

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

ALESSANDRA COUTINHO DE FARIA

**INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES COM
HEPATOPATIA ACOMPANHADOS EM CENTRO DE REFERÊNCIA DE MINAS
GERAIS**

Belo Horizonte

2016

ALESSANDRA COUTINHO DE FARIA

**INFECÇÃO OCULTA PELO VÍRUS DA HEPATITE B EM PACIENTES COM
HEPATOPATIA ACOMPANHADOS EM CENTRO DE REFERÊNCIA DE MINAS
GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Coorientador: Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier

BELO HORIZONTE

2016





Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências aplicadas à saúde do adulto

- Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez
- Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida
- Pró-Reitora de Pós-Graduação: Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira
- Pró-Reitora de Pesquisa: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

- Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes
- Vice-Diretor: Prof. Humberto José Alves
- Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
- Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Edson Samesima Tatsuo

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

- Chefe: Profa. Valéria Maria Augusto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

- Coordenadora: Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
- Subcoordenadora: Prof^a. Suely Rezende Meireles
- Colegiado:
 - Prof^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari
 - Prof. Paulo Caramelli
 - Prof^a. Gilda Aparecida Ferreira
 - Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade
 - Prof^a. Rosângela Teixeira
 - Prof^a. Suely Meireles Rezende
 - Mônica Maria Teixeira (representante discente)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e serenidade para superar as adversidades.

Aos meus pais, José Eurico e Marlene e irmãos, Andréia e Gustavo, pelo amor e apoio infinitos.

Ao Daniel e à Gabriela por entenderem as minhas ausências e por estarem sempre ao meu lado.

À Fernanda e Ana Carolina pelo suporte fundamental no laboratório.

Aos meus orientadores, professora Teresa e professor Marcelo, pelo suporte, incentivo e compreensão.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A infecção oculta pelo vírus da hepatite B é definida pela presença do ácido desoxirribonucleico (DNA) do vírus da hepatite B (HBV) no fígado de indivíduos com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) indetectável. A infecção oculta pelo HBV foi associada ao risco de transmissão do vírus por meio de hemotransusão ou transplante hepático e à possibilidade de reativação endógena da hepatite B pós imunossupressão, além de ter sido associada a maior progressão de hepatopatias crônicas e ao desenvolvimento do hepatocarcinoma. A prevalência da hepatite B oculta no Brasil e a relevância clínica dessa condição ainda não são conhecidas completamente. O objetivo do estudo foi avaliar a presença do HBV DNA em pacientes portadores de hepatopatias de etiologias diversas no estado de Minas Gerais. Cento e quatro indivíduos portadores de hepatopatia, nos quais o HBsAg foi indetectável no soro, foram investigados para a presença do HBV DNA em tecido hepático por meio de *nested-polymerase chain reaction* (*nested-PCR*), utilizando-se dois protocolos diferentes para comparação. Quatorze entre 84 pacientes tinham o anticorpo para o antígeno do core (anti-HBc) detectável e 47 pacientes apresentavam todos os marcadores do HBV negativos. A HBO foi detectada em 6,7% dos 104 indivíduos investigados (considerando-se HBO apenas os casos que foram positivos nos dois protocolos). O primeiro protocolo testado identificou 13 casos em 104 e o segundo protocolo 9 casos. Ao lado das diferenças na prevalência da infecção pelo VHB em diferentes regiões, variações na técnica de PCR utilizada para amplificação do HBV-DNA podem levar a modificação na sensibilidade e especificidade do método explicando as diferenças de prevalência da HBO identificada em diferentes estudos. Há necessidade de melhor padronização do método diagnóstico utilizado para a identificação da HBO.

Palavras-chave: hepatite B oculta, HBV DNA, doença hepática crônica, *nested-PCR*.

ABSTRACT

Long-lasting persistence of hepatitis B virus (HBV) deoxyribonucleic acid (DNA) in the liver of individuals who lack detectable hepatitis B surface antigen (HBsAg) in serum is termed occult hepatitis B virus infection (OBI). This condition may influence several clinical situations including HBV transmission by blood transfusion and organ transplantation, and endogenous viral reactivation post immunosuppression. Furthermore, OBI may contribute to the progression of other chronic liver disease, and is supposed to be a risk factor for hepatocellular carcinoma development. The prevalence and clinical importance of this condition in Brasil are not known. We undertook a study to evaluate the occurrence of OBI in patients with liver diseases. We examined 104 patients HBsAg-negative with different liver diseases, for the presence of HBV DNA by *nested*-polymerase chain reaction (nested-PCR) performed in liver tissue using two different previously published protocols. Fourteen patients had detectable antibodies to the HBV core antigen (anti-HBc); 47 were negative for all HBV markers. OBI was diagnosed in 6.7% of the 104 patients (considering OBI only the cases in whom HBV DNA was identified by both protocols). The first protocol identified 13 cases in the total of 104 patients and the second protocol identified nine cases. In addition to differences in the prevalence of HBV infection in different regions, variations in the PCR technique used for HBV-DNA amplification may lead to diverse sensitivity and specificity of the method explaining the differences in the prevalence of OBI identified in different studies. It is necessary to better standardize the method used for the diagnosis of OBI.

Keywords: occult hepatitis B virus infection, HBV DNA, chronic liver disease, nested-PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do protocolo de extração do DNA	34
Figura 2 - Gráfico da distribuição dos pacientes do estudo conforme etiologia da hepatopatia de base.....	38
Figura 3 -Gráfico dos resultados do teste sorológico anti-HBc.....	39
Figura 4 - Gráficos de barra dos casos do resultado do teste sorológico anti-HBc pelos grupos etiológicos do estudo.	40
Figura 5 - Histograma do tamanho dos fragmentos de biópsias hepáticas.	40
Figura 6- Gráfico de pontos da distribuição do número de tratos portais.....	41
Figura 7 - Pureza do DNA nas amostras (relação A260/A280)	41
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR do DNA do HBV.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores para detecção do DNA do HBV por nested-PCR - Protocolo 1	35
Tabela 2- Iniciadores para detecção do DNA do HBV por <i>nested</i> -PCR - Protocolo 2	36
Tabela 3- Características dos 104 pacientes HBsAg-negativo incluídos no estudo	38
Tabela 4 - Classificação histológica dos indivíduos investigados segundo a classificação de METAVIR.....	42
Tabela 5- Resultado da PCR de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica.	43
Tabela 6 - Relação entre HBV-DNA e marcadores de infecção prévia pelo HBV.....	44
Tabela 7 - Grau de atividade inflamatória e presença do HBV-DNA	44
Tabela 8- Associação entre PCR positiva para HBV pelo protocolo 1 e biópsia hepática mostrando fibrose grave ou cirrose.....	45
Tabela 9 - Prevalência de anticorpos anti-HBc de acordo com o resultado da PCR segundo o protocolo 2.....	46
Tabela 10 - Comparação dos resultados obtidos na PCR realizada usando 2 protocolos diferentes.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Variáveis de estudo	31
Quadro 2 - Classificação de METAVIR	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina-aminotransferase
Anti-HBs	Anticorpo anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HBc	Anticorpo anti-antígeno do core do vírus da hepatite B
CccDNA	<i>Covalently closed circular</i> DNA
CHC	Carcinoma hepatocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
Gene Pol	Gene que codifica a polimerase do vírus da hepatite B
Gene pré-C/C	Gene que codifica os antígenos do pré-core e do core do vírus da hepatite B
Gene pré S/S	Genes que codificam os antígenos de superfície do vírus da hepatite B
Gene X	Gene que codifica a proteína X do vírus da hepatite B
HBO	Hepatite B oculta
HBV	Vírus da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
Pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pgRNA	RNA pré-genômico
rcDNA	<i>Relaxed circular</i> DNA
RNA _m	RNA mensageiro
NAT	Teste do ácido nucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 HEPATITE B OCULTA	18
3.2 IMPORTÂNCIA DA HEPATITE B OCULTA	19
3.3 PREVALÊNCIA DA HEPATITE B OCULTA NO MUNDO E NO BRASIL.....	20
3.4 ASPECTOS VIROLÓGICOS E CAUSAS DA HEPATITE B OCULTA	22
3.5 DIAGNÓSTICO DE HEPATITE B OCULTA.....	25
3.5.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	25
3.5.2 PCR CONVENCIONAL	26
3.5.3 PCR EM TEMPO REAL (Q-PCR)	26
3.5.4 <i>NESTED</i> -PCR	27
3.5.5 PCR NO DIAGNÓSTICO DE HEPATITE B OCULTA	27
3.5.6 PROTOCOLOS DE PCR PARA DETECÇÃO DO HBV-DNA.....	28
4 METODOLOGIA	31
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	31
4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	31
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	32
4.4 CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS	32
4.5 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	33

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA.....	33
4.7 AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	34
4.7.1 Protocolo 1	35
4.7.2 PROTOCOLO 2	36
4.8 ELETROFORESE	37
4.9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	37
4.10 ANÁLISES DOS DADOS	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS.....	38
5.2 REPRESENTATIVIDADE DAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS	40
5.3 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	42
5.4 NESTED-PCR.....	42
5.4.1 Protocolo 1	42
5.4.2 PROTOCOLO 2	45
5.4.3 Casos de HBO (PCR positiva nos protocolos 1 e 2)	46
5.5 CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DOS CASOS COM PCR POSITIVA PARA HBV-DNA	47
6 DISCUSSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	59
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	61
ANEXO B - FOLHA DE APROVAÇÃO.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância e Justificativa

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) é uma das infecções mais prevalentes no mundo, constitui importante problema de saúde pública e importante causa de morbidade e mortalidade mundiais. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 240 milhões de pessoas sejam cronicamente infectadas pelo HBV. A infecção pelo HBV está fortemente associada ao desenvolvimento de hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC), sendo responsável por cerca de 780.000 mortes anualmente.(1-4)

No Brasil, a partir de 1999, houve aumento na taxa de detecção da hepatite B, atingindo 6,5 casos/100.000 habitantes em 2005.(5) Porém, entre 2004 e 2012 não houve modificação significativa no número total de casos de hepatite B notificados.(6) Entre 1999 e 2011 foram notificados 120.343 casos confirmados de hepatite B no país, sendo a maior parte deles nas regiões Sudeste (36,3%) e Sul (31,6%). Na região Sudeste, segundo o último estudo de prevalência de base populacional realizado entre 2007 e 2008, nas capitais, a prevalência do anticorpo anti-core do HBV (anti-HBc) foi 6,3 % (o anti-HBc é um marcador de exposição ao HBV) e para o antígeno de superfície do HBV (HBsAg) foi 0,3%, classificando esse conjunto como de baixa endemicidade. Em 2010, foram notificados 4.975 casos de infecção pelo HBV no Sudeste (14,1% em Minas Gerais) segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) baseado no Censo 2010.(5) O maior número de notificações nas regiões Sul e Sudeste, comparadas as demais regiões, pode ser atribuído a um melhor sistema de vigilância.(6)

A infecção pelo HBV é usualmente diagnosticada quando o HBsAg é identificado no soro. Entretanto, a possibilidade da persistência do genoma do HBV em indivíduos HBsAg negativo foi claramente demonstrada. Esta forma particular de persistência viral, denominada hepatite B oculta (HBO) foi melhor identificada nos últimos 15 anos, quando a disponibilidade de técnicas de biologia molecular, altamente sensíveis, tornaram possível a descoberta de vários dos seus aspectos virológicos e revelaram possíveis implicações em diferentes contextos clínicos.(7)

A HBO pode ser transmitida por meio de hemotransfusão e transplante de órgãos. Doações de sangue provenientes de indivíduos HBsAg negativo, contendo o DNA do vírus são potencialmente infecciosas e capazes de transmitir o HBV em caso de transfusão de sangue. Doadores de órgãos que são HBsAg negativos mas anti-HBc positivos podem transmitir o HBV para receptores susceptíveis após transplante de órgãos,

particularmente o transplante ortotópico de fígado, sugerindo que o HBV latente no hepatócito poderia ser reativado durante imunossupressão.(4, 7-9)

A condição HBO está relacionada principalmente a forte supressão da atividade viral, na qual a vigilância imune do hospedeiro, provavelmente, exerce papel fundamental. Entretanto, este estado de supressão da atividade viral pode ser descontinuado, levando ao desenvolvimento da hepatite B típica, que frequentemente apresenta curso clínico grave, e, algumas vezes, fulminante. Este evento é usualmente observado em pacientes sob condições de imunossupressão induzida por terapias ou relacionada a doenças que envolvem o sistema imune.(10, 11)

Dados observacionais sugerem que a HBO pode favorecer ou acelerar a progressão de doenças hepáticas crônicas em direção à cirrose. Estudos realizados em diferentes áreas geográficas demonstraram significativa associação entre HBO e doenças hepática graves, particularmente em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite C (HCV).(12)

Outro grande debate envolve a associação entre a persistência do genoma do HBV, na forma oculta, e o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC).(4, 7, 13, 14) Considerando-se que a cirrose é a principal lesão pré-cancerosa do fígado, o possível papel exercido pela HBO na progressão da fibrose hepática poderia ser fator implicado em suas atividades pró-oncogênicas. Além disso, a HBO poderia contribuir para a transformação do hepatócito por meio de mecanismos diretos. O DNA do HBV oculto usualmente persiste indefinidamente como um genoma livre no hepatócito, mantendo sua capacidade de replicação e transcrição, podendo produzir proteínas com propriedades transformadoras. Observações sugerem que a HBO poderia contribuir para a transformação hepatocelular por meio dos mesmos mecanismos tradicionalmente considerados como base para as propriedades tumorigênicas do HBV.(15, 16)

No entanto, a relevância clínica da HBO ainda não é completamente conhecida.(4, 9) O diagnóstico de HBO é realizado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do DNA do HBV. Modificações da técnica de PCR (*nested-PCR* e *PCR-real time*) são utilizadas para aumentar a sensibilidade do método.

Os ensaios de PCR variam entre si no que se refere à sensibilidade e à especificidade e fatores associados ao material biológico em que o DNA é pesquisado podem afetar a taxa de detecção do HBV. Assim, a detecção do HBV-DNA é mais frequente em amostras de tecido hepático ou em células mononucleares do sangue periférico do que no soro ou no plasma. Além disso, amostras de fígado não fixado congelado constituem-se em material melhor para detecção do HBV-DNA do que o tecido embebido em parafina.

Embora a análise do DNA em tecido hepático represente o padrão-ouro para o diagnóstico de HBO, muitos dados sobre essa condição são derivados de estudos em que a pesquisa do HBV-DNA foi feita no sangue periférico, uma vez que a realização de biópsia hepática muitas vezes não é viável por se tratar de procedimento invasivo.

No Brasil, há poucos estudos nos quais se avaliou a prevalência de HBO utilizando-se os atuais critérios de definição de caso. Branco *et al.* investigaram a prevalência de HBO em pacientes com hepatite crônica pelo HCV. Foi realizada pesquisa do HBV-DNA no soro por *nested*-PCR e, em amostra de tecido hepático, o HBV foi pesquisado por imunohistoquímica (que é menos sensível que a PCR).(16) Alencar *et al.* investigaram HBO, no soro e em tecido hepático explantado, por PCR em tempo real, em pacientes com cirrose por HCV.(17) Albuquerque *et al.* verificaram a prevalência de HBO em pacientes em hemodiálise, no estado de Pernambuco, por meio de PCR no soro.(18) Moraes *et al.*, no estado de Goiás, investigaram HBO em indivíduos institucionalizados por transtornos mentais.(19) Ferrari *et al.* investigaram HBO em 68 biópsias de fígado cirrótico explantado, no estado de Minas Gerais, utilizando *nested*-PCR em tecido fresco (não-parafinado).(20)

Dentro deste contexto é que foi planejado o presente estudo, que teve como finalidades investigar a frequência da HBO em pacientes portadores de hepatopatias crônicas que já haviam sido submetidos a biópsia hepática, como parte da propedêutica de rotina. No estudo também se avaliou a PCR como método diagnóstico da HBO. Foram testados dois protocolos diferentes, previamente publicados, de amplificação do HBV-DNA e os resultados encontrados foram comparados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a frequência de HBO em pacientes portadores de hepatopatia.

2.2 Objetivos específicos

1. Pesquisar a presença de HBV-DNA em biópsia hepática parafinada;
2. Associar dados demográficos, história prévia de hemotransfusão, etiologia da hepatopatia e grau de lesão hepática histológica com a ocorrência de HBO;
3. Comparar as frequências da HBO em pacientes com e sem marcadores de infecção prévia pelo HBV;
4. Comparar os resultados de dois diferentes protocolos de PCR para pesquisa de HBV-DNA descritos na literatura.

3 ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

A hepatite B é uma das doenças infecciosas mais comuns no mundo e, a infecção crônica pelo HBV é caracterizada pela persistência do vírus e do HBsAg no soro e pela produção de antígenos virais e do HBV-DNA no fígado.

O HBV está presente no sangue, saliva, sêmen e secreções vaginais de indivíduos infectados, sendo transmitido por meio do contato com esses fluidos corporais. A transmissão vertical perinatal é o modo mais comum de aquisição do HBV no mundo, sobretudo em áreas de alta prevalência. Em áreas de baixa prevalência a transmissão ocorre tipicamente na vida adulta por via percutânea ou contato sexual.

A imunização é o meio mais efetivo de prevenir a infecção pelo HBV e a vacinação oferece mais de 95% de proteção contra o desenvolvimento da infecção crônica.(2)

A infecção crônica pelo HBV é caracterizada por quatro fases, as quais refletem o relacionamento dinâmico entre replicação viral e resposta imune do hospedeiro.

- Fase imuno-tolerante: caracterizada por elevada taxa de replicação viral e atividade inflamatória discreta.

- Fase imuno-ativa com HBeAg positivo: níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT) e de HBV-DNA associados a lesão hepática.

- Fase crônica inativa: níveis baixos ou indetectáveis do HBV-DNA, ALT não elevada e anticorpo anti-HBe (anti-HBe) presente.

- Fase de reativação imune e HBeAg negativo: aminotransferases elevadas e altos níveis séricos de HBV-DNA.

A resolução da infecção crônica pelo HBV é caracterizada pelo desaparecimento do HBsAg e surgimento de anticorpos anti-HBs.(2)

3.1 Hepatite B oculta

A descrição inicial da HBO data do final dos anos 1970, quando surgiram relatos de casos de transmissão do HBV de fontes HBsAg negativas, mas com anticorpos contra antígeno do core do HBV (anti-HBc) positivos. A partir de então, estudos de biologia molecular permitiram identificar o DNA do HBV em indivíduos em que o HBsAg estava indetectável.(4, 21-23)

A HBO é definida pela presença do DNA do HBV em tecido hepático (e, em alguns casos, também no soro) na ausência de HBsAg circulante.(4, 8, 9) Quando o DNA do HBV é detectável no soro, ele está em níveis usualmente muito baixos (<200UI/mL). Os

casos de indivíduos HBsAg negativo, com níveis séricos de DNA do HBV comparáveis àqueles usualmente detectados nos casos de infecção manifesta pelo HBV não são considerados casos de HBO. Esses casos são usualmente devido a variantes do HBV com mutações no gene S, capazes de produzir um HBsAg modificado que não é reconhecido pelos ensaios comercialmente disponíveis. O uso de anticorpos anti-HBs multivalentes nos ensaios para detecção do HBsAg é recomendado para uma melhor detecção dessas variantes. Além disso, a definição de HBO exclui pacientes na fase aguda da infecção pelo HBV em que o HBsAg ainda não apareceu no soro. (4, 8, 9, 12, 23, 24)

A HBO pode ser classificada de acordo com a presença dos outros marcadores da infecção pelo HBV em HBO soropositiva (anti-HBc e/ou anti-HBs positivos) e HBO soronegativa (anti-HBc e anti-HBs negativos).(8, 9)

3.2 Importância da hepatite B oculta

A latência do genoma do HBV é um desafio clínico devido ao risco potencial de reativação endógena da doença em casos de imunossupressão(21, 25-30) e risco de transmissão do HBV por meio de transfusão de hemoderivados(31, 32) ou durante transplante de órgãos. Além desse aspecto, dados observacionais sugerem que a HBO poderia favorecer ou acelerar a progressão de doenças hepáticas crônicas (33) e favorecer o desenvolvimento de CHC.(15, 34-37) Estudos epidemiológicos e moleculares demonstraram que pacientes portadores de doença crônica pelo HCV possuem maior risco de desenvolver CHC diante da presença de HBO.(15, 29, 34-37)

Em indivíduos com HBO, o HBV pode exercer efeitos pró-oncogênicos diretos por meio da ativação dos mesmos mecanismos oncogênicos que são deflagrados no curso de uma infecção com o HBsAg positivo.

Na HBO, assim como nos casos da infecção manifesta pelo HBV, a persistência do DNA nos hepatócitos, seja integrado no genoma do hospedeiro, seja como um epissoma livre, pode manter a capacidade de produzir proteínas, principalmente a proteína X e a proteína truncada pré S-S com propriedades potenciais de induzir transformação maligna.(15, 38-40)

A HBO pode, também, indiretamente favorecer o desenvolvimento do CHC. A persistência de atividade replicativa viral muito baixa poderia induzir leve atividade necro-inflamatória contínua durante a vida, acelerando a progressão da doença hepática crônica em direção à cirrose. A cirrose é considerada um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CHC.(41)

No Japão, um estudo com 26 indivíduos portadores de CHC com os marcadores HBsAg e anti-HCV negativos, foi encontrada prevalência de HBO de 69% (18 casos). Esse estudo não teve grupo controle para avaliar a prevalência da HBO em indivíduos japoneses sem CHC.(42) Ikeda *et al.*, em uma coorte retrospectiva de 82 indivíduos com cirrose, HBsAg e anti-HCV negativos, encontraram associação positiva entre a presença do DNA do HBV no soro e o desenvolvimento de CHC.(43)

No Egito, foi reportado prevalência de HBO de 63% entre 40 casos de CHC estudados (todos os 40 casos tinham o HBsAg negativo). Nesse país a prevalência de HBO em doadores de sangue era, naquele período, 1,26%.(44)

Em 2011, uma metanálise envolvendo 16 estudos observacionais evidenciou associação positiva entre HBO e aumento do risco de CHC.(37)

Em uma coorte recente, avaliou-se a evolução clínica de pacientes com hepatite C crônica de acordo com a presença ou ausência de HBO. Os participantes foram seguidos por cerca de 11 anos e foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em termos de desfechos clínicos. CHC ocorreu mais frequentemente em indivíduos com HBO (35% nos casos HBO positivos vs 8,7% nos casos HBO negativos, $p < 0,01$). Os indivíduos com HBO apresentaram frequência maior de cirrose hepática descompensada e tiveram taxa de sobrevida acumulada mais curta quando comparados com os indivíduos sem HBO.(45)

Em casos de doença hepática criptogênica, a HBO também foi associada a maior progressão da fibrose hepática e ao desenvolvimento do CHC.(14, 38)

Alguns estudos demonstraram que tanto o DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) do HBV como todos os transcritos virais, incluindo o RNA pré genômico (pgRNA), são detectáveis tanto no tecido tumoral como no tecido livre de tumor em indivíduos com CHC portadores de HBO.(15, 38, 46, 47) Apesar desses achados, nos Estados Unidos, um estudo importante envolvendo indivíduos com hepatopatia avançada associada ao HCV não evidenciou associação entre a presença do HBV-DNA oculto no fígado e a ocorrência do CHC. Este estudo envolveu 28 casos de CHC associado ao HCV e 55 controles (casos de hepatopatia associada ao HCV, mas sem tumor) e a técnica utilizada para pesquisa da HBO foi a PCR-*real time*.(48)

3.3 Prevalência da hepatite B oculta no mundo e no Brasil

A prevalência de HBO encontrada nas diversas séries de casos varia amplamente. Essas discrepâncias aparentemente ocorrem, em parte, em função da falta de uniformidade metodológica e da grande variabilidade em termos de sensibilidade e

especificidade das técnicas utilizadas para a detecção da HBO. Outro importante fator que poderia explicar essa variabilidade é a diferença da prevalência da infecção pelo HBV entre as diversas regiões do globo.

Em 1999, um grupo da Universidade de Messina, na Itália, publicou uma série de 200 casos de pacientes portadores de doença hepática pelo HCV e HBsAg não detectável, em que o DNA do HBV foi identificado em biópsia hepática em 66 pacientes (33% dos casos). Dos 66 pacientes em que se detectou o DNA do HBV, 46 (69,6%) tinham anti-HBc positivo. Outro dado importante desse estudo foi o achado de sete (14%) casos de HBO em 50 pacientes avaliados com hepatopatia não associada ao HCV. Vinte e dois de 66 pacientes com infecção pelo HCV e HBO (33%) tinham cirrose comparados com apenas 26/134 (19%) pacientes com infecção pelo HCV na ausência de HBO ($p=0,04$).⁽¹²⁾

Em 2002, foi reportada alta prevalência de HBO em pacientes com cirrose hepática criptogênica em Hong Kong.⁽⁴⁹⁾ No Japão, foram estudados 167 pacientes com hepatite crônica associada ao HCV e HBsAg negativo. O HBV, detectado por *nested* PCR em tecido hepático estava presente em 15% dos casos.⁽³⁵⁾

Em estudo multicêntrico italiano diagnosticou-se HBO em mais de 40% de 89 pacientes portadores do HCV. A prevalência de HBO nos pacientes anti-HBc positivo e anti-HBs negativo foi superior a 80%.⁽⁵⁰⁾

Na China, foi relatada elevada prevalência de HBO tanto em pacientes saudáveis como em pacientes hepatopatas. A prevalência descrita de HBO entre pacientes com CHC foi 70,4% e chegou a 86,7% nos casos em que o anti-HBc estava positivo. Nos pacientes com doença hepática criptogênica, detectou-se HBO em 45/159 (28,3%). Em todos esses 45 casos de HBO, o anti-HBc era positivo. Entre os pacientes sem hepatopatia e HBsAg negativo, foi encontrada HBO em 10,6% dos indivíduos testados.⁽⁵¹⁾ Em outro estudo feito em Hong Kong (área de alta prevalência da infecção pelo HBV), publicado em 2011, avaliou-se a prevalência da HBO em tecido hepático tumoral e adjacência não-tumoral de 61 pacientes com CHC. Encontrou-se prevalência de 73% de HBO em pacientes com CHC e cirrose criptogênica. Observou-se que em 21 dos 30 (70%) pacientes com HBO, o anti-HBc estava positivo. Apenas três (10%) dos pacientes com HBO eram soronegativos para todos os marcadores da hepatite B.⁽²⁸⁾

Nos Estados Unidos, em 55 pacientes portadores de hepatite C crônica e fibrose avançada, foi encontrada prevalência de HBO de 23,6%. No mesmo estudo observou-se HBO em 10,7% de 28 pacientes com HCV e CHC e 44% dos pacientes tinham anti-HBc positivo.⁽⁴⁸⁾

Em Taiwan, local considerado hiperendêmico para a infecção pelo HBV, foi descrito a presença, em fragmento de fígado, do DNA do HBV em 16 de 80 (20%) pacientes anti-HCV positivos/ HBsAg negativos operados para ressecção de CHC.(52)

Estudo envolvendo 196 indivíduos HBsAg negativo com hepatopatias auto-imunes (hepatite auto-imune, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária) evidenciou prevalência de HBO de 12,2% . Nesse estudo, a pesquisa do DNA do HBV foi feita no soro em todos os participantes e em apenas 14/196 (7,1%) foi realizada *nested* PCR em tecido hepático.(53)

Em Portugal, pesquisando-se o DNA do HBV em tecido hepático obtido por biópsia de 100 pacientes portadores do HCV, Cardoso *et al.* encontraram HBO em 57% dos casos.(54) Em uma coorte italiana de 326 portadores de hepatite C crônica, foi descrita prevalência de 39,2% (128/326) de HBO.(45) Na Austrália foi encontrada baixa prevalência (0,69%) de HBO.(55)

No Brasil, Branco *et al.* investigaram a prevalência de HBO em 46 pacientes com hepatite crônica pelo HCV. Foi realizada pesquisa do HBV DNA no soro por *nested* PCR e em amostra de tecido hepático, o HBV foi pesquisado por imunohistoquímica (que é menos sensível do que a PCR). Em 19,5% dos pacientes o DNA do HBV foi detectado em tecido hepático, mas as amostras de soro foram todas negativas.(16) Alencar *et al.* investigaram HBO em 50 pacientes com cirrose por HCV e HBsAg negativo. Em apenas um caso foi detectado HBV DNA no soro e em nenhum foi encontrado HBV DNA em tecido hepático.(17) Albuquerque *et al.* verificaram prevalência de apenas 1,5% de HBO em 752 pacientes HBsAg negativo, em hemodiálise, no estado de Pernambuco. Nesse estudo a pesquisa do DNA do HBV foi feita por PCR no soro e somente foram testados os pacientes em que o anti-HBc foi positivo.(18) No estado de Goiás, Moraes *et al.*, encontraram cinco (9,2%) casos de HBO no soro de pacientes institucionalizados por doenças mentais.(19)

Ferrari *et al.* descreveram 3 (4,4%) casos de HBO em 68 biópsias de fígado cirrótico explantado, no estado de Minas Gerais, utilizando *nested*-PCR em tecido fresco (não-parafinado).(20)

3.4 Aspectos virológicos e causas da hepatite B oculta

O HBV é um vírus DNA hepatotrópico, membro da família dos Hepadnaviridae, vírus capazes de infectar alguns mamíferos e aves, que compartilham semelhante organização genômica, tropismo para alguns órgãos e possuem um ciclo replicativo peculiar.

O genoma do HBV consiste de uma dupla fita de DNA circular forma aberta ou "*relaxed circular DNA*" (rcDNA) de aproximadamente 3200 nucleotídeos, contendo quatro fases de leitura aberta parcialmente superpostas: pré S/S, pré C/C, P e X.(12, 23)

O VHB é classificado em genótipos, os quais diferem-se entre si através de mudanças de no mínimo 8%, nas sequências nucleotídicas da região S. São conhecidos dez genótipos diferentes, denominados de A a J, além de numerosos subgenótipos. Os genótipos do HBV mostram distribuição geográfica e étnica distinta.(56)

Os produtos da translação viral incluem três proteínas de superfície (grande, média e pequena, essa última correspondendo ao HBsAg), o antígeno do core (HBcAg), o antígeno solúvel "e" (HBeAg), a polimerase viral (com ação de transcriptase reversa, DNA polimerase, RNase H e proteína terminal para iniciação) e a proteína X, essencial para a replicação do vírus e capaz de transativar a expressão de numerosos genes celulares e virais.(38)

O ciclo de replicação do HBV é iniciado por uma ligação irreversível do vírus a um receptor ainda não identificado do hepatócito. Em seguida ocorre liberação no citoplasma do nucleocapsídeo do core contendo o rcDNA e seu transporte para a membrana nuclear. Após a liberação do rcDNA no nucleoplasma ele é convertido em um DNA circular covalentemente fechado (cccDNA). O cccDNA é associado às proteínas histonas e não-histonas, sendo então organizado em uma estrutura semelhante a uma cromatina, como um minicromossomo viral. A RNA polimerase II do hospedeiro realiza a transcrição do cccDNA em RNA mensageiro (RNAm). Os produtos da transcrição são exportados do núcleo e, no citoplasma, ocorre a translação desses transcritos do HBV em envelope viral, core, "e", polimerase e proteínas X. Em seguida o RNA pré- genômico (pgRNA) serve como molde para a transcrição reversa gerando novos genomas rcDNA. No retículo endoplasmático o core em replicação é reunido com proteínas de superfície viral e são liberados novos *virions* maduros ou, alternativamente, ocorre reciclagem dos nucleocapsídeos no núcleo para reposição da reserva de cccDNA.(56)

A estabilidade dos minicromossomos de cccDNA viral ao longo da meia vida do hepatócito garante que a infecção pelo HBV, uma vez estabelecida, possa perpetuar indefinidamente.(57, 58)

Assim, a base molecular para a HBO está relacionada com a persistência de longa duração do HBV cccDNA como um epissoma livre, estável e cromatinizado, no núcleo dos hepatócitos infectados.(13, 32, 59)

A HBO pode ser considerada uma fase da história natural da infecção pelo HBV, mas os mecanismos exatos envolvidos em sua ocorrência permanecem relativamente pouco compreendidos.(60)

A HBO está muito associada com a presença de anticorpos anti-HBV, ou seja, anticorpos anti-HBs e anti-HBc, direcionados contra o HBsAg e o antígeno do core viral, respectivamente. No entanto, cerca de 20% dos indivíduos com HBO apresentam todos os marcadores sorológicos negativos para o HBV. A HBO pode ser classificada de acordo com o perfil de anticorpos contra o HBV em HBO soropositiva (anticorpos anti-HBc e/ou anti-HBs positivos) e HBO soronegativa: anticorpos anti-HBc e anti-HBs negativos.(4, 9, 32) Na HBO soropositiva o desaparecimento do HBsAg pode ter ocorrido logo após a resolução da hepatite aguda ou mesmo após anos ou décadas de uma infecção crônica manifesta pelo HBV. Na HBO soronegativa todos os marcadores séricos do HBV podem ter sido progressivamente perdidos ao longo do tempo ou os marcadores séricos podem ter sido negativos desde o início da infecção.(61)

Em apenas pequeno número de casos, a ausência de HBsAg detectável, a despeito da presença do genoma episomal livre do HBV no hepatócito, pode ser atribuída à variabilidade genômica do vírus. As mutações do HBV ligadas a ocorrência de HBO incluem aquelas envolvidas na produção de um HBsAg antigenicamente modificado que não é reconhecido pelos ensaios imunoenzimáticos comercialmente disponíveis, as mutações no gene Pol que levam a um defeito na atividade replicativa e aquelas mutações que levam a uma alteração na produção das proteínas S. O surgimento dessas variantes do HBV portadoras de mutações na região pré S/S é um evento pouco frequente que poderia ser responsável por alguns casos de HBO. Essas mutações podem ocorrer espontaneamente ou em consequência de imunoprofilaxia ou tratamentos antivirais.(24, 32, 62-64) A heterogeneidade genética nos casos de HBO parece ser comparável com os isolados de HBV de indivíduos com a forma manifesta da infecção pelo HBV, na grande maioria das vezes.(65)

Forte evidência sugere que a atividade replicativa do HBV e a expressão gênica em casos de HBO estão fortemente suprimidas. Os mecanismos responsáveis pela baixa replicação viral e baixa expressão gênica não são plenamente conhecidos. A vigilância imune do hospedeiro parece exercer papel fundamental nessa supressão da atividade do vírus. Condições de imunossupressão como malignidades hematológicas, quimioterapia e imunoterapia, podem causar reativação da HBO com o reaparecimento do perfil sorológico típico da infecção manifesta pelo HBV.(4, 21, 25, 26, 31, 32) Esta é uma evidência indireta mas que sugere o papel da resposta imune do hospedeiro no desenvolvimento da HBO.

Estudos demonstram que a memória de células T de longa duração contra antígenos do HBV ainda está presente por vários anos após a resolução de um episódio de hepatite B aguda. Indivíduos com HBO possuem resposta imune celular potente direcionada a antígenos do HBV.(66-69)

Mecanismos epigenéticos podem exercer papel importante na regulação da replicação e transcrição do HBV.(9, 62) O termo epigenética refere-se às mudanças reversíveis e herdáveis no genoma funcional que não alteram a sequência de nucleotídeos do DNA. Os principais mecanismos de alterações epigenéticas são a metilação do DNA, as modificações de histonas e a ação de RNAs não codificadores. As moléculas do cccDNA do HBV estão localizadas nos núcleos dos hepatócitos infectados como minicromossomos estáveis em arranjos de nucleossomas formados por proteínas histonas e não-histonas e, de forma semelhante à cromatina da célula hospedeira, estão sujeitas às mesmas atividades enzimáticas envolvidas no remodelamento da cromatina. A replicação do HBV é regulada pelo estado de acetilação do cccDNA viral ligado às histonas H3/H4. O recrutamento de acetilases das histonas no cccDNA foi relacionado com baixa replicação do HBV (*in vitro*) e baixa viremia (*in vivo*). (32, 57, 64, 70-72)

3.5 Diagnóstico de hepatite B oculta

O padrão-ouro para diagnóstico de HBO é a detecção do DNA do HBV no hepatócito, por meio de técnicas altamente sensíveis e específicas. Para amplificação do DNA do HBV pode ser realizada PCR (*polymerase chain reaction*), PCR em tempo real e *nested*-PCR, com o uso de iniciadores específicos para diferentes regiões do genoma viral.

3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica de amplificação muito sensível para detecção de DNA. Em 1971, foram descritos os primeiros conceitos sobre a técnica de PCR.(73) Porém, somente em meados da década de 80 é que foram publicados os dados experimentais iniciais utilizando esse método diagnóstico.(74-77) Em 1988, foi descrito pela primeira vez o uso de uma polimerase termoestável extraída da bactéria *Thermus aquaticus*. O uso dessa polimerase permitiu que as reações de PCR fossem processadas em temperaturas mais elevadas e simplificou o processo que, anteriormente, exigia a adição de nova alíquota da enzima a cada ciclo de desnaturação da dupla fita de DNA. Além do maior trabalho exigido, havia maior risco de contaminação e maior chance de surgimento de bandas inespecíficas. O uso da enzima termoestável permitiu que o processo se tornasse mais automatizado, pois passaram a ser utilizados termocicladores programáveis em substituição aos banhos usados anteriormente. A enzima termoestável garantiu maior especificidade, mas também, maior sensibilidade, além de permitir a amplificação de fragmentos maiores.(76, 78)

3.5.2 PCR Convencional

O método de PCR é baseado em ciclos repetitivos de três reações simples, nas quais a única variação que ocorre é a temperatura de incubação. As três reações ocorrem em um mesmo tubo na presença de reagentes termorresistentes e os ciclos são automatizados. Para as reações ocorrerem são utilizados os seguintes reagentes: (1) dois iniciadores (*primers*), que são oligonucleotídeos sintetizados para serem complementares às sequências conhecidas do DNA de interesse; (2) quantidade suficiente dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); (3) a enzima Taq DNA polimerase termoestável. Além dos reagentes, são acrescentados tampões para se garantir as condições ideais da reação. O primeiro passo do processo envolve a desnaturação da dupla fita de DNA alvo por meio da elevação da temperatura a 92-95°C. As ligações tipo pontes de hidrogênio são quebradas e as fitas do DNA se tornam fitas simples que permitem a ligação dos iniciadores a sequências complementares. Uma grande vantagem do método de PCR é que o DNA alvo não necessita estar puro ou completo, assim ele pode estar em pequenas quantidades ou mesmo misturado com outros tipos de DNA ou outras substâncias.

O segundo passo do ciclo consiste em redução da temperatura para permitir a ligação dos iniciadores a sequências complementares a ele na fita simples de DNA. A temperatura de ligação varia de 35°C-60°C e depende essencialmente do tamanho e sequência dos iniciadores utilizados. Os iniciadores escolhidos definem as duas pontas da fita de DNA amplificado, eles não devem ligar entre si e os seus sítios de ligação devem ser suficientemente distantes um do outro para permitir a síntese subsequente de novos produtos. O terceiro passo é a síntese de uma nova fita de DNA complementar, que ocorre a 72° C, por ação da enzima DNA polimerase. As três etapas descritas são repetidas por algumas dezenas de vezes e a quantidade de DNA da sequência alvo aumenta de forma exponencial a cada ciclo.(78, 79)

3.5.3 PCR em tempo real (q-PCR)

A PCR em tempo real surgiu como uma possibilidade, ao contrário dos ensaios convencionais de PCR, de detecção dos produtos amplificados (*amplicon*) por visualização durante o processo de amplificação. A monitorização do produto de PCR produzido em tempo real é possível por meio da marcação dos iniciadores, sondas (*probes*) ou do próprio produto de amplificação com moléculas fluorogênicas.

A monitorização em tempo real elimina a necessidade de realização de eletroforese para detecção dos produtos amplificados. Assim, além da redução do tempo

necessário para completar o processo, a técnica de PCR em tempo real minimiza o risco de contaminação cruzada, pois não há manipulação do produto da PCR após a amplificação. Outra vantagem da PCR em tempo real é a possibilidade de quantificação relativa ou absoluta do produto amplificado.

A PCR em tempo real apresenta como desvantagem o alto custo, incapacidade de monitorizar o tamanho do amplificado sem abrir o sistema e a incompatibilidade de algumas plataformas com alguns produtos químicos fluorogênicos.(80)

3.5.4 Nested-PCR

A *nested-PCR*, também conhecida como dupla amplificação é uma modificação da PCR convencional realizada para aumentar a sensibilidade de detecção do DNA. A *nested-PCR* é um ensaio composto de duas PCR convencionais. Inicialmente uma sequência maior de DNA é amplificada utilizando-se um par de iniciadores externos (primeira reação ou reação externa). Para a segunda reação (reação interna) uma amostra do produto obtido da primeira reação é submetida a uma nova PCR para amplificação de uma sequência interna do DNA alvo. Para essa reação são utilizados um par de iniciadores internos em relação à posição de ligação do par utilizado na primeira reação.

Há maior chance de contaminação com a *nested-PCR* um vez que há necessidade de transferência do produto amplificado da primeira reação para um segundo tubo, onde será realizada a reação interna.(33, 81, 82) O uso de iniciadores internos e externos com diferentes temperaturas de ligação, a separação física dos reagentes da segunda reação e o sequestro temporário dos iniciadores da segunda reação são alternativas descritas para permitir que a *nested-PCR* seja realizada em um único tubo e assim minimizar o risco de contaminação externa. Essa técnica conhecida por *nested-PCR* em um único tubo exige uma otimização das concentrações dos reagentes, particularmente as concentrações relativas dos iniciadores internos e externos.(33, 82)

3.5.5 PCR no diagnóstico de hepatite B oculta

O único marcador confiável e universalmente aceito para diagnóstico da HBO é o HBV-DNA. A sensibilidade dos vários ensaios de PCR utilizados na detecção do HBV-DNA é muito variável.(4, 8, 9) Fatores associados ao material biológico em que a pesquisa do DNA é realizada podem afetar a sua taxa de detecção. A estratégia mais sensível e apropriada é a análise do DNA em tecido hepático fresco. Quando comparado com o tecido fresco, as amostras conservadas em formol e embebidas em parafina apresentam menor

índice detecção do HBV-DNA.(8, 9) No entanto, nem sempre é factível realizar biópsia fora das unidades dedicadas ao estudo das doenças hepáticas. Assim, o sangue periférico é usualmente a única amostra disponível para excluir ou confirmar HBO na grande maioria de doadores de hemocomponentes, tecidos ou órgãos. De fato, embora a análise do DNA em tecido hepático represente o padrão-ouro para o diagnóstico de HBO, uma vez que não é viável a realização de biópsias hepáticas em indivíduos saudáveis, muitos dados sobre a HBO são derivados de estudos realizados com amostras de sangue.

Comparado com o soro e plasma as células mononucleares do sangue periférico permitem uma maior detecção do HBV-DNA.(9)

O teste do ácido nucleico (NAT) é ainda o método padrão amplamente utilizado para a prevenção da transmissão do HBV através de hemocomponentes. Entretanto, o NAT não alcançou aplicação fora do contexto dos doadores de sangue. Sua sensibilidade não é absoluta, uma vez que muitos indivíduos não apresentam liberação do DNA viral na corrente sanguínea, de forma regular, apesar da latência intra-hepática.

3.5.6 Protocolos de PCR para detecção do HBV-DNA

Chapel *et al.* descreveram um protocolo de *nested*-PCR para detecção do HBV-DNA em tecido embebido em parafina utilizando iniciadores complementares a uma região conservada dos genes S e Pol. O estudo, realizado na França, incluiu 55 pacientes mas apenas 27 eram HBsAg negativos.(27)

Fang *et al.*, na China, realizaram *nested*-PCR e q-PCR para quantificar os níveis séricos do HBV-DNA no soro de 159 indivíduos com doença hepática crônica criptogênica, 135 casos de CHC e 359 saudáveis. Foram utilizados iniciadores para a região X do genoma do HBV.(51)

Honarkar *et al.*, no Iran, investigaram HBO em 35 biópsias de tecido hepático embebido em parafina, de pacientes com hepatopatias crônicas, por meio de PCR convencional utilizando iniciadores complementares a uma região conservada do gene S.(83)

Sagnelli *et al.*, realizaram na Itália, pesquisa do HBV-DNA por PCR simples no plasma, em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e em tecido hepático fresco congelado. Em 89 pacientes foram detectados 37 casos de HBO. O fígado foi o compartimento em que o HBV-DNA foi detectado com maior frequência (34 casos), seguido das PBMC (23 casos). Apenas 12 casos de HBO foram detectados no plasma.(50)

Obika *et al.* realizaram q-PCR e *nested*-PCR para pesquisar o HBV-DNA em 167 biópsias de fígado não fixado congelado ou conservado em tiocianato de guanidina e foram usadas sequências complementares a três regiões do genoma (S, X e C).(35)

Shetty *et al.* realizaram q-PCR em pacientes cirróticos com hepatopatia associada ao HCV e encontraram 16 (28%) casos de HBO em 56 amostras de soro e 22 (50%) casos de HBO em 44 amostras de fígado explantado. As condições da PCR e os iniciadores utilizados não foram especificados no trabalho.(36)

Nos Estados Unidos, região de baixa prevalência do HBV, Kannangai *et al.* encontraram três (16%) casos de HBO investigando tecido hepático congelado tumoral e adjacência não tumoral em 19 indivíduos com CHC. Todas as amostras foram testadas em duplicata por semi-*nested*-PCR para os genes S e X e q-PCR para os genes S e C. Dos três casos de HBO, o DNA-HBV foi encontrado em dois casos em tecido tumoral e não tumoral e em um caso só foi encontrado em tecido tumoral. Nesse estudo foi realizado o sequenciamento do produto de 672 pb gerado pela semi-*nested*-PCR para o gene S.(84)

Shiota *et al.* realizaram *nested*-PCR no soro de 26 indivíduos com CHC e encontraram pelo menos uma região positiva em 18 (69%) casos e, em três (11,5%) casos, duas regiões positivas, utilizando iniciadores para os genes S, C e X. Dos 26 casos estudados, 14 foram positivos para o gene S.(42)

Ikeda *et al.* realizaram *nested*-PCR com iniciadores complementares às regiões C e X do genoma do HBV no soro de 82 indivíduos com cirrose hepática de etiologia não viral e encontraram nove casos positivos para as duas regiões pesquisadas.(43)

No Brasil, no estado de São Paulo, foi realizada q-PCR no soro e em tecido de explante hepático embebido em parafina, de 50 pacientes com cirrose associada ao VHC e foi encontrado um caso de HBO no soro e nenhum caso de HBO no tecido hepático.(17) No Rio Grande do Sul, foi realizada *nested*-PCR no soro de 66 pacientes com hepatopatia crônica pelo HCV, mas nenhum caso foi positivo para HBO.(16) Em um trabalho com 201 indivíduos anti-HBc positivos em hemodiálise no estado de Pernambuco, foram detectados três casos de HBO por *nested*-PCR no soro. No estudo usaram-se iniciadores complementares às sequências das regiões C e S e nos três casos encontrados, apenas as sequências da região S foram positivas. Os casos positivos foram sequenciados, confirmando os achados.(18) Moraes *et al.*, no estado de Goiás, utilizaram um ensaio de semi-*nested*-PCR no soro para amplificação da região genômica pré-S2/S de indivíduos com transtornos mentais.(19)

Cacciola *et al.* realizaram PCR convencional e *nested*-PCR para HBO em 250 amostras de tecido hepático não fixado congelado de pacientes portadores de hepatopatias. Foram realizadas PCR para as regiões C e S do genoma viral. Os resultados dessas PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e, nos casos negativos, foi realizada a *nested*-PCR com os iniciadores para sequências internas das regiões S e C. Nos casos em que não foram amplificadas ambas as regiões C e S, foi realizada PCR convencional ou

nested-PCR utilizando-se iniciadores complementares à região X do genoma viral. Para definição de caso de HBO, pelo menos duas regiões do genoma deveriam ser amplificadas e, usando-se esse critério, 73 casos foram positivos (dos 73 casos, 35 pacientes foram detectados pela PCR convencional e 38 somente após a *nested*-PCR).(12)

Pollicino *et al.* descreveram um protocolo de investigação de HBO em tecido hepático congelado em 299 casos de hepatopatia crônica, utilizando PCR convencional e *nested*-PCR a qual detectou 131(43,8%) casos positivos para o HBV-DNA.(15) Foram realizados ensaios diferentes para a detecção de quatro regiões do genoma viral (S, C, Pol e X) e foram considerados positivos para o HBV-DNA quando, pelo menos duas regiões do genoma viral estivessem positivas. As condições das reações de PCR foram as mesmas do estudo de Cacciola *et al.*(12)

A partir de um consenso de especialistas, realizado na cidade de Taormina, na Itália, em 2008, propôs-se protocolo semelhante ao de Pollicino *et al.*, com algumas modificações nas sequências dos iniciadores utilizados para amplificação, para a pesquisa da HBO.(9) Diversos outros estudos(20, 45, 65, 71) utilizaram protocolos semelhantes aos propostos por Cacciola *et al.*(12) e Pollicino *et al.*(15)

Assim, o diagnóstico de HBO continua sendo um problema, pois não há uma uniformização do método para detecção do DNA oculto do HBV. Além disso, o tipo de conservação do tecido a ser estudado (parafina ou congelamento) implica diferenças importantes na sensibilidade dos testes.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE 32140914.0.0000.5149) (Anexo A) e os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

As variáveis estudadas estão relacionadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Variáveis de estudo

Variáveis do Estudo	Classificação
Etiologia da hepatopatia de base	Qualitativa nominal
Idade	Quantitativa discreta
Sexo	Qualitativa nominal
Histórico de hemotransfusão	Qualitativa nominal
Anti-HBc total	Qualitativa nominal
Anti-HBs	Qualitativa nominal
Comprimento (cm) do tecido biopsiado	Quantitativa contínua
Número de tratos portais	Quantitativa discreta
Atividade inflamatória segundo METAVIR	Qualitativa ordinal
Grau de fibrose segundo METAVIR	Qualitativa ordinal
Resultado da PCR para HBV - Protocolo 1	Qualitativa nominal
Resultado da PCR para HBV - Protocolo 2	Qualitativa nominal

4.2 Seleção das amostras

Foram selecionadas amostras de biópsia hepática de 104 pacientes adultos, HbsAg negativo, com diagnóstico de hepatopatia de qualquer etiologia, que se submeteram ao procedimento como parte da propedêutica de rotina do Ambulatório de Fígado Clínico, do Instituto Alfa de Gastroenterologia, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período entre janeiro de 2008 e dezembro de 2012.

Os pacientes foram selecionados a partir de um banco de dados elaborado para estudo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa e que se constituiu na tese intitulada: "Perfil sérico de citocinas e seu desempenho na avaliação da inflamação e fibrose hepática em pacientes com hepatopatia crônica" (85) do autor Osvaldo Flávio de Melo Couto sob

orientação da professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari. Dos 225 pacientes incluídos naquele estudo foram excluídos 68 pacientes HBsAg positivo. Cinquenta e três dos 157 pacientes restantes foram excluídos por não preencherem os critérios de inclusão deste estudo ou por apresentarem algum critério de exclusão.

Todas as biópsias hepáticas foram realizadas no Serviço de Radiologia do Hospital das Clínicas da UFMG e foram processadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG). As amostras foram armazenadas em parafina e submetidas ao corte histológico para a confecção das lâminas histológicas, que foram coradas com hematoxilina e eosina.

Além das amostras biológicas parafinadas, foram coletados dados de prontuário e acessados resultados de marcadores prévios de infecção pelo HBV (anti-HBc e anti- HBs). O sangue para determinação desses marcadores e para os exames que refletem lesão ou função hepática foi colhido no momento da biópsia.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram:

- idade igual ou superior a 18 anos e inferior a 75 anos;
- presença de hepatopatia de qualquer etiologia e em qualquer estágio com marcador HBsAg negativo no soro e indicação clínica de realização de biópsia hepática;
- concordância em participar do estudo e assinatura do TCLE.

Foram considerados os seguintes critérios de exclusão:

- história de uso excessivo de álcool;
- infecção pelo vírus da imunodeficiência humana;
- uso de drogas imunossupressoras;
- malignidades hematológicas;
- biópsia hepática fragmentada impedindo a adequada análise histopatológica.

4.4 Classificação dos casos

De acordo com os resultados dos exames complementares pesquisados, principalmente a conclusão dos laudos histopatológicos, os pacientes foram agrupados de acordo com a etiologia da hepatopatia de base nos seguintes grupos:

- 1) Hepatopatia crônica associada ao vírus da hepatite C (HCV);

- 2) Esteatohepatite não alcoólica (EHNA);
- 3) Hepatopatia auto-imune (incluindo hepatite auto-imune, cirrose biliar primária e colangite esclerosante primária) (AI);
- 4) Hepatopatia criptogênica (CRIPTO);
- 5) Hemocromatose (CROMO).

4.5 Graduação histopatológica

As biópsias hepáticas foram analisadas por patologistas especialistas em histologia hepática e os laudos foram acessados para análise. Para fins deste estudo, os resultados histopatológicos foram graduados de acordo com uma adaptação da classificação de METAVIR.(86) A classificação de METAVIR(86) foi proposta inicialmente para se avaliar fibrose e atividade necroinflamatória em indivíduos com hepatite C crônica, mas tem sido amplamente utilizada em outras situações.O Quadro 2 mostra de forma sintética a classificação de METAVIR.

Quadro 2 - Classificação de METAVIR

Atividade histológica	Atividade histológica	Fibrose	Fibrose
A0	Ausente	F0	Ausente
A1	Atividade leve	F1	Fibrose portal sem septos
A2	Atividade moderada	F2	Fibrose portal com raros septos
A3	Atividade intensa	F3	Numerosos septos sem cirrose
		F4	Cirrose

Adaptado de Bedossa *et al.* (86)

4.6 Extração do DNA

Dos blocos de parafina armazenados no Serviço de Anatomia Patológica do HC/UFMG foram realizadas secções de 4µm de espessura. A partir dessas secções dos blocos de parafina, a extração do DNA das amostras embebidas em parafina foi realizada utilizando-se o *kit* Qlamp DNA FFPE Tissue (QUIAGEN, Germany). Além das amostras investigadas também foi realizada extração de DNA de três controles sabidamente negativos e três controles positivos (HBsAg positivo).

Cada amostra recebeu adição de 1mL de xylol e, a seguir, foram submetidas, por 10 segundos a vigorosa agitação. Em seguida foram centrifugadas a 8000Xg (6000 rpm) por dois minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e 1mL de álcool

etílico 96% foi adicionado ao material precipitado. Novamente as amostras foram agitadas por 20 segundos e, em sequência, novamente centrifugadas por dois minutos em alta rotação. Os tubos permaneceram abertos por no mínimo 10 minutos para total evaporação do etanol. Em seguida, foi feita ressuspensão em 180µL de tampão ATL (QIAGEN *tissue kit*) e 20 µL da proteinase K(QIAGEN *tissue kit*) foram adicionados. Novamente, os tubos foram submetidos a agitação, e então, foram incubados por uma hora a 56°C e depois a 90°C por mais uma hora. Após breve centrifugação, 200µL do tampão AL (QIAGEN *tissue kit*) foi adicionado. A seguir, foi feita adição de 200µL de etanol 96% e misturados até completa homogeneização. O lisado foi transferido em conjunto para a coluna QIAmp® (QIAmp MinElute® Column, Germany) para centrifugação a 8000Xg por um minuto. Quinhentos microlitros do tampão AW1 (QIAGEN *tissue kit*) foi adicionado e, a seguir, realizada nova centrifugação. Seguiu-se adição de 500µL do tampão AW2(QIAGEN *tissue kit*) e nova centrifugação por três minutos. A eluição foi feita em 50µL de ATE (QIAGEN *tissue kit*).

As etapas do protocolo de extração do DNA estão representadas na Figura 1.

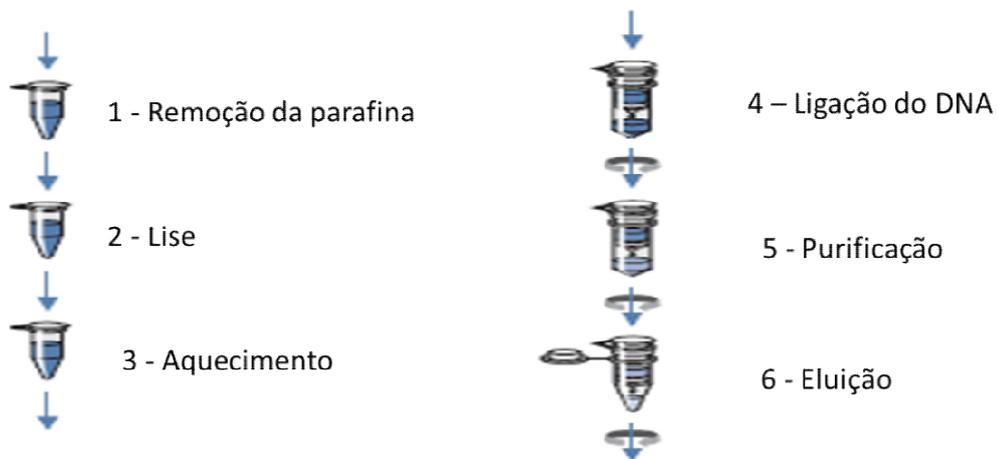


Figura 1 - Etapas do protocolo de extração do DNA

4.7 Amplificação do DNA

Todas as amostras foram testadas segundo 2 protocolos diferentes, previamente publicados. O protocolo descrito por Raimondo *et al.*(9) foi chamado de protocolo 1 e o proposto descrito por Chapel *et al.*(27) foi chamado de protocolo 2.

4.7.1 Protocolo 1

O DNA foi amplificado por meio de *nested*-PCR e os iniciadores escolhidos foram complementares a quatro regiões conservadas do genoma viral (pré S/S, pré-core/core, polimerase e região X) conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores para detecção do DNA do HBV por nested-PCR - Protocolo 1

Regiões genômicas do HBV	Posições dos nucleotídeos
Região S	
S1- F: 5'-CATCAGGATTCCTAGGACCCCT-3'	[168-189]
S2- F: 5'-CTTGTTGACAAGAATCCTCACA-3'	[214-235]
S3-R: 5'- AGGACAAACGGGCAACATAC-3'	[478-458]
S4-R:5'- CCAACAAGAAGATGAGGCATA-3'	[442-420]
Região C	
C5-F: 5'- TCACCTCTGCCTAATCATC-3'	[1825-1843]
C6-F: 5'- TTCAAGCCTCCAAGCTGTGCC-3'	[1862-1882]
C7-R: 5'- GAGGGAGTTCTTCTTCTAGG-3'	[2391-2371]
C8-R: 5'- AGGAGTGCGAATCCCACTCC-3'	[2277-2267]
Região da Polimerase (Pol)	
P9-F: 5'- CGTCGCAGAAGATCTCAATC-3'	[2420-2439]
P10-F: 5'- CCTTGGACTCATAAGGT-3'	[2463-2479]
P11-R:5'- TCTTGTCCCAAGAATATGGT-3'	[2845-2825]
P12-R: 5'- TCCCAAGAATATGGTGACCC-3'	[2839-2820]
Região X	
X13-F: 5'- CGCCAACCTACAAGGCCTTTC-3'	[1100-1120]
X14-F: 5'- CCATACTGCGGAACCTCCTAG-3'	[1266-1685]
X15-R: 5'-GGCGTTCACGGTGGTCTCCAT-3'	[1628-1608]
X16-R: 5'- CGTAAAGAGAGGTGCGCCCC-3'	[1540-1521]

Fonte: Segundo Raimondo *et al.*(9)

Para as reações internas e externas foi utilizado o SuperMix (PCR SuperMix®, Invitrogen, CA, USA). O Supermix consiste em uma mistura pronta para uso de *Taq* DNA polimerase recombinante (22U/mL), TRIS-hidrocloreto (Tris-HCl) (pH 8,4) 22mM, cloreto de

potássio 55mM, cloreto de magnésio 1,65mM, dGTP 220µM, dATP 220µM, dTTP 220µM, dCTP 220µM e estabilizadores.

A primeira etapa da PCR (reação externa) foi realizada em um tubo contendo 14µL de SuperMix®, 0,5µL do iniciador senso, 0,5µL do iniciador anti-senso e 5µL do DNA extraído. Para a segunda etapa da PCR (reação interna), foram utilizados 14µL de Supermix®, 0,5µL do iniciador senso, 0,5µL do iniciador anti-senso e 5µL do produto amplificado na primeira reação. Foram realizadas reações de controle positivo com amostras de indivíduos HBsAg positivos, reações de controle negativo com água e reações de controle da própria reação utilizando beta-globina. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos, cada um consistindo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, ligação dos iniciadores a 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos e uma etapa final de 10 minutos a 72°C.

Para as reações de PCR foi utilizado um termociclador (Programmable Thermal Controller PTC-100™, MJ Research, INC., USA).

4.7.2 Protocolo 2

Os iniciadores usados nesse protocolo estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2- Iniciadores para detecção do DNA do HBV por *nested-PCR* - Protocolo 2

Sequências dos <i>primers</i>	Posição dos oligonucleotídeos
Reação externa	
Primer 14" F: 5'- ATCTTCTTATTGGTTCTTCT-3'	[430-449;pol]
Primer 13" R: 5'- GTTAGGGTTTAAATGTATAC-3'	[845-826;S]
Reação interna	
Primer 06 F: 5'-CTTGGATCCTATGGGAGTGG-3'	[632-651;pol]
Primer 03 R: 5'-CTCAAGCTTCATCATCCATATA-3'	[759-738; S]

Fonte: Segundo Chapel *et al.*(27)

O DNA também foi amplificado por meio de *nested-PCR*. Os iniciadores escolhidos foram complementares a regiões conservadas do genoma do HBV. Utilizaram-se iniciadores para as regiões S e Pol do genoma viral, de acordo com a seguinte ordem: primeira etapa de amplificação, os iniciadores 14/13 foram usados para amplificar uma sequência de 416 pares de bases (bp) localizada em uma região conservada dos genes da polimerase (Pol) e superfície (S). Para a segunda etapa, os iniciadores 06/03 foram usados para reamplificar um segmento de 128pb localizado na sequência de 416pb. Cinco microlitros do DNA extraído foram adicionados a 45µL de Supermix®, 0,5 µL do iniciador

senso e 0,5 µL do iniciador anti-senso. Os parâmetros da reação externa (iniciadores 14/13) foram: desnaturação inicial a 90°C por sete minutos, 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 60 segundos a 47°C, 60 segundos a 74°C e extensão final a 74°C por sete minutos. Cinco microlitros dos produtos da primeira reação foram submetidos a 35 ciclos de uma segunda reação de PCR usando os iniciadores 06/03; os parâmetros desta nova etapa (reação interna) foram: 20 segundos a 94°C, 60 segundos a 57°C e 60 segundos a 74°C para cada ciclo, com uma desnaturação inicial a 90°C e um passo de extensão final a 72°C.

4.8 Eletroforese

Após a realização das reações descritas acima foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida para verificar se o fragmento de interesse foi realmente amplificado por PCR. Dez microlitros do produto da reação interna da *nested*-PCR foram utilizados em cada canaleta do gel. Controles positivos e negativos foram utilizados e tratados como as amostras.

4.9 Interpretação dos resultados

Para fins desse estudo foram considerados casos de HBO aqueles indivíduos que apresentaram positividade no resultado obtido pelos dois protocolos propostos.

4.10 Análises dos dados

Ao término do estudo os dados foram organizados em banco de dados para viabilizar a realização da análise estatística. As variáveis categóricas foram apresentadas como números e porcentagens. As variáveis contínuas foram expressas como média ± desvio padrão. Para análise da diferença entre os grupos foi utilizado o teste Qui-quadrado de *Pearson* ou o teste exato de *Fisher*. Para análise dos dados quantitativos foi realizado teste *t de Student* ou, quando apropriado, o teste de *Mann Whitney*. O grau de concordância entre os testes foi calculado por meio do coeficiente de concordância de *Kappa*. Foi considerado significativo valor $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos e clínicos

Dos 104 pacientes investigados a média de idade foi 47,8 anos (variando de 18 a 73 anos), sendo 57 (54,8%) do gênero feminino e 47 (45,2%) do gênero masculino. A média de idade das mulheres foi $50 \pm 13,8$ anos (variando de 23 a 73 anos) e dos homens foi $45 \pm 10,4$ anos (variando de 18 a 59 anos).

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo encontram-se discriminadas na Tabela 3.

Tabela 3- Características dos 104 pacientes HBsAg-negativo incluídos no estudo

Característica	Valores numéricos (n=104)
Sexo (F/M)	57/47
Idade (média em anos \pm DP)	47,8 \pm 12,6
Transusão de sangue* sim/não	19 (23,5%)/62 (76,5%)
Anti-HBc positivo** sim/não	14 (16,7%)/70 (83,3%)

HBsAg: antígeno de superfície do vírus da hepatite B; DP: desvio padrão, anti-HBc: antígeno do core do vírus da hepatite B.

*dado disponível para 81 pacientes; ** dado disponível para 84 pacientes

A etiologia de base da hepatopatia crônica mais frequente foi hepatite C crônica (Figura 2). Nenhum paciente do estudo tinha o diagnóstico de CHC.

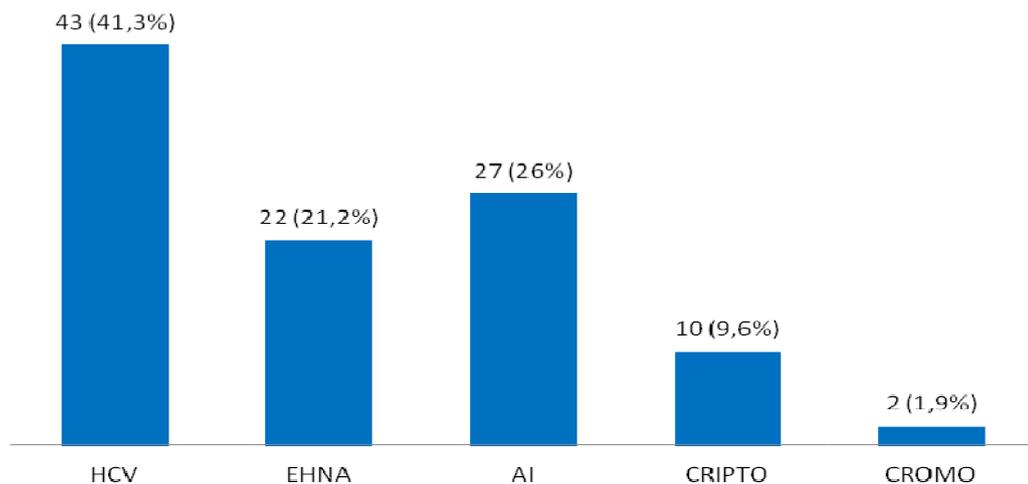


Figura 2 - Gráfico da distribuição dos pacientes do estudo conforme etiologia da hepatopatia de base. HCV: hepatite crônica pelo vírus da hepatite C; EHNA: esteato-hepatite não alcoólica; AI: hepatopatia auto-imune; CRIPTO: doença hepática criptogênica; CROMO: hemocromatose

Em 84 indivíduos, o resultado do anticorpo anti-HBc total estava disponível e destes, 14 (16,7%) apresentaram anti-HBc positivo (Figura 3); anticorpo anti-HBs foi analisado em 83 indivíduos e estava positivo em 37 deles (44,6%); 14 pacientes apresentaram os dois marcadores positivos e 47 apresentaram os dois marcadores negativos .

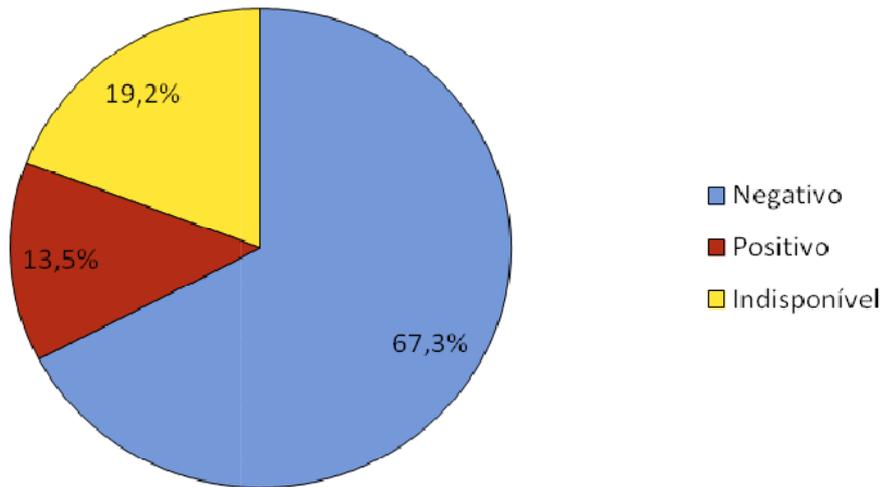


Figura 3 - Gráfico dos resultados do teste sorológico anti-HBc. (Dos 104 indivíduos, foi possível obter o resultado do anti-HBc em 84. Entre os 84 indivíduos, 14 apresentavam o anti-HBc positivo e em 70 o anti-HBc estava negativo.)

A análise dos resultados do teste sorológico anti-HBc pelos grupos etiológicos está ilustrada na Figura 4.

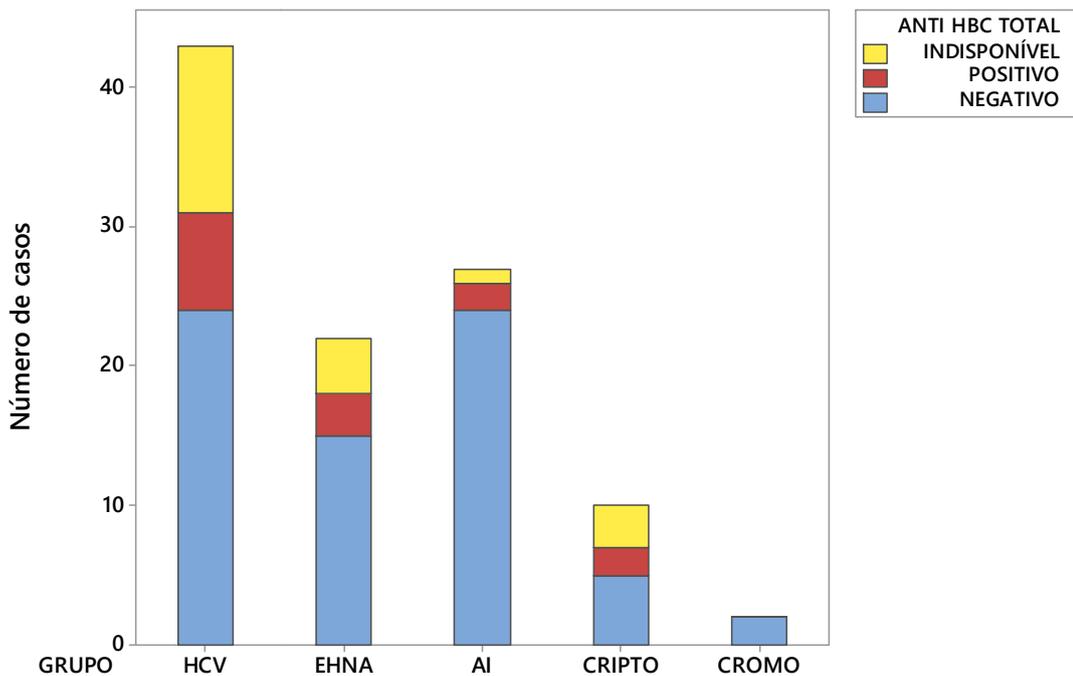


Figura 4 - Gráficos de barra dos casos do resultado do teste sorológico anti-HBc pelos grupos etiológicos do estudo.

5.2 Representatividade das biópsias hepáticas

A representatividade das biópsias hepáticas foi avaliada pelo tamanho dos fragmentos e pelo número de tratos portais. A distribuição do tamanho dos fragmentos, em milímetros (mm), está representada na Figura 5.

Observa-se distribuição do tamanho dos fragmentos muito próxima da curva normal (linha vermelha da Figura 5), com tamanho médio em torno de 13 milímetros.

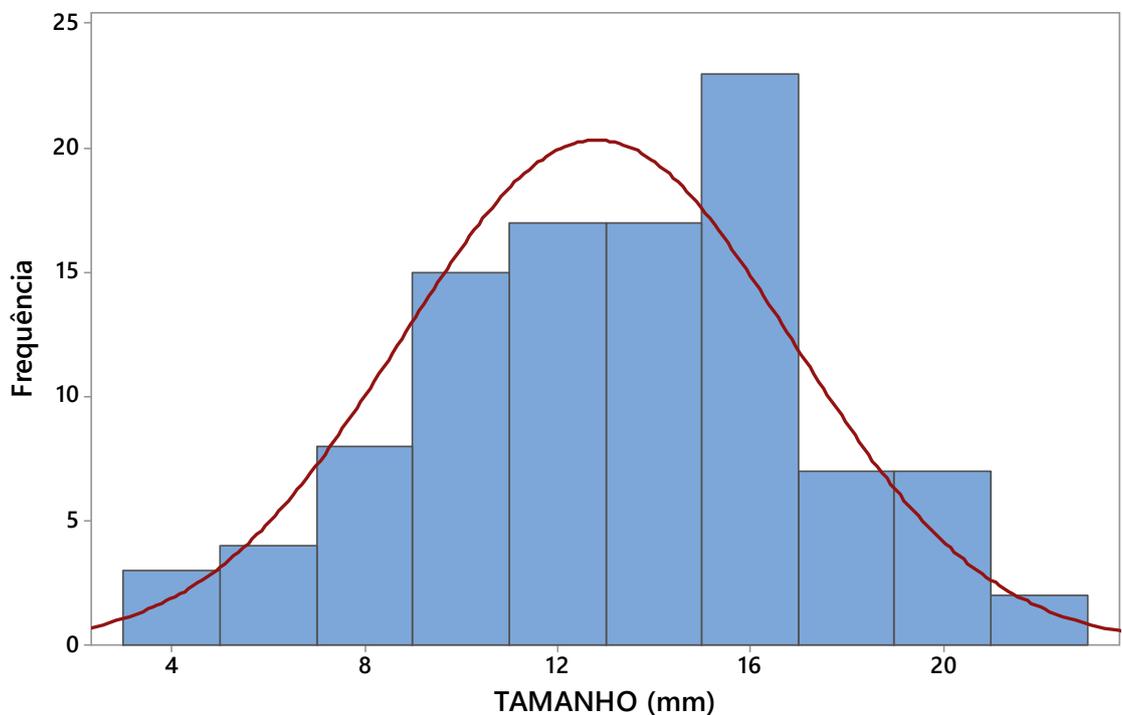


Figura 5 - Histograma do tamanho dos fragmentos de biópsias hepáticas.

O comportamento do número de tratos portais, diferentemente do tamanho, apresenta ampla variabilidade, sem esboço de curva normal aproximada, apesar da maior concentração em torno de oito tratos portais (Figura 6).

A qualidade do DNA presente nas amostras estudadas foi analisada através da relação A260/A280. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260nm. As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280nm. Sendo assim, a relação A260/A280 fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. O DNA é considerado puro quando a relação A260/A280 está entre 1,8 e 2.

Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína. A Figura 7 mostra que o DNA presente não apresentava boa qualidade.

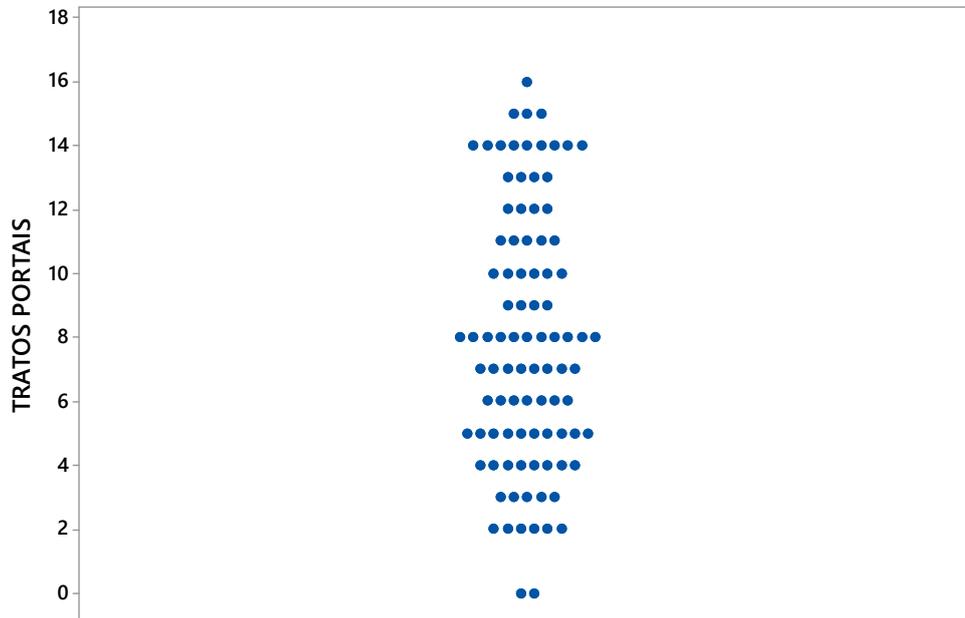


Figura 6- Gráfico de pontos da distribuição do número de tratos portais.

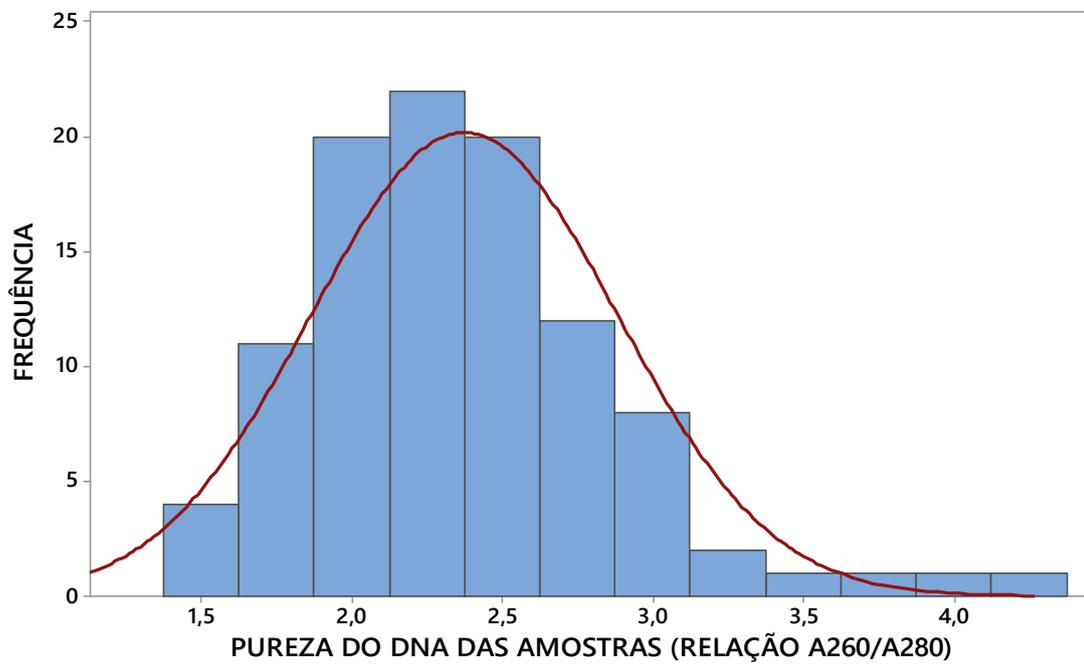


Figura 7 - Pureza do DNA nas amostras (relação A260/A280)

5.3 Graduação histopatológica

As amostras foram classificadas de acordo com os critérios METAVIR e estão discriminadas na Tabela 4. Dos 104 pacientes, 35(33,6%) apresentaram atividade classificada como moderada ou grave (A2 ou A3); 14 (13,5%) não apresentaram atividade necro-inflamatória (A0); 22 (21,1%) apresentaram fibrose acentuada ou cirrose (F3 ou F4); e 42 (40,4%) não apresentaram evidência histológica de fibrose hepática.

Tabela 4 - Classificação histológica dos indivíduos investigados segundo a classificação de METAVIR

Histologia	Indivíduos (n=104)
<i>Média METAVIR de atividade ± DP</i>	1,2 ± 0,7
A0	14 (13,5%)
A1	55 (52,9%)
A2	31 (29,8%)
A3	4 (3,9%)
<i>Total</i>	104 (100%)
<i>Média METAVIR de fibrose ± DP</i>	1,3 ± 1,4
F0	42 (40,4%)
F1	24 (23,1%)
F2	16 (15,4%)
F3	11 (10,6%)
F4	11 (10,6%)
<i>Total</i>	104 (100%)

A0= ausência de atividade inflamatória histológica, A1= atividade leve,

A2= atividade moderada, A3= atividade intensa. F0= sem fibrose, F1= fibrose portal sem septos, F2= poucos septos, F3= numerosos septos sem cirrose, F4=cirrose.

5.4 Nested-PCR

A Figura 8 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR obtidos em um dos experimentos.

5.4.1 Protocolo 1

O DNA do HBV foi amplificado em 13 (12,5%) dos 104 pacientes avaliados. Entre os indivíduos com a PCR positiva, a média de idade foi 49,6 ±13,2 anos, variando de 23 a 70 anos. Entre os indivíduos PCR negativa, a média de idade foi 47,5 ± 12,6 anos,

variando de 18 a 73 anos. Não houve diferença entre a média de idade do grupo de pacientes com PCR positiva quando comparado com o grupo com PCR negativa ($p=0,569$).

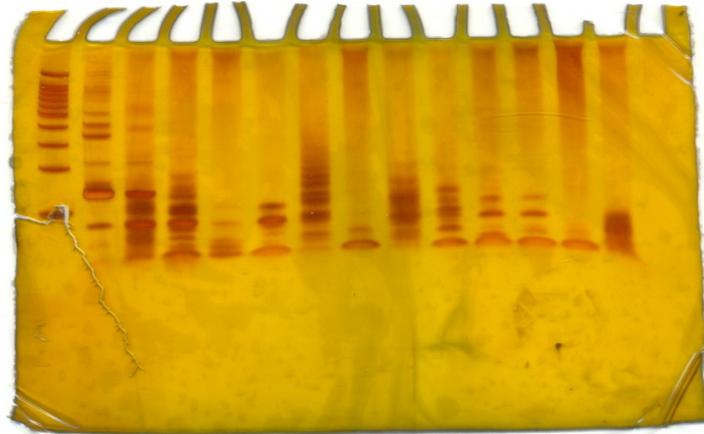


Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação por PCR do DNA do HBV.

(1. marcador de peso molecular em escala de 100 pb; 2-4: controle positivo; 5-12: amostras)

Na Tabela 5 foi sumarizado o resultado da PCR realizada conforme o protocolo descrito por Raimondo *et al.*(9) de acordo com a etiologia de base da hepatopatia crônica.

Tabela 5- Resultado da PCR de acordo com a etiologia da hepatopatia crônica.

Etiologia	HBV-DNA		
	Negativo	Positivo	Total
HCV	37 (86,0%)	6 (14,0%)	43 (100,0%)
EHNA	21 (95,5%)	1 (4,5%)	22 (100,0%)
Auto-imune	23 (85,2%)	4 (14,8%)	27 (100,0%)
Criptogênica	8 (80,0%)	2 (20,0%)	10 (100,0%)
Hemocromatose	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2 (100,0%)
Total	91 (87,5%)	13 (12,5%)	104 (100,0%)

PCR: reação em cadeia da polimerase, HCV: hepatite C crônica, EHNA: esteato-hepatite não alcoólica.

Em nove (69,2%) desses 13 casos cuja PCR foi positiva, o anti-HBc estava positivo. Houve associação entre a PCR positiva e anti-HBc positivo ($p<0,01$). Entre os 68

indivíduos com PCR negativa em que o anti-HBc foi analisado, apenas cinco indivíduos (7,4%) apresentaram esse anticorpo positivo ($p < 0,01$).

O anti-HBs estava positivo em 12 (92,3%) dos 13 pacientes com HBO e em 25 (35,7%) de 70 pacientes sem HBO ($p < 0,01$).

Quando comparados os pacientes com PCR positiva e negativa e a presença de marcadores do HBV (anti-HBs ou anti-HBc) observou-se que entre os 13 indivíduos com PCR positiva apenas um (7,7%) apresentou todos os marcadores negativos e 12 (92,3%) apresentaram pelo menos um marcador positivo. Entre 71 indivíduos com PCR negativa para o HBV, 46 (64,8%) apresentaram todos os marcadores negativos e 25 (35,2%) apresentaram pelo menos um anticorpo positivo (anti-HBc e/ou anti-HBs) ($p = 0,000$). Os dados referentes aos marcadores de infecção pelo HBV estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Relação entre HBV-DNA e marcadores de infecção prévia pelo HBV

HBV-DNA	Marcadores de infecção prévia pelo HBV		
	Negativos	anti-HBc e/ou anti-HBs positivos	Total
Negativo	46 (64,8%)	25 (35,2%)	71 (100,0%)
Positivo	1 (7,7%)	12 (92,3%)	13 (100,0%)
Total	47 (56,0%)	37 (44,1%)	84 (100,0%)

Resultados dos anticorpos disponíveis para 84 casos.

A associação entre a PCR positiva e hepatite crônica pelo HCV foi analisada, não se encontrando associação estatisticamente significativa entre a PCR positiva e infecção pelo HCV ($p = 0,768$).

Em 81 dos 104 pacientes foi possível obter informação sobre o histórico de hemotransusão. Quatro dentre 11 (36,4%) pacientes com PCR positiva e 14 (20%) dentre 70 com PCR negativa receberam hemotransusão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de HBO e o histórico transfusional ($p = 0,275$).

Entre os 91 pacientes com PCR negativa para o HBV, 31 (34,1%) apresentaram atividade inflamatória moderada ou grave (A2 ou A3 de METAVIR) à histologia hepática. Nos 13 pacientes com PCR positiva, quatro (30,8%) apresentaram atividade inflamatória moderada ou grave. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença da HBO e a ocorrência de atividade inflamatória moderada ou grave ($p = 1,00$). Os dados referentes à atividade inflamatória identificada à histologia estão discriminados na Tabela 7.

Tabela 7 - Grau de atividade inflamatória e presença do HBV-DNA

METAVIR	HBV-DNA
---------	---------

A2 ou A3	Negativo	Positivo	Total
Não	60 (87,0%)	9 (13,0%)	69 (100,0%)
Sim	31 (88,6%)	4 (11,4%)	35 (100,0%)
Total	91 (87,5%)	13 (12,5%)	104 (100,0%)

A2= atividade moderada, A3= atividade intensa.

Dos 13 pacientes com PCR positiva para o HBV DNA, três (23,1%) apresentaram fibrose grave ou cirrose (F3 ou F4 de METAVIR) e entre os 91 indivíduos em que a PCR foi negativa, 19 (20,9%) apresentaram fibrose acentuada ou cirrose. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a presença de fibrose grave ou cirrose entre os indivíduos com PCR positiva e negativa ($p=1,000$). Os dados foram resumidos na Tabela 8.

Tabela 8- Associação entre PCR positiva para HBV pelo protocolo 1 e biópsia hepática mostrando fibrose grave ou cirrose

METAVIR	HBV-DNA			
	F3 ou F4	Negativo (%)	Positivo (%)	Total (%)
Não		72 (87,8%)	10 (12,2%)	82 (100%)
Sim		19 (86,4%)	3 (13,6%)	22 (100%)
Total		91 (87,5%)	13 (12,5%)	104 (100%)

F3: numerosos septos sem cirrose, F4: cirrose

5.4.2 Protocolo 2

A frequência de PCR positiva para o HBV-DNA encontrada utilizando o protocolo de Chapel *et al.*(27) foi 8,7% (nove casos em 104). Entre os indivíduos com PCR positiva pelo protocolo 2, a média de idade foi $42,4 \pm 10,6$ anos, variando de 23 a 55 anos. Entre os indivíduos com PCR negativa pelo protocolo 2, a média de idade foi $48,2 \pm 12,7$ anos, variando de 18 a 73 anos. Não houve diferença entre a média de idade do grupo de pacientes com PCR positiva quando comparado com o grupo com PCR negativa ($p= 0,179$).

Dos nove casos com PCR positiva, quatro (44,4%) tinham hepatopatia crônica associada ao HCV. Também não foi encontrada associação, neste caso, entre PCR positiva e hepatopatia pelo HCV ($p=1,000$).

Dos nove pacientes positivos, três (33,5%) apresentaram anti-HBc positivo, conforme demonstrado na Tabela 9. A ocorrência de PCR positiva, segundo os critérios de Chapel *et al.*(27), não foi associada à presença do anti-HBc positivo ($p=0,125$).

Tabela 9 - Prevalência de anticorpos anti-HBc de acordo com o resultado da PCR segundo o protocolo 2.

HBV-DNA	Anti-HBc		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	65 (92,9%)	11 (78,6%)	76 (90,5%)
Positivo	5 (7,1%)	3 (21,4%)	8 (9,5%)
Total	70 (100,0%)	14 (100,0%)	84 (100,0%)

Resultado do anti-HBc disponível para 84 casos.

A associação entre os casos positivos diagnosticados pelos critérios de Chapel *et al.*(27) e histórico transfusional foi investigada mas não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,000$).

Entre os 95 pacientes com PCR negativa para o HBV, 33 (34,7%) apresentaram atividade inflamatória moderada ou grave (A2 ou A3 de METAVIR) na histologia da biópsia hepática. Dos nove pacientes com PCR positiva, dois (22,2%) apresentaram atividade inflamatória moderada ou grave. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a presença de PCR positiva pelos critérios de Chapel *et al.*(27) e a ocorrência de atividade inflamatória moderada ou grave ($p=0,714$).

Dos nove pacientes com PCR positiva para o HBV DNA, dois (22,2%) apresentaram fibrose grave ou cirrose (F3 ou F4 de METAVIR) e entre os 95 indivíduos em que a PCR foi negativa, 20 (21%) apresentaram fibrose grave ou cirrose. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a presença de fibrose grave ou cirrose entre os indivíduos com e sem PCR positiva ($p=0,675$).

5.4.3 Casos de HBO (PCR positiva nos protocolos 1 e 2)

Considerando-se os casos identificados por ambos os protocolos a frequência de HBO encontrada foi 6,7% (sete casos em 104 indivíduos testados).

Não houve diferença de idade ($p=0,244$) ou sexo ($p=0,698$) entre os pacientes com e sem HBO.

Também não foi encontrada associação entre HBO e qualquer etiologia de hepatopatia de base ($p=0,169$).

Não houve associação entre HBO e a ocorrência de marcadores de infecção prévia pelo HBV (anti-HBc) ($p=0,086$).

A presença de HBO não foi associada a história de hemotransfusão ($p=1,000$).

A HBO não foi associada a graus mais elevados de atividade inflamatória (A2 ou A3 de METAVIR) ou fibrose hepática (F3 ou F4 de METAVIR) ($p=0,418$ e $p=0,637$, respectivamente).

Com relação ao tamanho do fragmento de biópsia analisado não houve associação entre o tamanho do fragmento e a ocorrência de HBO ($p=0,277$). O número de tratos portais presentes no fragmento de biópsia também não foi associado a ocorrência de HBO ($p=0,334$).

5.5 Caracterização e descrição dos casos com PCR positiva para HBV-DNA

O protocolo de Raimondo *et al.* (9) permitiu identificar 13 casos de HBO, sendo que sete destes (53,9%) também foram identificados pelo protocolo de Chapel *et al.*(27)

Sete (53,9%) dentre os 13 casos eram indivíduos do gênero feminino. A mediana de idade dos pacientes foi 52 anos, sendo a média $49,6 \pm 13,2$ anos. O paciente mais jovem tinha 23 anos e o mais velho 70 anos. Entre os 13 casos, seis (46,2%) tinham hepatopatia crônica associada ao HCV, um (7,7%) tinha EHNA, quatro (30,8%) hepatopatia auto-imune e dois (15,4%) hepatopatia criptogênica. Dos 11 casos em que foi possível obter informação sobre o passado transfusional, quatro (36,4%) tinham história positiva. Nove (69,2%) tinham anti-HBc positivo e 12 (92,31%) anti-HBs positivo.

Apenas dois casos de HBO foram identificados apenas pelo protocolo de Chapel *et al.* (27) Um caso se tratava de paciente do sexo masculino, 42 anos de idade, todos os marcadores do HVB eram negativos e a causa da hepatopatia crônica de base foi atribuída ao HCV. Sua classificação de METAVIR foi A2F2. O outro caso se tratava de uma paciente do sexo feminino de 29 anos de idade, também portadora do HCV, mas não foi possível obter os resultados dos marcadores de infecção prévia pelo HBV. O METAVIR foi A1F1.

O protocolo proposto por Raimondo *et al.*(9) detectou mais amostras com o HBV DNA quando comparado ao protocolo de Chapel *et al.*(27) A positividade de HBO pelo método de Raimondo *et al.*(9) foi de 12,5% e pelo método de Chapel *et al.*(27) de 8,7%, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação dos resultados obtidos na PCR realizada usando 2 protocolos diferentes.

HBV-DNA	Protocolo 1	Protocolo 2
Negativo	91 (87,5%)	95 (91,3%)
Positivo	13 (12,5%)	9 (8,7%)
Total	104 (100,0%)	104 (100,0%)

O valor do coeficiente de concordância de Kappa, considerando a comparação dos resultados dos protocolos 1 e 2, foi de 0,595, mostrando que houve uma concordância substancial entre o resultado obtido nos dois testes.

6 DISCUSSÃO

Infecção oculta pelo HBV foi detectada em 6,7% dos 104 indivíduos portadores de hepatopatia crônica investigados, considerando-se apenas os casos em que a PCR foi positiva segundo os dois protocolos. A positividade identificada pelo protocolo de Raimondo *et al.*(9) foi de 12,5%. Segundo protocolo de Chapel *et al.*(27), a positividade de HBO encontrada foi de 8,7%. O protocolo de Raimondo *et al.*(9) apresentou maior detecção do HBV-DNA quando comparado com o protocolo de Chapel *et al.*(27), mas essa diferença pode ter sido devida a resultados falso-positivos. O protocolo de Chapel *et al.*(27) detectou menos casos positivos para o HBV-DNA, mas também não se pode afastar a possibilidade de resultados falso-positivos ou negativos.

Considerando-se que a presença de HBO em indivíduos com hepatopatia crônica variou de 0,7% a 73% entre os diversos países,(12, 27, 28, 35, 45, 48, 53, 54) os resultados apresentados encontram-se na faixa descrita. No Brasil, a frequência de HBO variou de 2%(17) a 19,5%(16) e as diferenças de metodologia usadas para detecção do HBV DNA são uma provável causa dessa discrepância. Há também que se considerar as diferenças na prevalência de infecção pelo HBV em diferentes regiões do país.

Em Minas Gerais, a positividade encontrada de HBO em fígado explantado foi 4,4% (20) portanto, próximo do que foi encontrado no presente estudo, quando se consideram casos de HBO apenas aqueles identificados por ambos os protocolos. O estudo de Ferrari *et al.*(20) foi realizado na mesma instituição do estudo atual e empregou-se também o protocolo de Raimondo *et al.*(9) Ferrari *et al.*(20) analisaram apenas tecido hepático fresco removido de fígado explantado de pacientes cirróticos, o que fornece fragmentos maiores para análise, facilitando a detecção do HBV DNA. No presente estudo foram analisados fragmentos de biópsia hepática obtida por punção e que se encontravam armazenados em parafina. No entanto, ao contrário do que se esperava, considerando-se a natureza do material, a positividade de HBO encontrada no estudo atual foi aproximadamente três vezes superior empregando-se o mesmo protocolo. Cabe ressaltar, que no estudo citado previamente(20), foi feito sequenciamento e foram considerados casos de HBO somente aqueles nos quais o genoma do HBV foi identificado por aquela técnica. Dessa forma, é possível sugerir a ocorrência de resultados falso-positivos quando se emprega a PCR isoladamente para se diagnosticar HBO. Pode-se também questionar se a presença de cirrose poderia dificultar o encontro do HBV DNA. Todos os pacientes do estudo anteriormente citado(20) eram cirróticos e do estudo atual, apenas 3% eram F3 ou F4 de METAVIR. São argumentos contra esta hipótese, os estudos de Cacciola *et al.*(12),

Sagnelli *et al.*(50) e Squadrito *et al.*(45) nos quais a HBO foi associada a estágios mais graves de fibrose hepática ou cirrose.

O presente estudo não demonstrou associação entre a presença da HBO e a presença de fibrose hepática grave ou cirrose, diferentemente do que foi demonstrado nos estudos de Cacciola *et al.*(12), Sagnelli *et al.*(50) e Squadrito *et al.*(45) As diferenças em relação aos estudos prévios poderiam ser explicadas pela diferença da prevalência da HBO entre as diferentes regiões do mundo e a diferença entre a sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados para identificar a HBO. Assim, a associação entre HBO e o grau de fibrose hepática em pacientes com hepatopatia crônica ainda necessita de maiores investigações.

Hepatite crônica pelo HCV não foi associada à ocorrência de HBO na presente investigação. Assim, diferentemente do que é relatado em outros estudos,(12, 15, 50, 87) não foi possível encontrar associação significativa entre HBO e infecção crônica pelo HCV. Essa discrepância pode ser devido ao pequeno número de indivíduos estudados, o que pode ter impedido o encontro de associação.

A presença de marcadores de infecção prévia pelo HBV (anti-HBc e/ou anti-HBs) foi associada à HBO apenas no protocolo 1, uma vez que a grande maioria dos pacientes com HBO apresentavam pelo menos um marcador positivo e cerca de um terço dos indivíduos com marcadores positivos apresentaram DNA do HBV positivo. Estudos anteriores confirmam essa associação(12, 36, 51, 56) e já foi sugerido que o anti-HBc poderia ser considerado um marcador sentinela de HBO.(8)

O presente estudo não incluiu pacientes com CHC e, portanto, a associação entre HBO e carcinogênese não pôde ser avaliada.

Não foi realizado no presente estudo quantificação da carga viral no soro dos indivíduos estudados, o que impossibilita afastar os casos de mutação do gene S com a produção de um HBsAg não identificado pelos ensaios convencionais nos indivíduos estudados. Por se tratar de um estudo no qual se utilizaram dados colhidos retrospectivamente, na ocasião da realização da biópsia, também não foram utilizados anticorpos multivalentes para a detecção do HBsAg no soro. Porém considerando-se que a prevalência de mutação no gene S nas diversas regiões do mundo é muito baixa (24, 32, 62-64) é pouco provável que isso tenha relevância nos resultados apresentados.

A maioria das amostras analisadas apresentaram mais de cinco tratos portais e mais de 10 mm de comprimento. No entanto, análise da qualidade do DNA mostrou que em apenas 16,3% das amostras a qualidade do DNA foi adequada, o que poderia interferir com os resultados. O método de biópsia em parafina, apesar de inferior ao método de análise a fresco, se mostrou capaz de detectar HBO em nosso estudo.

O estudo mostrou diferença nos resultados apresentados pelos dois protocolos, reforçando a necessidade de melhor padronização do método para se diagnosticar HBO. É possível questionar se o grande número de iniciadores utilizados no protocolo 1 não poderia ter gerado ligações inespecíficas, colaborando para resultados falso-positivos.

Uma das limitações do presente estudo foi a impossibilidade de se fazer o sequenciamento genético das amostras positivas, o que ocorreu por limitação técnica. As amostras apresentaram quantidade muito pequena de DNA e as reações de PCR geraram pequenos fragmentos inespecíficos que interferiram com as reações. Estudos posteriores seriam importantes para se confirmar os achados deste estudo.

Assim, são necessários estudos maiores para padronização do método diagnóstico de HBO. Além disso, é importante a realização de estudos prospectivos para se esclarecer o real impacto da HBO sobre a progressão das hepatopatias e o papel do HBV oculto na hepatocarcinogênese.

REFERÊNCIAS

1. Organization. WH. Hepatitis B. World Health Organization. Fact sheet N 2004 <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en2004> [Available from: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en>.
2. Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol.* 2006;101 Suppl 1:S1-6.
3. Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine.* 2008;26(49):6266-73.
4. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(8):479-86.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de DST AeHV. Boletim epidemiológico de hepatites virais http://aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/51820/boletim_epidemiologico_hepatites_virais_2012_ve_12026.pdf2012 [
6. Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de DST AeHV. Boletim epidemiológico de hepatites virais http://aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58210/_p_boletim_hepatites_final_web_pdf_p__16377.pdf2015 [
7. Raimondo G, Pollicino T, Romanò L, Zanetti AR. A 2010 update on occult hepatitis B infection. *Pathol Biol (Paris).* 2010;58(4):254-7.
8. Urbani S, Fagnoni F, Missale G, Franchini M. The role of anti-core antibody response in the detection of occult hepatitis B virus infection. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(1):23-9.
9. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2008;49(4):652-7.
10. Yeo W, Johnson PJ. Diagnosis, prevention and management of hepatitis B virus reactivation during anticancer therapy. *Hepatology.* 2006;43(2):209-20.
11. Lalazar G, Rund D, Shouval D. Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2007;136(5):699-712.
12. 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.
13. 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.

14. Chemin I, Trépo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol*. 2005;34 Suppl 1:S15-21.
15. Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxi A, et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*. 2004;126(1):102-10.
16. Branco F, Mattos AA, Coral GP, Vanderborght B, Santos DE, França P, et al. 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.
17. Alencar RS, Gomes MM, Sitnik R, Pinho JR, Malta FM, Mello IM, et al. 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.
18. Albuquerque AC, Coelho MR, Lemos MF, Moreira RC. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):558-62.
19. Moraes TC, Fiaccadori FS, Souza M, Almeida TN, Cunha MoP, Castro ÍA, et al. Hepatitis B virus infection among institutionalized mentally ill patients in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(6):643-7.
20. Ferrari TC, Xavier MA, Vidigal PV, Amaral NS, Diniz PA, Resende AP, et al. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(11):990-4.
21. Wands JR, Chura CM, Roll FJ, Maddrey WC. Serial studies of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Gastroenterology*. 1975;68(1):105-12.
22. Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med*. 1978;298(25):1379-83.
23. Bréchet C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med*. 1985;312(5):270-6.
24. Weber B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. *J Med Virol*. 2006;78 Suppl 1:S59-65.
25. Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DF, Jones EA, Micetich KC, Young RC, et al. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Intern Med*. 1982;96(4):447-9.

26. Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. *Gastroenterology*. 1991;100(1):182-8.
27. Chapel F, de Lamballerie X, de Micco C, Lebreuil G, de Micco P. PCR analysis of hepatitis B virus DNA in paraffin-embedded liver tissue from patients with chronic liver disease. *Pathol Res Pract*. 1995;191(10):961-6.
28. Wong DK, Huang FY, Lai CL, Poon RT, Seto WK, Fung J, et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011;54(3):829-36.
29. Grümayer ER, Panzer S, Ferenci P, Gadner H. Recurrence of hepatitis B in children with serologic evidence of past hepatitis B virus infection undergoing antileukemic chemotherapy. *J Hepatol*. 1989;8(2):232-5.
30. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*. 2008;134(1-2):235-49.
31. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(1):51-68.
32. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2013;35(1):39-52.
33. da Silva MA, Pedrosa Soares CR, Medeiros RA, Medeiros Z, de Melo FL. Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013;134(2):206-10.
34. Covolo L, Pollicino T, Raimondo G, Donato F. Occult hepatitis B virus and the risk for chronic liver disease: a meta-analysis. *Dig Liver Dis*. 2013;45(3):238-44.
35. Obika M, Shinji T, Fujioka S, Terada R, Ryuko H, Lwin AA, et al. Hepatitis B virus DNA in liver tissue and risk for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. A prospective study. *Intervirology*. 2008;51(1):59-68.
36. Shetty K, Hussain M, Nei L, Reddy KR, Lok AS. Prevalence and significance of occult hepatitis B in a liver transplant population with chronic hepatitis C. *Liver Transpl*. 2008;14(4):534-40.
37. Shi Y, Wu YH, Wu W, Zhang WJ, Yang J, Chen Z. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Liver Int*. 2012;32(2):231-40.
38. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):48-64.
39. Pollicino T, Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(20):5951-61.

40. Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1995;21(2):313-21.
41. Yuki N, Nagaoka T, Yamashiro M, Mochizuki K, Kaneko A, Yamamoto K, et al. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. *Hepatology*. 2003;37(5):1172-9.
42. Shiota G, Oyama K, Udagawa A, Tanaka K, Nomi T, Kitamura A, et al. Occult hepatitis B virus infection in HBs antigen-negative hepatocellular carcinoma in a Japanese population: involvement of HBx and p53. *J Med Virol*. 2000;62(2):151-8.
43. Ikeda K, Kobayashi M, Someya T, Saitoh S, Hosaka T, Akuta N, et al. Occult hepatitis B virus infection increases hepatocellular carcinogenesis by eight times in patients with non-B, non-C liver cirrhosis: a cohort study. *J Viral Hepat*. 2009;16(6):437-43.
44. Hassan ZK, Hafez MM, Mansor TM, Zekri AR. Occult HBV infection among Egyptian hepatocellular carcinoma patients. *Virology*. 2011;8:90.
45. Squadrito G, Cacciola I, Alibrandi A, Pollicino T, Raimondo G. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2013;59(4):696-700.
46. Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, et al. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. *Oncogene*. 2001;20(43):6233-40.
47. Wong DK, Yuen MF, Poon RT, Yuen JC, Fung J, Lai CL. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2006;45(4):553-9.
48. Lok AS, Everhart JE, Di Bisceglie AM, Kim HY, Hussain M, Morgan TR, et al. Occult and previous hepatitis B virus infection are not associated with hepatocellular carcinoma in United States patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;54(2):434-42.
49. Chan HL, Tsang SW, Leung NW, Tse CH, Hui Y, Tam JS, et al. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence of HBV infection. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(5):1211-5.
50. Sagnelli E, Imperato M, Coppola N, Pisapia R, Sagnelli C, Messina V, et al. 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.
51. Fang Y, Shang QL, Liu JY, Li D, Xu WZ, Teng X, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China. *J Infect*. 2009;58(5):383-8.

52. Chang ML, Lin YJ, Chang CJ, Yeh C, Chen TC, Yeh TS, et al. Occult and Overt HBV Co-Infections Independently Predict Postoperative Prognosis in HCV-Associated Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(6):e64891.
53. Georgiadou SP, Zachou K, Liaskos C, Gabeta S, Rigopoulou EI, Dalekos GN. Occult hepatitis B virus infection in patients with autoimmune liver diseases. *Liver Int*. 2009;29(3):434-42.
54. Cardoso C, Alves AL, Augusto F, Freire R, Quintana C, Gonçalves M, et al. Occult hepatitis B infection in Portuguese patients with chronic hepatitis C liver disease: prevalence and clinical significance. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2013;25(2):142-6.
55. Martinez MC, Kok CC, Baleriola C, Robertson P, Rawlinson WD. Investigation of occult hepatitis B virus infection in anti-hbc positive patients from a liver clinic. *PLoS One*. 2015;10(3):e0117275.
56. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2010;52(2):282-4.
57. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2009;51(3):581-92.
58. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol*. 2005;42(3):302-8.
59. 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.
60. Liver EAFTSOT. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012;57(1):167-85.
61. Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterol*. 2007;13(43):5682-6.
62. Svicher V, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, Van Hemert F, Chen M, et al. Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res*. 2012;93(1):86-93.
63. Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J Hepatol*. 2014;61(2):408-17.
64. Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):142-63.
65. Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2007;45(2):277-85.

66. 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.
67. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest.* 1996;98(5):1185-94.
68. Bes M, Vargas V, Piron M, Casamitjana N, Esteban JI, Vilanova N, et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J Hepatol.* 2012;56(4):765-74.
69. Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fiscaro P, Penna A, Di Vincenzo P, et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2008;134(5):1470-81.
70. Lieberman PM. Chromatin organization and virus gene expression. *J Cell Physiol.* 2008;216(2):295-302.
71. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology.* 2006;130(3):823-37.
72. Kaur P, Paliwal A, Durantel D, Hainaut P, Scoazec JY, Zoulim F, et al. DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. *J Infect Dis.* 2010;202(5):700-4.
73. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971;56(2):341-61.
74. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology.* 1992;24:476-80.
75. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 1986;324(6093):163-6.
76. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-91.
77. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
78. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med.* 1990;322(3):178-83.

79. Taylor C, Ford K, Connolly BA, Hornby DP. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. *Biochem J.* 1993;291 (Pt 2):493-504.
80. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292-305.
81. Pignon JM, Henni T, Amselem S, Vidaud M, Duquesnoy P, Vernant JP, et al. Frequent detection of minimal residual disease by use of the polymerase chain reaction in long-term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1990;4(2):83-6.
82. Mathis A, Weber R, Kuster H, Speich R. Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol.* 1997;35(7):1691-5.
83. Honarkar Z, Alavian SM, Samiee S, Saeedfar K, Zali MR. Occult hepatitis B among chronic liver disease patients. *Saudi Med J.* 2005;26(4):601-6.
84. Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL, et al. Occult hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat.* 2004;11(4):297-301.
85. Melo Couto OF. Perfil sérico de citocinas e seu desempenho na avaliação da inflamação e fibrose hepática em pacientes com hepatopatia crônica. In: *Gerais UFdM*, editor. 2015.
86. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1994;20(1 Pt 1):15-20.
87. Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Koh N, Moriyama Y, Fujimoto S, et al. Possible contribution to hepatocarcinogenesis of X transcript of hepatitis B virus in Japanese patients with hepatitis C virus. *Hepatology.* 1999;29(5):1429-34.

APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Estudo da prevalência da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em pacientes com hepatopatia crônica acompanhados em centro de referência de Minas Gerais

O (A) Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de um estudo científico com o objetivo de investigar a presença de infecção oculta pelo vírus da hepatite B em pacientes com doenças crônicas do fígado de causas variadas. O estudo será realizado em pacientes com doenças crônicas do fígado em que os exames de sangue não foram capazes de detectar a hepatite B. Muitos pacientes nos quais os exames de rotina de pesquisa da hepatite B são negativos possuem esse vírus no fígado. Pacientes com esse tipo de infecção podem transmitir a hepatite B caso façam uma doação de sangue, por exemplo. Além disso, podem desenvolver a doença quando recebem medicamentos que diminuem a imunidade. Aparentemente, as pessoas que apresentam esse vírus oculto associado a outras doenças do fígado possuem maior chance de desenvolver cirrose e câncer de fígado. Uma forma de detectar essa infecção oculta é pesquisando a presença do DNA do vírus em biópsia de fígado. Ainda não se sabe no Brasil qual é o número real de pessoas que apresentam essa forma de infecção.

Caso você concorde em participar da pesquisa, serão coletados dados clínicos constantes no seu prontuário e será feita a pesquisa do vírus na biópsia de fígado que você fez no passado.

Os pesquisadores manterão em sigilo a identidade dos participantes, inclusive em qualquer publicação resultante do estudo, garantindo-se total anonimato e confidencialidade.

O (A) Sr.(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou mesmo afastar-se dela a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo a sua assistência no Hospital das Clínicas. Antes de assinar esse termo, o (a) Sr.(a) deve informar-se plenamente a respeito do estudo, não tendo medo ou vergonha de fazer perguntas sobre qualquer assunto que queira esclarecer.

É importante ter conhecimento das seguintes informações sobre o estudo:

Objetivo do estudo: conhecer a prevalência da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em paciente com outras doenças do fígado acompanhados no ambulatório especializado.

Procedimentos a serem realizados: se você for participar do presente estudo, um pesquisador coletará os dados clínicos e resultados dos exames complementares do seu prontuário e preencherá um protocolo. Serão realizados exames para pesquisa do vírus da

hepatite B no material de biópsia que você realizou e que se encontra armazenado no Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Você não receberá nenhuma intervenção adicional por causa da pesquisa.

Riscos potenciais: não há riscos importantes envolvidos em participar deste estudo pois só se utilizará dados já colhidos e a biópsia você já realizou como parte do seu acompanhamento médico.

Benefícios: não há benefícios em termos individuais imediatos. No entanto, esperamos contribuir para o conhecimento sobre essa doença.

O que devo fazer se tiver dúvidas ou perguntas: se você tiver qualquer pergunta, pode fazê-la na consulta a seu médico ou telefonar para nós. Você pode telefonar para Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari, no número (31)3409-9746 ou para a Dra. Alessandra Coutinho de Faria no número (31)88955007. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente da pesquisa, você deverá ligar para o Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) no número (31)3409-4592, situado à Av. Antônio Carlos, 6627, Campus da Pampulha, Unidade Administrativa II - segundo andar, sala 2005. CEP: 31270-901, Belo Horizonte-MG; e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este formulário de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em participar deste estudo. Estou ciente de que eu posso sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos. Não receberei remuneração financeira para participar dessa pesquisa.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome do investigador que prestou as informações: _____

Assinatura e CRM do investigador que prestou as informações: _____

Data: ____/____/____

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 32140914.0.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari**
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 1º de outubro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da prevalência da infecção oculta pelo vírus da hepatite B em pacientes com hepatopatia crônica acompanhados em centro de referência de Minas Gerais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

A handwritten signature in blue ink, reading "Telma Campos Medeiros Lorentz".

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

