
- 118 Chemin I, Trépo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol*. 2005;34(1):S15-21.
- 119 Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterol*. 2007;13(43):5682-6.
- 120 Prince AM, Lee DH, Brotman B. Infectivity of blood from PCR-positive, HBsAg-negative, anti-HBs-positive cases of resolved hepatitis B infection. *Transfusion*. 2001;41(3):329-32.
- 121 Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M, Ueda Y, Tanaka K, Shimotohno K, Chiba T. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology*. 2000;31(2):488-95.
- 122 Carreño V, Bartolomé J, Castillo I, Quiroga JA. Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. *Rev Med Virol*. 2008;18(3):139-57
- 123 Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fiscicarò P, Penna A, Di Vincenzo P, Giuberti T, Orlandini A, Raffa G, Pollicino T, Raimondo G, Ferrari C, Missale G. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1470-81.

-
- 124 Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda SK. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: full-length genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology*. 2004;127(5):1356-71.
- 125 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750–1758.
- 126 Vivekanandan P, Kannangai R, Ray SC, Thomas DL, Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin Infect Dis*. 2008;46(8):1227-36.
- 127 Wands JR. Prevention of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1567-70.
- 128 Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxi A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Villa E, Raimondo G. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*. 2004;126(1):102-10.
- 129 Squadrito G, Pollicino T, Cacciola I, Caccamo G, Villari D, La Masa T, Restuccia T, Cucinotta E, Scisca C, Magazzu D, Raimondo G. Occult hepatitis virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cancer*. 2006;106(6):1326-30.
- 130 Alencar RS, Gomes MM, Sitnik R, Pinho JR, Malta FM, Mello IM, Mello ES, Bacchella T, Machado MC, Alves VA, Carrilho FJ. Low occurrence of occult hepatitis B virus infection and high frequency of hepatitis C virus genotype 3 in hepatocellular carcinoma in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(3):235-40.

-
- 131 Dumoulin FL, von dem Bussche A, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, Spengler U. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology*. 2003;305:260-266.
- 132 Zarski JP, Bohn B, Bastie A, Pawlotsky JM, Baud M, Bost-Bezeaux F, Tran van Nhieu J, Seigneurin JM, Buffet C, Dhumeaux D. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J Hepatol*. 1998;28(1):27-33.
- 133 De Maria N, Colantoni A, Friedlander L, Leandro G, Idilman R, Harig J, Van hiel DH. The impact of previous HBV infection on the course of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(12):3529-36.
- 134 Pontisso P, Gerotto M, Ruvoletto MG, Fattovich G, Chemello L, Tisminetzky S, Baralle F, Alberti A: Hepatitis C genotypes in patients with dual hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol*. 1996;48:157-60.
- 135 Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Galimany R, Esteban R, Guardia J: Role of hepatitis B, C, and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology*. 2001;34:404-10.
- 136 Myers RP, De Torres M, Imbert-Bismut F, Ratziu V, Charlotte F, Poynard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a comparison with prothrombin time, platelet count, and age-platelet index. *Dig Dis Sci*. 2003;48(1):146-53.
- 137 Giannini E, Ceppa P, Botta F, Fasoli A, Romagnoli P, Ansaldi F, Durando P, Risso D, Lantieri PB, Icardi GC, Testa R. Previous hepatitis B virus infection is associated with worse disease stage and occult hepatitis B virus infection

-
- has low prevalence and pathogenicity in hepatitis C virus-positive patients. *Liver Int.* 2003;23(1):12-8.
- 138 Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med.* 1999;341(1):22-6.
- 139 Fukuda R, Ishimura N, Hamamoto S, Moritani M, Uchida Y, Ishihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y. Co-infection by serologically-silent hepatitis B virus may contribute to poor interferon response in patients with chronic hepatitis C by down-regulation of type-I interferon receptor gene expression in the liver. *J Med Virol.* 2001;63(3):220-7.
- 140 Nirei K, Kaneko M, Moriyama M, Arakawa Y. The clinical features of chronic hepatitis C are not affected by the coexistence of hepatitis B virus DNA in patients negative for hepatitis B surface antigen. *Intervirology.* 2000;43(2):95-101.
- 141 Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Ortiz-Movilla N, Platero C, López-Alcorocho JM, Pardo M, Castillo I, Carreño V. Hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) can coinfect the same hepatocyte in the liver of patients with chronic HCV and occult HBV infection. *J Virol.* 2005;79(24):15578-81.
- 142 Ikeda K, Saitoh S, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I, et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation in 2215 patients. *J Hepatol.* 1998;28:930-938.
- 143 Tanaka T, Inoue K, Hayashi Y, Abe A, Tsukiyama-Kohara K, Nuriya H, Aoki Y, Kawaguchi R, Kubota K, Yoshiba M, Koike M, Tanaka S, Kohara M.

-
- Virological significance of low-level hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C virus associated liver disease. *J Med Virol.* 2004;72(2):223-9.
- 144 Branco F, Mattos AA, Coral GP, Vanderborght B, Santos DE, França P, Alexandre C. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma in Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2007;44(1):58-63.
- 145 Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 34, de 28 de setembro de 2007. Dispõe sobre Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C. Diário Oficial da União, Brasília (DF). 2007;28 set; Seção 1.
- 146 Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med.* 2001;344(7):495-500.
- 147 Colloredo G, Guido M, Sonzogni A, Leandro G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *J Hepatol.* 2003;39(2):239-44.
- 148 Guido M, Rugge M. Liver fibrosis: natural history may be affected by the biopsy sample. *Gut.* 2004;53(12):1878.
- 149 Gayotto, L., Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. Projeto do Clube de Patologia Hepática da Sociedade Brasileira de Patologia aprovado pela Sociedade Brasileira de Patologia. *Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva.* 2000;(19):137-141.
- 150 Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med.* 2006;354(1):54-66.
- 151 Berenstein, CK. *Doença hepática gordurosa não alcoólica: avaliação histopatológica em biopsias por agulha e concordância interobservador*

- [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- 152 El-Zayadi AR. Heavy smoking and liver. *World J Gastroenterol*. 2006;12(38):6098-101.
- 153 Cunha AC; Freddi MJAL; Crestana MF; Aragão MS; Cardoso SC; Lombardi VV. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. 2. ed. São Paulo: SBD-FMUSP; 2005.
- 154 Hosmer JR, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. New York: John Wiley & Sons; 1989.
- 155 Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 14: Logistic regression. *Crit Care*. 2005;9(1):112-8.
- 156 Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2003;11(1):7-31.
- 157 Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. *Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.
- 158 Manegold C, Hannoun C, Wywiol A, Dietrich M, Polywka S, Chiwakata CB, Günther S. Reactivation of hepatitis B virus replication accompanied by acute hepatitis in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2001;32(1):144-8.
- 159 Coppola N, Felaco FM, Sagnelli E. Clinical expression of 'silent' hepatitis B virus infection in a patient with visceral leishmaniasis. *Infection*. 2001;29(3):166-9.

-
- 160 Carpenter PA, Huang ML, McDonald GB. Activation of occult hepatitis B from a seronegative patient after hematopoietic cell transplant: a cautionary tale. *Blood*, 2002;99(11):4245-6.
- 161 Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, Zetterman RK, Pruett TL, Ishitani MB, Hoofnagle JH. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Gastroenterology*, 1997;113(5):1668-74.
- 162 Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchet P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology*, 2001;34(1):194-203.
- 163 Sagnelli E, Pasquale G, Coppola N, Scarano F, Marrocco C, Scolastico C, Santantonio T, Gentile A, Piccinino F. Influence of chronic coinfection with hepatitis B and C virus on liver histology. *Infection*, 2004;32(3):144-8.
- 164 Cavaleiro NP. *Análise dos sorotipos do VHC identificados em pacientes da cidade de São Paulo, através de método imunoenzimático* [Dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1999.
- 165 Metwally MA, Zein CO, Zein NN. Predictors and noninvasive identification of severe liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 2007;52(2):582-8.
- 166 Gonçalves Jr FL. Avaliação clínicoepidemiológica prospectiva de candidatos a doadores de sangue anti-HCV reagentes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1999;32(3):315-317.

-
- 167 Colomina-Rodríguez J, González-García D, Burgos-Teruel A, Fernández-Lorenz N, Guerrero-Espejo A. Significance of hepatitis B core antibody as the only marker of hepatitis B infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23(2):80-5.
- 168 Knöll A, Hartmann A, Hamoshi H, Weislmaier K, Jilg W. Serological pattern "anti-HBc alone": characterization of 552 individuals and clinical significance. *World J Gastroenterol.* 2006;12(8):1255-60.
- 169 Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol.* 2001;64(3):312-9.
- 170 Silva C, Gonçalves NS, Pereira JS, Escanhoela CA, Pavan MH, Gonçalves FL Jr. The influence of occult infection with hepatitis B virus on liver histology and response to interferon treatment in chronic hepatitis C patients. *Braz J Infect Dis.* 2004;8(6):431-9.
- 171 Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LM, Castelo A. The biological meaning of anti-HBC positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2003;45(3):137-40.
- 172 Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, Hess G, Hüdig H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol.* 2000;62(4):450-5.
- 173 Vitale F, Tramuto F, Orlando A, Vizzini G, Meli V, Cerame G, Mazzucco W, Virdone R, Palazzo U, Villafrate MR, Tagger A, Romano N. Can the serological status of anti-HBc alone be considered a sentinel marker for detection of occult HBV infection? *J Med Virol.* 2008;80(4):577-82.

-
- 174 Gonçalves Jr. FL, Boccato RBS, Pedro RJ, et al. Prevalências do HBsAg, do anti-HBc e do anti-HCV na população de candidatos a doadores de sangue do hemocentro-Campinas. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993;35:45-51.
- 175 Cruz CFN. *Estudo de doadores de sangue com a presença do anticorpo anti-HBc sérico como marcador isolado de infecção pelo vírus da hepatite B* [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1997.
- 176 Greub G, Frei PC. Isolated antibody to hepatitis B core is associated with hepatitis C virus co-infection. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6(11):629.
- 177 Wedemeyer H, Cornberg M, Tegtmeyer B, Frank H, Tillmann HL, Manns MP. Isolated anti-HBV core phenotype in anti-HCV-positive patients is associated with hepatitis C virus replication. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(1):70-2.
- 178 Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Mogavero AR, Filippini P, Piccinino F. HCV genotype and "silent" HBV coinfection: two main risk factors for a more severe liver disease. *J Med Virol*. 2001;64(3):350-5.
- 179 Sagnelli E, Imperato M, Coppola N, Pisapia R, Sagnelli C, Messina V, Piai G, Stanzione M, Bruno M, Moggio G, Caprio N, Pasquale G, Del Vecchio Blanco C. Diagnosis and clinical impact of occult hepatitis B infection in patients with biopsy proven chronic hepatitis C: a multicenter study. *J Med Virol*. 2008;80(9):1547-53.
- 180 Parrilli G, Manguso F, Orsini L, Coccoli P, Vecchione R, Terracciano L, De Luca N, Cirillo N, Abazia C, Budillon G, Marchesini G. Essential hypertension and chronic viral hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2007;39(5):466-72.
- 181 Sagnelli E, Pasquale G, Coppola N, Marrocco C, Scarano F, Imperato M, Sagnelli C, Scolastico C, Piccinino F. Liver histology in patients with HBsAg

-
- negative anti-HBc and anti-HCV positive chronic hepatitis. *J Med Virol.* 2005;75(2):222-6.
- 182 Wang LY, Chen CJ, Zhang YJ, Tsai WY, Lee PH, Feitelson MA, Lee CS, Santella RM. 4-Aminobiphenyl DNA damage in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients and controls. *Am J Epidemiol.* 1998;147(3):315-23.
- 183 Giboney PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician.* 2005;71(6):1105-10.
- 184 Boccato S, Pistis R, Noventa F, Guido M, Benvegnù L, Alberti A. Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2006;13(5):297-302.
- 185 Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(1):44.
- 185a Silva IS, Ferraz ML, Perez RM, Lanzoni VP, Figueiredo VM, Silva AE. Role of gamma-glutamyl transferase activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19(3):314-8.
- 186 Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ.* 2005;172(3):367-79.
- 187 Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T; MULTIVIRC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet.* 2001;357(9262):1069-75.

-
- 188 Streiff MB, Mehta S, Thomas DL. Peripheral blood count abnormalities among patients with hepatitis C in the United States. *Hepatology*. 2002;35(4):947-52.
- 189 Bashour FN, Teran JC, Mullen KD. Prevalence of peripheral blood cytopenias (hypersplenism) in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(10):2936-9.
- 190 Deutsch M, Dourakis SP. Chronic hepatitis C virus infection and haematological diseases: how established is the link? *Haema*. 2004;7(4):456-462.
- 191 Renou C, Harafa A, Bouabdallah R, Demattei C, Cummins C, Rifflet H, Muller P, Ville E, Bertrand J, Benderitter T, Halfon P. Severe neutropenia and post-hepatitis C cirrhosis treatment: is interferon dose adaptation at once necessary? *Am J Gastroenterol*. 2002;97(5):1260-3.
- 192 Soza A, Everhart JE, Ghany MG, Doo E, Heller T, Promrat K, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH. Neutropenia during combination therapy of interferon alfa and ribavirin for chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5):1273-9.
- 193 Hui CK, Lau E, Wu H, Monto A, Kim M, Luk JM, Lau GK, Wright TL. Fibrosis progression in chronic hepatitis C patients with occult hepatitis B co-infection. *J Clin Virol*. 2006;35(2):185-92.
- 194 Garson J, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook J, Parker D, Barbara JJ, Contreras M, Aloysius S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet*. 1990;335(8703):1419-22.