

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

MÁRCIA ALVES DIAS DE MATOS

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA HEPATITE B EM AFRO-DESCENDENTES DE
COMUNIDADE ISOLADA NO ESTADO DE GOIÁS (KALUNGAS)**

Orientadora:

Profª Drª Regina Maria Bringel Martins

Tese de Doutorado

**Goiânia-GO
2007**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O termo hepatites virais é convencionalmente utilizado para designar as doenças ocasionadas por um grupo de vírus hepatotrópicos. A história das hepatites virais remonta desde períodos anteriores a Era Cristã. Existem relatos de surtos de icterícia na Babilônia, há mais de 2500 anos. Hipócrates descreveu a icterícia epidêmica em 400 A.C. (Freitas 2003).

Inicialmente, muitos surtos de icterícia coincidiam com épocas de guerras. Assim, o surgimento do termo “doença de soldado” foi amplamente associado com epidemias em Flandres, em 1743 (durante a guerra de Sucessão Austríaca), no Egito, em 1798 (durante a batalha de Napoleão), e em Paris, em 1870, durante a guerra Franco-Prussiana (Kuntz & Kuntz 2002, Freitas 2003).

Entretanto, foi a partir de 1883 que se observou casos de icterícia de longo período de incubação (geralmente de 2 a 6 meses). Esses episódios ocorreram em Bremen, na Alemanha, envolvendo trabalhadores de um estaleiro naval que receberam doses de uma vacina contra varíola. Tal vacina havia sido preparada com linfa humana. De 1289 trabalhadores que receberam essa vacina, 191 desenvolveram a doença. A partir desses eventos, houve a primeira especulação sobre um possível agente de transmissão parenteral ocasionando icterícia. Provavelmente, esse seria, então, o primeiro relato de epidemia por hepatite B (Lürman 1885).

Em 1909, ocorreram outros casos de icterícia, após administração de uma medicação utilizada para tratamento de sífilis por via endovenosa (Bigger 1943). Casos semelhantes ocorreram em 1922, com a administração da insulina no tratamento de diabetes (Flaum et al. 1926). Porém, somente fatos ocorridos na década de 40 elucidaram a hipótese da transmissão parenteral do agente envolvido com a infecção, pois em 1942, 28.585 soldados americanos apresentaram icterícia após receber vacina contra febre amarela, sendo que 62

faleceram em decorrência dessa doença (Krugman 1989). Além disso, investigações mostraram o risco de hepatite associado ao uso de plasma humano fresco, seco ou sangue total (Beeson 1943, Morgan & Williamson 1943).

MacCallum denominou, em 1947, os agentes causadores da icterícia epidêmica, nomeando-os de “vírus da hepatite A” (HAV) e “vírus da hepatite B” (HBV). O primeiro era referente à icterícia infecciosa, com período de incubação curto (18 a 37 dias), e o segundo à icterícia sérica, de período de incubação longo (50 a 180 dias). Tais termos foram aprovados pelo Comitê de Hepatites Virais da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1977, e continuam sendo utilizados até os dias de hoje (ICTV 2006).

Em 1965, o geneticista Baruch Blumberg e seus colaboradores, realizando pesquisa sobre características polimórficas herdadas em diferentes partes do mundo, observaram que em uma amostra de soro de um aborígene australiano havia um antígeno que reagia com o soro de dois hemofílicos politransfundidos, e o denominaram antígeno Austrália (Au) (Blumberg et al. 1965). Esse antígeno também foi encontrado em pacientes com leucemia e síndrome de Down (Blumberg et al. 1967, Sutnick et al. 1968).

Mais tarde, estudos de Prince (1968) e Levene & Blumberg (1969) evidenciaram a associação do antígeno Austrália e a infecção pelo vírus da hepatite B. Em 1970, um pesquisador australiano, identificou o vírus da hepatite B (HBV), com cerca de 42 nm de diâmetro, que foi denominado de partícula de Dane (termo que faz referência ao nome do próprio pesquisador). Ainda, verificou que essa partícula era constituída por um invólucro externo, que correspondia ao antígeno Austrália. Atualmente, esse antígeno é designado como antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (Dane et al. 1970).

1.2 Classificação e Estrutura do Vírus da Hepatite B

1.2.1 Classificação

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, a qual inclui uma variedade de vírus aviários e de mamíferos que compartilham características similares, como organização genética, órgão de tropismo e a estratégia de replicação. Os vírus dessa família que infectam mamíferos estão agrupados no gênero *Orthohepadnavirus*, e os que infectam aves no gênero *Avihepadnavirus* (ICTV 2006).

Como exemplos de vírus do gênero *Avihepadnavirus*, tem-se: DHBV (*Duck hepatitis B virus*), HHBV (*Heron hepatitis B virus*), STHBV (*Storks hepatitis B virus*). Esses vírus foram identificados como agentes de infecção em patos, garças e cegonhas, respectivamente (Mason 1980, Zhou 1980, Sprengel et al. 1988, Pult et al. 2001). No gênero *Orthohepadnavirus*, são encontrados o HBV (*Hepatitis B virus*), WHV (*Woodchuck hepatitis virus*), GSHV (*Ground squirrel hepatitis virus*), WMHBV (*Woolly monkey hepatitis B virus*) e ASHV (*Artic ground squirrel hepatitis virus*), que infectam humanos, marmotas, esquilo de faias, macacos e esquilo do Ártico, respectivamente (Summers et al. 1978, Marion et al. 1980, Seeger et al. 1984, Lanford et al. 1998, Kidd-Ljunggren et al. 2002, Robertson & Margolis 2002).

1.2.2 Características Biológicas

A partícula completa do vírus da hepatite B (*vírion* ou partícula de Dane), com 40-42 nm de diâmetro, apresenta externamente o envelope viral, constituído principalmente pelo antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), e internamente, o nucleocapsídeo ou *core*, que mede cerca de 27 nm de diâmetro (Figura 1). Essa estrutura possui simetria icosaédrica, sendo formada pelo antígeno do *core* (HBcAg) e pelo genoma viral (DNA), que encontra-se associado à enzima DNA polimerase/transcriptase reversa (Tiollais et al. 1985, Befeler & Bisceglie 2000).

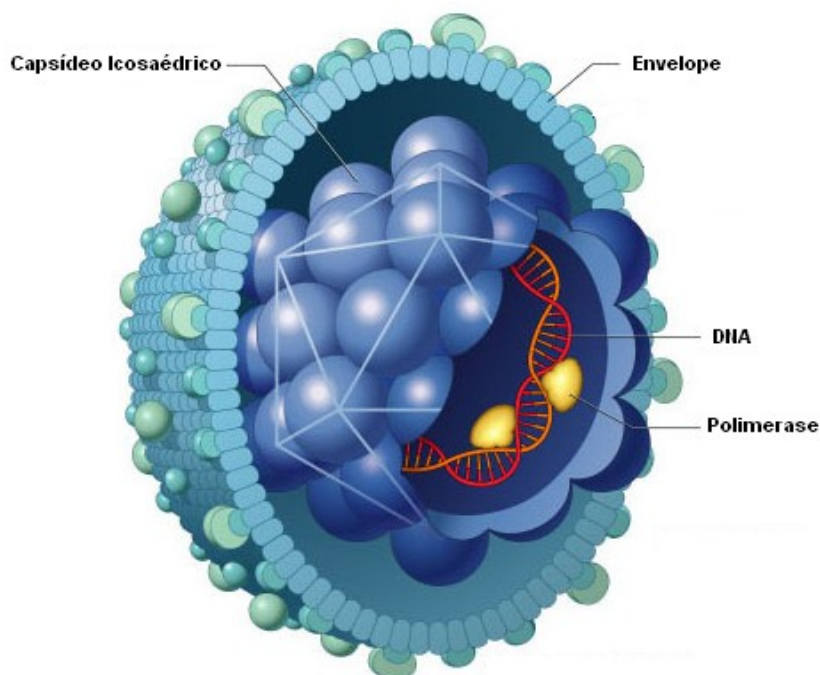


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do vírus da hepatite B Fonte: <http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html> (modificada)

No soro de indivíduos infectados pelo HBV, podem, ainda, ser observadas partículas subvirais, não-infecciosas, que são formadas, principalmente, pelo HBsAg (Figura 2). Tais partículas podem apresentar-se nas formas tubular ou esférica, com diâmetro de 22 nm (Hollinger 1996b, Jilbert & Mason 2002, Khouri & Santos 2004).

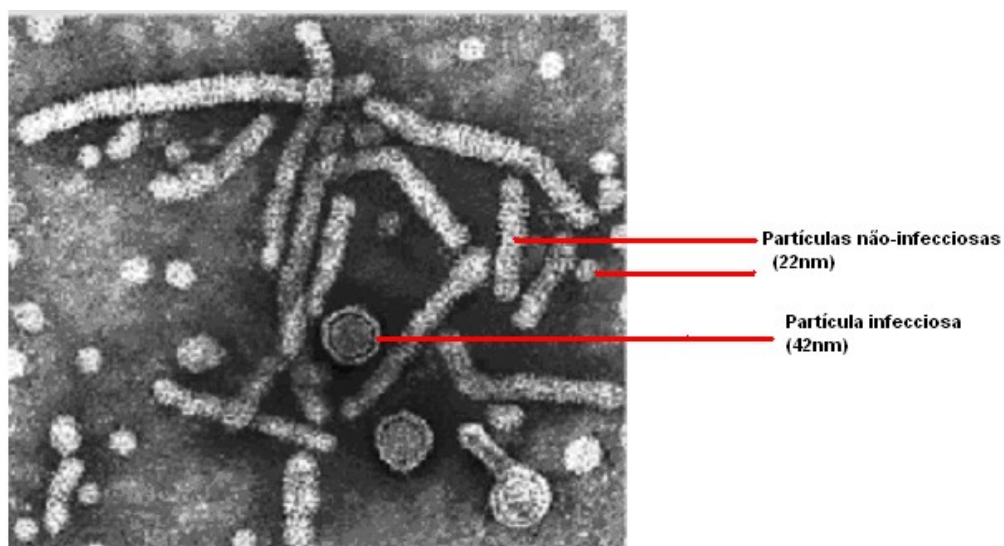


Figura 2 – Micrografia eletrônica do virion e partículas subvirais não infecciosas Fonte: <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Images/Safrica/hbv3b.jpg>

1.2.3 Organização Genômica do HBV

O genoma do HBV é extremamente compacto, sendo um dos menores dentre os genomas de vírus que infectam o homem (Rapicetta et al. 2002). É constituído por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla. A fita incompleta é de polaridade positiva. Já a fita completa tem polaridade negativa, sendo complementar ao RNA mensageiro viral e contém 3200 pares de base (bp) que estão organizados em quatro regiões de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF): Pré-S/S, Pré-C/C, P e X (detalhadas a seguir) (Figura 3). O genoma possui quatro promotores (Pré-S1, Pré-S2/S, *core* e X), que atuam regulando a atividade gênica. Além disso, próximo à extremidade de ambas as fitas, estão presentes seqüências pequenas de 11 nucleotídeos que são diretamente repetidas (*Direct Repeats* - DR) designados de DR1 e DR2. Tais seqüências são importantes na iniciação da replicação do HBV (Tiollais et al. 1985, Seeger et al. 1986, Ganem & Varmus 1987, Kao & Chen 2002, Locarnini 2004, Locarnini & Omata 2006).

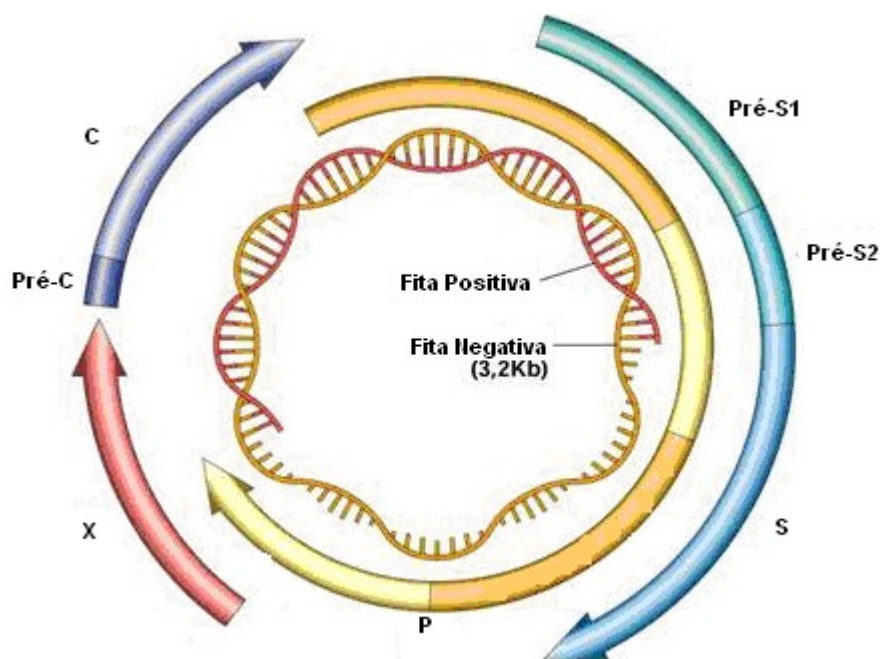


Figura 3 – Genoma do HBV com as quatro regiões de leitura aberta (ORF): pré-S/S, pré-C/C, P e X.

Fonte: <http://www.drthuthuy.com/images/genotype02.jpg> (modificado)

Fase de leitura aberta Pré-S/S

Na ORF pré-S/S, há três códon de iniciação. Dessa forma, a leitura a partir do códon de iniciação Pré-S1 seguida de Pré-S2 e S resulta na formação da proteína grande (L - “large”) que contém 368 aminoácidos (aa). A proteína de tamanho intermediário (M - “middle” 281 aa) é codificada pela região Pré-S2 e S. A menor proteína (S - “small” 226 aa) é sintetizada a partir do códon localizado no início da região S. Assim, todas possuem o mesmo códon de terminação localizado ao final da região S (Figura 3). As três proteínas se distribuem de forma irregular, sendo que as partículas subvirais do HBV são quase que na sua totalidade constituídas pela proteína S, com quantidades variáveis da proteína M. A proteína L está presente em menor porção, ou mesmo ausente nessas partículas (Heermann et al. 1984, Seeger & Mason 2000, François et al. 2001, Kao & Chen 2002).

Nos vírions, há predominância da proteína L, que contém os sítios de ligação do HBV aos receptores celulares específicos (Neurath et al. 1986, Klingmuller & Schaller 1993). A proteína M também tem importância na adsorção do HBV (Thung & Gerber 1984). A proteína S é o constituinte do HBsAg, sendo capaz de induzir anticorpos específicos (anti-HBs), com atividade neutralizante e protetora. Por essa característica, o HBsAg é utilizado no desenvolvimento de vacinas. Além disso, a caracterização antigênica do mesmo tem propiciado a classificação do HBV em diferentes subtipos que serão comentados adiante (Grob 1998, Kidd-Ljunggren et al. 2002).

Fase de leitura aberta Pré-C/C

A região Pré-C/C codifica as proteínas HBeAg e HBcAg, que possuem propriedades antigênicas distintas. A tradução a partir do códon de iniciação localizado na região Pré-C dá origem a um produto que é translocado para o retículo endoplasmático, onde é clivado, resultando na formação de uma proteína solúvel (HBeAg ou antígeno e) (Garcia et al. 1988). O HBeAg não é incorporado aos vírions, sendo então secretado pelos hepatócitos e liberado na circulação sanguínea. Esse antígeno está associado com alta infecciosidade (Hatzakis et al. 2006).

O HBcAg é codificado a partir do códon de iniciação da região C. Esse antígeno é importante na composição do nucleocapsídeo viral, no qual 180 monômeros dessa proteína se organizam, formando a partícula icosaédrica (Nassal & Schaller 1996). O HBcAg está presente no tecido hepático de pacientes infectados pelo HBV, não sendo detectado no soro. Entretanto esse antígeno é capaz de induzir a produção de anticorpos (anti-HBc), independentemente de células T, podendo ser detectáveis no soro, nas frações IgM ou IgG (Milich & Mclachalam 1986, Oubinã 1996).

Fase de leitura aberta P

A ORF P codifica uma enzima com atividade de DNA polimerase, transcriptase reversa e ribonuclease (RNase). Essa ORF sobrepõe as demais regiões e engloba cerca de 3/4 do genoma do HBV. A polimerase viral pode ser dividida em quatro regiões, representadas na Figura 4: (i) domínio amino-terminal, que atua como proteína terminal ou primase, sendo importante para o início da síntese da fita de DNA de polaridade negativa, (ii) região “espaçadora”, que parece não ter função específica, (iii) domínio de transcriptase reversa, que contém sete motivos denominados de A a G e (iv) domínio carboxi-terminal (ou C), que exibe atividade de RNase H (Ngui et al. 1999, Seeger & Mason 2000, Sablon & Shapiro 2005).

A polimerase viral possui o motivo YMDD (Tirosina-Metionina-Aspartato-Aspartato), que é parte do sítio ativo do domínio C, presente também na transcriptase reversa. O uso prolongado de antivirais análogos de nucleosídeos, principalmente a lamivudina, está freqüentemente associado ao desenvolvimento de mutações na polimerase do HBV, causando resistência à esse antiviral (Lai et al. 2003a, Craxi et al. 2006).

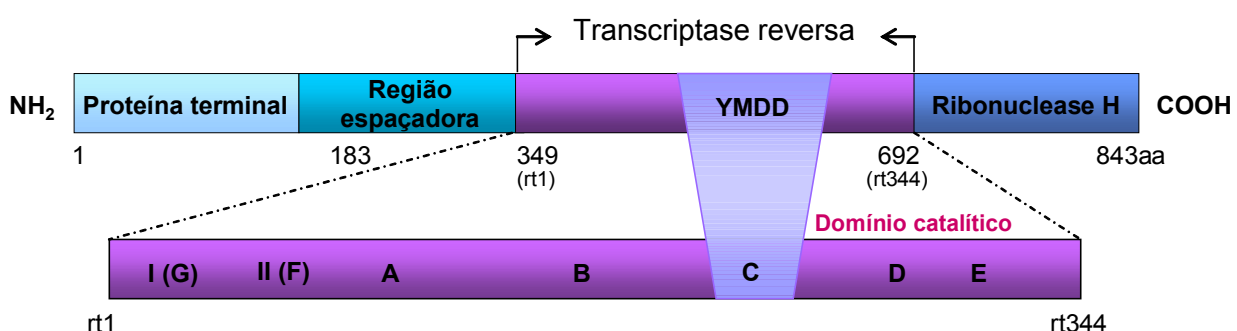


Figura 4 - Organização da HBV polimerase

Fonte: Kay & Zoulim (2007) (modificado)

Fase de leitura aberta X

O gene X é encontrado apenas em vírus que infectam mamíferos e codifica um polipeptídeo (HBx) de aproximadamente 154 aminoácidos. Embora sua função ainda não esteja claramente definida, sabe-se que HBx é uma proteína reguladora que pode ativar a transcrição de alguns genes virais e celulares (Feitelson & Duan 1997, Seeger & Mason 2000). Além disso, alguns estudos realizados com animais transgênicos relataram a associação entre a expressão do gene X e o aparecimento de câncer hepático (Rapicetta et al. 2002, Robertson & Margolis 2002, Cougot et al. 2005).

1.3 Variabilidade Antigênica e Genética do HBV

1.3.1 Subtipos

A heterogeneidade do antígeno de superfície do HBV foi verificada logo após a sua identificação, no início da década de 70, quando Le Bouvier descreveu a presença de dois determinantes antigênicos mutuamente exclusivos *d* e *y*. Posteriormente, em 1972, Bancroft et al. descreveram dois determinantes adicionais, denominados *w* e *r*.

Naquele mesmo ano, o estudo realizado por Le Bouvier, utilizando a técnica de imunodifusão, mostrou que o envelope glicoproteico do HBV contém um epítopo grupo-específico, presente em todos os subtipos, denominado de determinante comum “a”. Até aquele momento, então, sabia-se que cada amostra do HBV poderia ser classificada em quatro grupos de subtipos principais: *adw*, *adr*, *ayw* ou *ayr* (Le Bouvier 1972).

Em 1983, Courocé-Pauty et al. realizaram um grande estudo envolvendo 5337 soros de portadores crônicos do HBV provenientes de vários países. Esse

estudo contribuiu para a identificação dos nove subtipos sorológicos do HBV, conhecidos como *adw2*, *adw4*, *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *adrq+*, *adrq-* e *ayr* (Figura 5).

Com a realização de estudos moleculares, ficou estabelecido que os subdeterminantes são especificados por mutações pontuais no gene S, nos nucleotídeos 365 e 479, resultando em substituições, respectivamente, nos aminoácidos na posição 122 (lisina para arginina), que determinam os subtipos *d* ou *y*, e na posição 160 (*w* ou *r*). As alterações no aminoácido 127 estão associadas a subespecificidades do subdeterminante *w* (*w1-w4*) (Quadro 1) (Magnius & Norder 1995, Kidd-Ljunggren et al. 2002, Kramvis et al. 2005). Ainda, outras mudanças em aminoácidos nas posições 144, 145, 158, 159, 177 e 178 estão relacionadas aos demais determinantes (Okamoto et al. 1987b, Okamoto et al. 1989, Norder et al. 1992a).

Quadro 1 - Resíduos de aminoácidos que especificam os determinantes do HBsAg

Posição	Aminoácido	Especificidade	Posição 160	
			Lisina	Arginina
122	Lisina	<i>d</i>	<i>dw</i>	<i>dr</i>
	Arginina	<i>y</i>	<i>yw</i>	<i>yr</i>
127	Prolina	<i>w1-w2</i>		
	Treonina	<i>w3</i>		
	Leucina	<i>w4</i>		

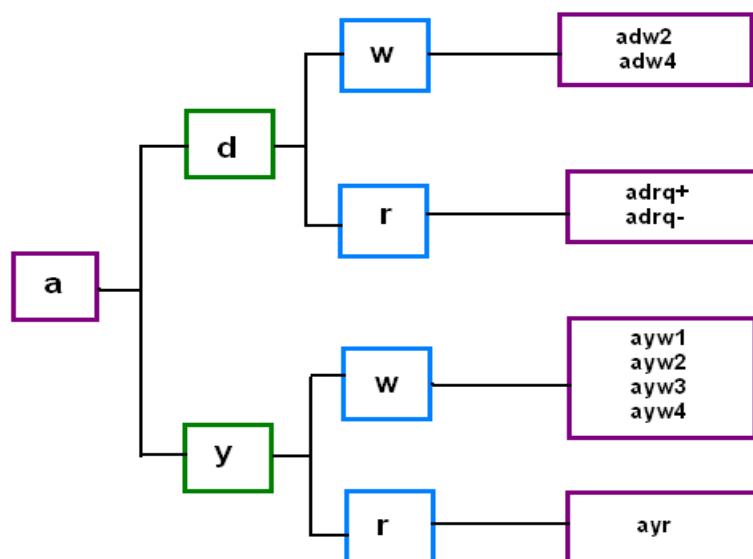


Figura 5 - Determinante “a” e subdeterminantes *d* ou *y* e *w* ou *r*, com os subtipos sorológicos do HBV

A identificação dos subtipos pode ser uma ferramenta útil na compreensão epidemiológica da infecção pelo vírus da hepatite B numa determinada população, podendo inclusive, em alguns casos, ajudar a estabelecer rotas e mecanismos de transmissão (Kidd-Ljunggren et al. 2002).

1.3.2 Genótipos

Okamoto et al. (1998) sugeriram que a heterogeneidade do HBV poderia ter uma organização em grupos genômicos, uma vez que a análise da sequência completa de nucleotídeos de 18 amostras do vírus permitiu verificar a existência de quatro grupos que apresentavam uma divergência de mais de 8% entre eles, sendo esses designados de genótipos A, B C e D. Um grau de divergência na sequência genômica completa $\geq 8\%$ ou no gene S $>4\%$ é utilizado para a definição dos genótipos do HBV (Okamoto et al. 1988, Norder et al. 1992a,b, 1994).

Posteriormente, Norder et al., comparando a região S, encontraram mais dois genótipos (E e F) (Norder et al. 1992b, 1994). No ano de 1993, no Brasil, foi identificada uma amostra pertencente ao genótipo F, subtipo *adw4*, que apresentava

uma divergência na seqüência genômica de 15%, sendo considerada a maior divergência relatada entre isolados do HBV em humanos (Naumann et al. 1993).

Nesses últimos sete anos, mais dois genótipos foram descritos. Stuyver et al. (2000) identificaram o genótipo G, em amostras de doadores de sangue da França e Estados Unidos, e Arauz-Ruiz et al. (2002) o genótipo H, em amostras de indivíduos provenientes do Nicarágua e Estados Unidos. Dessa forma, até o presente momento, o HBV pode ser classificado em oito genótipos principais, que são denominados em ordem alfabética de A-H (Figura 6).

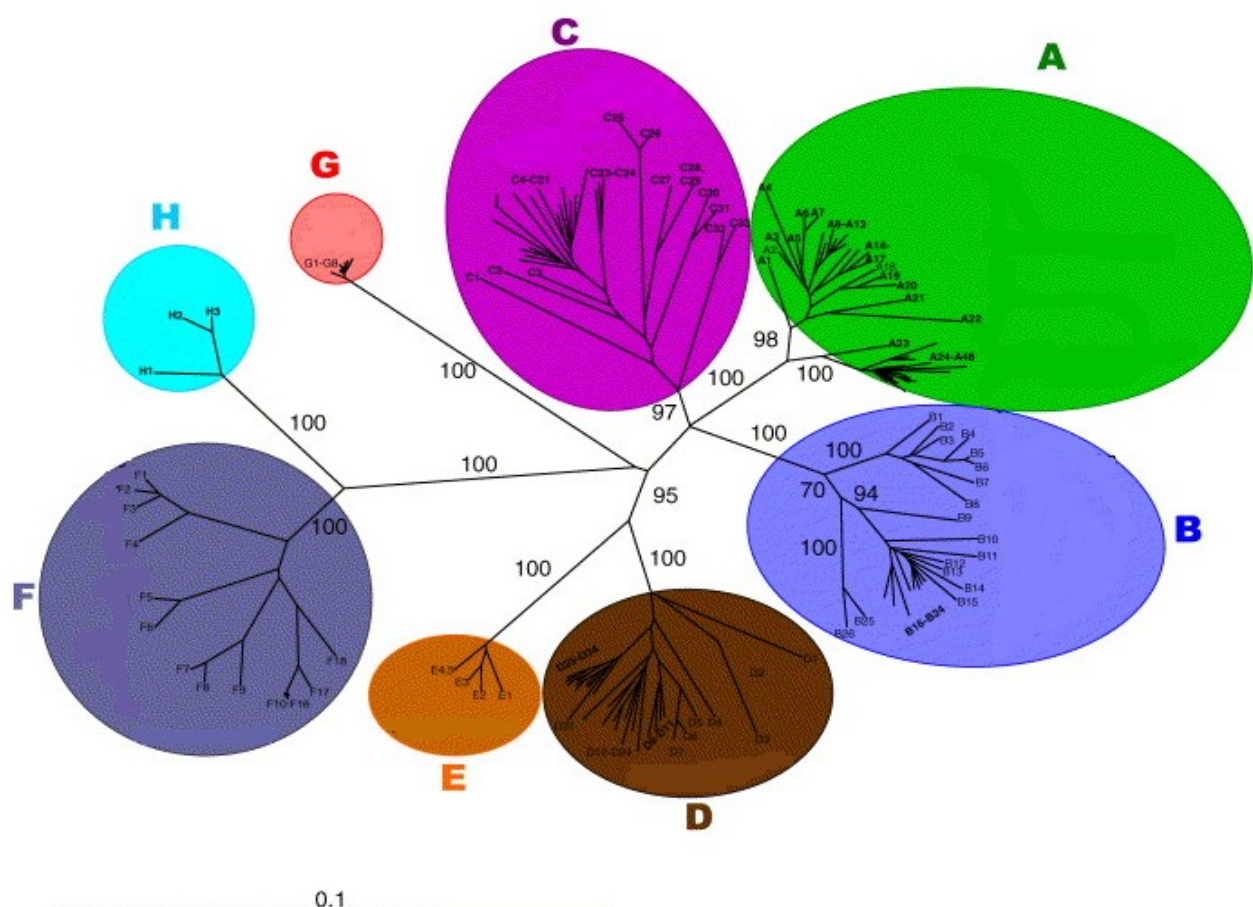


Figura 6 – Árvore filogenética com os oito genótipos do HBV (A-H)

Fonte: Kramvis et al. 2005 (modificada)

Os genótipos e subtipos do HBV apresentam uma certa correlação (Quadro 2). De forma geral, isolados *adw* são encontrados nos genótipos A, B, F, G e H, enquanto que os do genótipo C correspondem aos subtipos *adr* e *ayr*. Já nos

genótipos D e E, geralmente são encontrados isolados ayw (Kao 2002, Miyakawa & Mizokami 2003).

Quadro 2 - Correlação dos genótipos e subtipos do HBV

Genótipo	Subtipo
A	<i>adw2, ayw1</i>
B	<i>adw2, ayw1</i>
C	<i>adrq+, adrq-, ayr</i>
D	<i>ayw2, ayw3</i>
E	<i>ayw4</i>
F	<i>adw4, adw2, ayw4</i>
G	<i>adw2</i>
H	<i>adw4</i>

Re-infecção e infecção simultânea com diferentes genótipos do HBV têm sido descritas (Kramvis 2005, Schaefer 2005). A infecção com genótipo G parece ser comumente associada à infecção com genótipo A (Kato et al. 2002a). Também já foram observadas recombinações entre os genótipos A/D, B/C e A/C (Bollyky et al. 1996, Hannoun et al. 2000, Morozov et al. 2000, Owiredo et al. 2001, Jeantet et al. 2002, Sugauchi et al. 2002).

Assim como os subtipos, o estudo dos genótipos do HBV pode ser útil para traçar rotas de transmissão desse vírus. Além disso, os genótipos podem influenciar a progressão da doença hepática, bem como a resposta à terapia antiviral em pacientes com hepatite B (Miyakawa & Mizokami 2003, Echavarria 2005, Günther 2006).

Subgenótipos

O termo “subgenótipo” é usado quando há divergência nucleotídica de 4 a 8% dentro de um mesmo grupamento genotípico. Para designar esses subgrupos, muitas vezes, são usados sufixos (letras alfabéticas), geralmente indicando o local de origem da amostra. Entretanto, alguns autores defendem que a utilização de números cardinais proporciona uma melhor identificação (Kramvis et al. 2005).

Em 1997, Bowyer et al., ao realizarem a análise filogenética da região Pré-S2 e S em amostras da África do Sul, identificaram o subgenótipo A1 (também conhecido como A' ou Aa), sendo que o sufixo “a” indica amostras oriundas da África e Ásia. O subgenótipo A2, A-A' ou Ae é referente as amostras de origem européia. Mais recentemente, Kurbanov et al. (2005) identificaram o subgenótipo A3 ou Ac (amostras provenientes de Camarões) (Bowyer et al. 1997, Sugauchi et al. 2004a, Kurbanov et al. 2005).

Similarmente, o genótipo B pode ser classificado em cinco subgrupos: Bj ou B1, Ba ou B2, B3, B4 e B5 (Sugauchi et al. 2002, 2003a, 2004b, Norder et al. 2004, Nagasaki et al. 2006, Sakamoto et al., 2006). Em 2004, um estudo envolvendo análise filogenética, realizado por Huy et al., classificou o genótipo C em C1 e C2. Além desses, já foram descritos os subgenótipos C3, C4 e C5 (Huy et al. 2004, Norder et al. 2004, Günther 2006, Sakamoto et al. 2006).

Para o genótipo D, já foram observados cinco subgenótipos (D1-D5) (Norder et al. 2004, Banerjee et al. 2006, De Maddalena et al. 2007). Em relação ao genótipo F, inicialmente, Mbayed et al. (2001) propuseram quatro subgenótipos, que foram previamente nomeados de *clusters* (I-IV). Entretanto, posteriormente, o *cluster* I foi designado de subgenótipo F1, e os *clusters* II e IV compreendem o subgenótipo F2. O *cluster* III, atualmente, corresponde ao genótipo H (Norder et al. 2004, Kato et al. 2005). Além desses, já foram identificados os subgenótipos F3 e F4 (Devesa et al. 2004, Huy et al. 2006).

1.3.3 Mutações no genoma do HBV

Os termos mutantes e variantes são usados para descrever todos os vírus geneticamente heterogêneos, independentemente do mecanismo causal (François et al. 2001). É estabelecido que os diferentes genótipos do HBV são considerados como formas estáveis do vírus, os quais resultam de alterações selecionadas por muitos anos, pela pressão seletiva da população. Já os mutantes surgem em indivíduos sob uso de medicações, ou naturalmente na hepatite B crônica, induzidos pela pressão imune (Weber 2005).

O genoma do HBV tem alta taxa de mutações, presentes em todos os genes virais e elementos regulatórios, sendo 10 vezes maior que outros vírus DNA e aproximadamente 10^4 vezes mais freqüente que no genoma humano. Entretanto, as taxas de substituições dos nucleotídeos podem variar de acordo com o estágio da doença. Considerando a evolução natural, na infecção crônica, essas taxas são de aproximadamente $1,4 \times 10^{-5}$ a $3,2 \times 10^{-5}$ substituições/sítio/ano. Já em transplantados, são mais elevadas, podendo ocorrer até 100 vezes mais (Okamoto et al. 1987a, Sterneck et al. 1997, Mizokami & Orito 1999, Lim et al. 2006).

Mutações na região S

Mutações no gene S foram primeiramente descritas há cerca de 17 anos atrás (Carman et al. 1990). Atualmente, são encontradas mutações nas regiões Pré-S1/2 e S, sendo caracterizadas pela positividade simultânea dos marcadores HBsAg e anti-HBs ou HBsAg negativo e anti-HBs positivo. Essas situações ocorrem principalmente em portadores crônicos do HBV (Blum et al. 1997, Khouri & Santos 2004).

Muitos isolados apresentam mutação no gene S, reconhecida pela troca de uma glicina por arginina no códon 145 (G145R), sendo essa a mais frequentemente documentada (Weber 2005, Hatzakis et al. 2006). Esse mutante torna-se estável no decorrer do tempo, sendo capaz de replicar-se em altos títulos por muitos anos (Carman et al. 1990). Além disso, pode ser transmitido horizontalmente, uma vez que persiste em leucócitos no sangue periférico de portadores assintomáticos do HBV (Chakravarty & Varadarajan 2000). Ainda, a mutação G145R em combinação

com inserção no determinante “a” entre os aminoácidos 122 e 123 do HBsAg parece estar relacionada com hepatite fulminante (Carman et al. 1995).

Há outras mutações descritas para o gene S, sendo que algumas delas alteram os aminoácidos nas posições 120, 123, 124, 126, 129, 131, 133 e 141. Na região Pré-S, há também uma substituição de aspartato pela alanina no resíduo 144 (SD144A) (Seddigh-Tonekaboni et al. 2000).

Tais alterações podem resultar em reativação da doença em portadores crônicos, falha na detecção do HBsAg e evasão à resposta imune protetora (anti-HBs), podendo, assim, prejudicar a terapia baseada na utilização de anticorpos específicos na supressão da infecção em indivíduos transplantados (Carman et al. 1990, Blum 1993). Além disso, mutações na região S podem ter implicação epidemiológica, pois, a dificuldade de detecção sorológica do HBsAg facilita a disseminação do HBV por transfusão sanguínea, principalmente em locais de alta prevalência e que não adotam técnicas moleculares para triagem de doadores (Chang 2006, Fang 2006, Lelie & Heaton 2006, Liu et al. 2006a).

Mutações na região Pré-core e Core

Assim como nas mutações do gene S, o surgimento de variantes da região Pré-core e core também está geralmente associado à infecção crônica. Casos de mutações pré-core foram descritos pela primeira vez na Itália, em que mostravam ausência de marcador HBeAg, embora permanecessem detectáveis o HBsAg, anti-HBe, anti-HBc e o DNA viral (Brunetto et al. 1990).

Essas mutações estão relacionadas com aumento da gravidade da doença hepática crônica e hepatite B fulminante, sendo prevalentes em regiões como a Ásia e Mediterrâneo, onde os genótipos B, C e D são predominantes. Por outro lado, são raras na América do Norte e Europa, onde o genótipo A é comumente encontrado (Rodriguez-Frias et al. 1995, Lindh 1997, Dai et al. 2001, Hadziyannis & Vassilopoulos 2001, Shiraki et al. 2002, Hatzakis et al. 2006).

As mutações que produzem um códon de parada na região Pré-core são geralmente pontuais, havendo a substituição de um único nucleotídeo (nt). Algumas delas tem sido descritas no nt 1762 (A→T), 1764 (G→A), 1835 (A→C), 1896 (G→A) e 1899 (G→A), sendo responsáveis pela redução da expressão do HBeAg. Dessas, a mutação no códon 28 (G1896→A) é a mais comum, resultando na interrupção da síntese do HBeAg. Contudo, o impacto dessa mutação na história natural da hepatite B e o seu papel na patogênese da doença hepática permanece desconhecido. Mutações nas posições 1817, 1874 e 1897 também causam alterações na síntese do HBeAg, bem como aquelas nos nucleotídeos 1814, 1815 e 1816 (Brunetto et al. 1989, Carman et al. 1989, Protzer et al. 1996, Dai et al. 2001, Dumps et al. 2001, Hadziyannis & Vassilopoulos 2001, Locarnini et al. 2003).

A mutação resultante da alteração da guanina (G) na posição 1896 por adenina (A) confere um aumento na estabilidade da estrutura secundária do sinal de encapsidação, sendo a mesma observada nos genótipos que possuem o nucleotídeo T na posição 1858 (B, D, E e em alguns isolados dos genótipos C e F) (Bonino & Brunetto 2003, Yoo et al. 2003). Apesar dessa mutação estar associada ao aumento da gravidade da doença hepática, tendo em vista sua detecção em pacientes com doença hepática ativa ou hepatite fulminante, foi detectada também em portadores assintomáticos HBeAg negativos (Yoo et al. 2003).

A ocorrência de positividade concomitante para HBsAg, anti-HBe e HBV DNA podem ser especialmente associadas a mutação dupla (1762 A→T e 1764 G→A) que afeta o promotor basal do core (BCP). Essa mutação foi primeiramente descrita em pacientes japoneses (Okamoto et al. 1994, Sato et al. 1995), sendo encontrada mais frequentemente nos genótipos A e H (que apresentam citosina no nt 1858) e também nos subgenótipos Ba e Bj (Chan et al. 1999, Sugauchi et al. 2003a). Além disso, estão relacionadas à cirrose hepática, hepatocarcinoma e reativação da replicação do HBV (Takahashi et al. 1995, Baumert et al. 1996, Gerner et al. 1999, Tong et al. 2005).

Mutações na região X

Alguns mutantes do HBV apresentam deleções na região X, sendo geralmente associados à diminuição da expressão do HBsAg, o que dificulta a detecção desse marcador por testes sorológicos e até mesmo por técnicas moleculares, se direcionadas à região deletada. Esses mutantes foram inicialmente encontrados em casos de hepatite pós-transfusional em crianças talassêmicas politransfundidas (Feitelson et al. 1994), pacientes em hemodiálise nos Estados Unidos (Feitelson et al. 1995) e no Japão (Uchida et al. 1994). Ainda no Japão, Fukuda et al. (1996) e Moriyama et al. (1997) encontraram deleções em nucleotídeos na região X, nas posições (1763-1770) e (1753-1772), respectivamente.

Mutações na região P

Os estudos de mutações envolvendo a região da polimerase, basicamente estão relacionados ao tratamento da hepatite B. O uso prolongado de antivirais, principalmente a lamivudina (3TC ou 2'-3'-dideoxi-3'-tiacitidina), está frequentemente associado ao desenvolvimento de mutações, causando resistência a esse antiviral. Como referido, essas mutações estão relacionadas à alterações na transcriptase reversa, na sequência YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato) (Craxi et al. 2006).

1.4 Replicação do Vírus da Hepatite B

Apesar de ser bem estabelecido que os hepatócitos são o sítio primário da replicação do HBV, ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos dos eventos iniciais desse ciclo replicativo, como a adsorção, penetração, desnudamento e liberação do genoma viral dentro do núcleo da célula (Seeger & Mason 2000, Ganem & Schneider 2001, Locarnini & Omata 2006). Entretanto, há algumas evidências que indicam a participação das proteínas L, M e S na ligação da partícula viral aos receptores celulares (Neurath et al. 1986, Pontisso et al. 1989).

Após a adsorção, o vírus perde seu envelope e o *core* é transportado ao núcleo celular, onde o HBV DNA é liberado e se converte, por ação da DNA polimerase viral, a uma forma circular covalentemente fechada (cccDNA – *covalently*

closed circular). A RNA polimerase II celular transcreve o genoma do HBV a partir do cccDNA em RNAs pré-genômico e subgenômico, sendo que todos eles são capeados na extremidade 5' e compartilham o mesmo sinal de poliadenilação (AATAAA) na extremidade 3' (Seeger & Mason 2000, Gonçalves 2002, Ganem & Prince 2004, Locarnini 2004, Locarnini & Omata 2006).

Em seguida, as moléculas de RNAm viral são transportadas para o citoplasma e traduzidas em proteínas do *core*, polimerase e X. Logo após essa tradução, o RNA pré-genômico é encapsidado dentro das partículas do *core* (HBcAg), juntamente com a polimerase viral. Essa encapsidação parece ser resultado da interação da polimerase, proteínas do capsídeo e de um sinal de encapsidação (ϵ), localizado na extremidade 5' do RNA pré-genômico (Bartenschlager & Schaller 1992, Ganem 1996, Seeger & Mason 2000, Ganem & Schneider 2001, Ganem & Prince 2004, Locarnini 2004, , Locarnini & Omata 2006).

No interior do nucleocapsídeo, há a transcrição reversa do RNA pré-genômico em DNA, com a síntese da fita de DNA de polaridade negativa, e posteriormente, há formação da fita de polaridade positiva, que permanece incompleta. A partir daí, o nucleocapsídeo adquire o envelope lipoprotéico no retículo endoplasmático ou complexo de golgi e, finalmente, a partícula viral completa é liberada da célula hepática. Curiosamente, algumas moléculas de DNA, voltam ao núcleo, possibilitando uma espécie de reservatório intranuclear, podendo ser convertidas em cccDNA (Gerelsaikhon et al. 1996, Seeger & Mason 2000, Ganem & Prince 2004). O ciclo replic

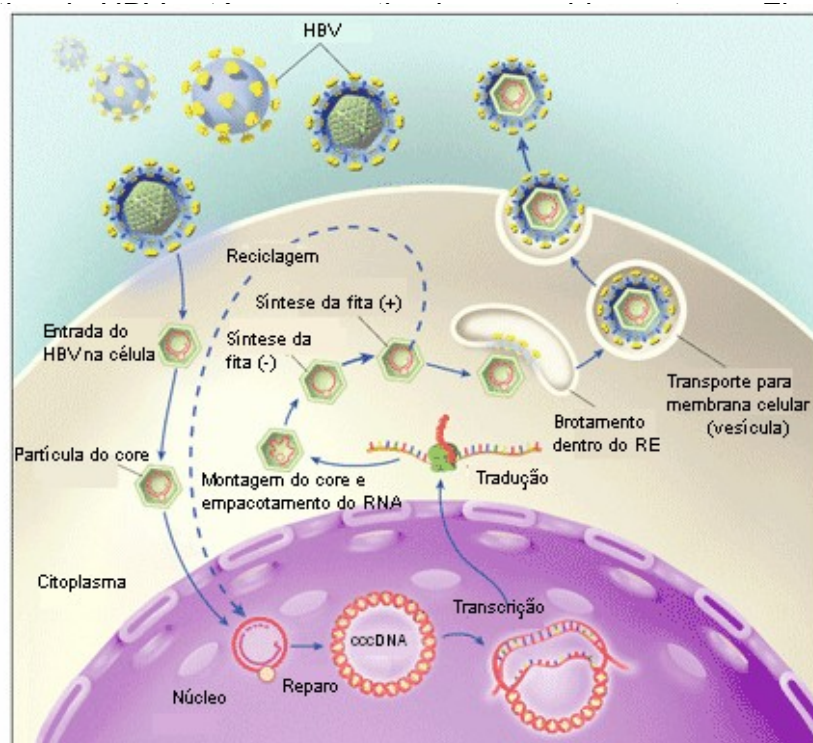


Figura 7 – Representação esquemática do ciclo replicativo HBV

Fonte: (http://www.infekt.ch/updown/images/hbv_cycl.gif)

1.5 Aspectos Clínicos e Tratamento da Hepatite B

A hepatite B pode se manifestar como uma doença aguda autolimitada ou em formas graves, como a hepatite fulminante. A evolução da hepatite B aguda inclui quatro fases: período de incubação, prodrômica (pré-ictérica), ictérica e de convalescência (Focaccia 2002). O período de incubação é de 45 a 180 dias, dependendo de fatores como idade do paciente, modo de transmissão, porta de entrada e resposta imune do hospedeiro (Befeler & Di Bisceglie 2000, Juszczuk 2000).

Logo após o período de incubação, ocorre a fase prodrômica, na qual o indivíduo apresenta sinais e sintomas inespecíficos, incluindo mal-estar, febre baixa, anorexia, mialgia, náusea, vômito e dor abdominal. Em seguida, além desses, pode surgir a icterícia (fase sintomática), que é uma importante manifestação clínica das hepatites virais, sendo resultado do aumento dos níveis de bilirrubina no sangue, causando uma coloração escurecida da urina (colúria), descoloração das fezes (acolia fecal) e uma coloração amarelada das mucosas da conjuntiva, esclerótida e pele. A fase ictérica dura cerca de três a quatro semanas. Entretanto, a infecção aguda pelo HBV, geralmente, é assintomática em crianças, estando a icterícia presente em apenas 5-15% delas com 1-5 anos de idade. Já em adultos, está presente em 30 a 50% dos casos. Por último, o período de convalescência é marcado pela eliminação viral e melhora da sintomatologia clínica, com duração de 20 a 30 dias (Befeler & Di Bisceglie 2000, Gonçalves 2002).

Na progressão para o estado de portador crônico do HBV, o organismo do indivíduo não consegue eliminar o vírus e o HBsAg permanece detectável por mais de 6 meses. O risco de evolução para a cronicidade varia conforme a idade. Dessa forma, quando a infecção é adquirida no período neonatal, cerca de 90% dos casos evoluem para a cronicidade. Em crianças com idade de 1 a 5 anos, esse índice é de 25% a 50%, e em adultos de 6% a 10% (Mahoney 1999, Befeler & Di Bisceglie 2000). A hepatite B crônica pode ainda resultar em cirrose hepática, sendo essa considerada a causa mais comum de carcinoma hepatocelular no mundo (Liaw et al. 2004).

O impacto dos genótipos do HBV no curso natural da infecção e na resposta ao tratamento tem sido estudado nos últimos anos. A infecção pelo genótipo A está associada a índices maiores de remissão espontânea e desenvolvimento de formas mais leves da doença (Sánchez-Tapias et al. 2002, Thakur et al. 2002). Os infectados com o genótipo C podem desenvolver doença hepática mais grave e com maior frequência do que aqueles com genótipo B ou D. Alguns estudos demonstraram a associação entre o genótipo C e carcinoma hepatocelular (Kao et al. 2000, Orito et al. 2001, Chan et al. 2003, Nakayoshi et al. 2003, Duong et al. 2004, Yu et al. 2005). Além disso, um estudo realizado com pacientes infectados com genótipo F na Espanha, sugere que esse genótipo pode ser associado à maior frequência de falência hepática e morte (Sánchez-Tapias et al. 2002).

Em relação aos subgenótipos, diferenças clínicas e virológicas entre Aa e Ae foram relatadas. A infecção pelo Aa está associada à ausência do antígeno e (HBeAg) e níveis baixos do HBV DNA no soro. Esse perfil tem sido associado a alta incidência de hepatocarcinoma induzido pela infecção pelo vírus da hepatite B na África, onde o genótipo A, subgenótipo Aa é predominante (Kramvis et al. 1997, 1998, Kew et al. 2005).

Diferenças na resposta à terapia antiviral e na prevalência do HBeAg em portadores crônicos do HBV infectados com Bj e Ba já foram relatadas (Akuta et al. 2003, Sugauchi et al. 2003a). Entretanto, não foram verificadas diferenças virológicas importantes entre esses dois subgenótipos, e o fato de ser portador de Ba ou Bj parece não afetar a gravidade da doença (Kobayashi et al. 2005).

O ideal na terapêutica da hepatite B seria a eliminação do vírus do organismo. Contudo, com a complexidade dessa infecção (como a persistência do cccDNA) e limitações da terapia existente, o alvo do tratamento é a supressão da replicação viral, visando a remissão da doença hepática, normalização dos níveis de ALT e conseqüentemente a redução do risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (Alberti et al. 2002, Conjeevaran & Lok 2003, Lai et al. 2003b, Pawlowsky 2006, Zoulim 2006).

Não há necessidade do uso de antivirais na hepatite B aguda. E em casos de hepatite fulminante, a conduta recomendável é o transplante hepático (De Franchis et al. 2003). Sendo assim, o tratamento é indicado em casos em que os níveis de ALT permanecem altos, na persistência do HBsAg ou HBV DNA por mais de seis meses, ou, ainda, quando a biópsia hepática sugere hepatite B crônica (Hoofnagle & Di Bisceglie 1997, Pawlowsky 2003, Sanchez-Quijano 2006).

Os principais agentes antivirais aprovados, ou em desenvolvimento, pertencem a duas categorias, dependendo do mecanismo de ação, os moduladores do sistema imune, como interferon alfa ($INF\alpha$), e os inibidores da polimerase, que são análogos de nucleosídeos, como por exemplo a lamivudina e o adefovir dipivoxil (Zoulim 2006). Atualmente, existem cinco fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da infecção crônica para o HBV: interferon alfa-2b (aprovado em 1992), lamivudina (1998), adefovir dipivoxil (2002), peginterferon alfa-2a (2005) e entecavir (2005) (Krastev 2006, Sanchez-Quijano 2006, Zoulim 2006). Ainda, novos fármacos em fase de licenciamento ou em teste, vêm sendo estudados, como clevidina e telbivudina. Além disso, a emtricitabina (FTC) e o tenofovir têm mostrado atividade antiviral em infecção pelo HIV e HBV (Craxi 2006, Krastev 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde oferece gratuitamente o interferon alfa e lamivudina, para o tratamento da infecção crônica pelo HBV. A taxa de resposta ao $INF\alpha$ é baixa e está associada ao aparecimento de eventos adversos importantes (resfriados, perda de peso, alopecia, trombocitopenia, leucopenia, alterações tireoidianas e neuropsiquiátricas, dentre outros). Além disso, a injeção subcutânea é

a única via de administração dessa medicação. Essas características podem ser agravantes e interferir nos índices de adesão dos pacientes ao tratamento (Brasil 2005).

A lamivudina tem a vantagem da administração por via oral e possui um mecanismo de ação que visa inibir a replicação viral, através do bloqueio da atividade da polimerase/transcriptase reversa, resultando em diminuição significativa nos níveis séricos do DNA viral (Clarke & Bloor 2002, Conjeevaran & Lok 2003, Zoulim 2006). O uso adequado da lamivudina reflete em decréscimo dos níveis da carga viral, manutenção de baixos níveis de HBeAg, com ou sem a detecção do anti-HBe, normalização dos níveis de ALT e uma melhora hepática com comprovação histológica (Clarke & Bloor 2002, Conjeevaran & Lok 2003, Zoulim 2006). Entretanto, o inconveniente do uso prolongado da lamivudina é o desenvolvimento de resistência, que ocorre em cerca de 70% dos pacientes quando utilizada por um tempo superior a quatro anos (Conjeevaram & Lok 2003, Lai et al. 2003a, Lok et al. 2003).

O adefovir dipivoxil tem mostrado ser efetivo no tratamento de indivíduos que apresentam essa resistência. O seu uso em associação à lamivudina demonstrou uma adequada supressão de mutantes do HBV resistentes à lamivudina (Conjeevaram & Lok 2003, Craxi et al. 2006, Krastev 2006).

Diferenças entre os genótipos podem influenciar no tratamento antiviral. Pacientes infectados com genótipo C ou D apresentam uma menor resposta ao interferon do que aqueles infectados com genótipos A ou B (Kao et al. 2002, Janssen et al. 2005). Isso é devido a ocorrência de mais mutações na região do promotor basal do *core* dos genótipos C e D, em relação aos genótipos A e B. Estudos sobre interferência dos genótipos na resposta à lamivudina ainda são raros. Contudo, Zollner et al. (2001 e 2004) mostraram que há um maior risco de desenvolvimento de resistência à lamivudina no genótipo A, se comparado ao genótipo D.

1. 6 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HBV

O diagnóstico dessa infecção deve englobar achados bioquímicos (níveis de alanina aminotransferase-ALT e de aspartato aminotransferase – AST), assim como a detecção dos marcadores sorológicos específicos, que incluem a pesquisa de antígenos (HBsAg e HBeAg), dos seus respectivos anticorpos (anti-HBs e anti-HBe) e do anti-HBc (IgM e Total) (Hollinger 1996b). Os antígenos e anticorpos podem ser detectados empregando-se ensaio imunoenzimático (ELISA) ou radioimunoensaio (RIE) (Hollinger 1996b, Mahoney 1999, Badur & Akgun 2001).

O HBsAg é o primeiro marcador sorológico encontrado no soro de pacientes infectados pelo HBV (Figura 8), podendo ser detectado antes mesmo do aparecimento de sintomas, como a icterícia. Surge, geralmente, até a sexta semana após a exposição ao vírus. Na recuperação da infecção, há um declínio nos títulos desse antígeno dentro de um período de quatro a seis semanas, e a partir daí ocorre o surgimento de anticorpos específicos (anti-HBs), sendo esse último, indicador de recuperação clínica e imunidade ao HBV (Ferreira 2000, Badur & Akgun 2001).

O HBcAg induz a formação de anticorpos anti-HBc IgM, que surgem por volta da sexta semana, desaparecendo até o sexto mês de infecção. Esses anticorpos são considerados como marcador de infecção aguda. Posteriormente, o marcador anti-HBc total pode permanecer detectável por toda a vida, sendo considerado marcador de exposição ao HBV (Badur & Akgun 2001).

O HBeAg é outro antígeno importante que surge na fase aguda, persistindo por um tempo de três a seis semanas, desaparecendo após a resolução da infecção. Por outro lado, pode permanecer por vários meses ou anos, durante a infecção crônica e está associado à elevada replicação viral nos hepatócitos e infecciosidade. Em resposta ao HBeAg, surgem anticorpos anti-HBe, que estão associados a diminuição ou ausência de replicação viral. O aparecimento desses anticorpos ainda na infecção aguda pode indicar uma possível resolução espontânea da infecção (Hollinger 1996b, Ferreira 2000, Badur & Akgun 2001).

A infecção crônica pelo vírus da hepatite B é definida pela persistência do HBsAg por um período maior ou igual a seis meses, podendo ainda ser detectados

os marcadores anti-HBc total, HBeAg ou anti-HBe no soro (Hollinger 1996b, Befeler & Di Bisceglie 2000) (Figura 9).

Mais recentemente, a hepatite B tem sido diagnosticada pela detecção do DNA viral empregando-se técnicas moleculares, como a reação da polimerase em cadeia (PCR) (Hollinger 1996b, Ferreira 2000, Badur & Akgun 2001). O HBV DNA pode ser encontrado no soro de indivíduos com infecção aguda ou crônica, sendo associado à replicação do vírus. O seu desaparecimento na fase aguda indica resolução espontânea da infecção. Já na infecção crônica, os níveis de DNA no soro estão relacionados à dinâmica de seu curso com as seguintes fases: imunotolerância (altos níveis de replicação viral), imunoliberação (baixos níveis de HBV DNA) e “latência clínica” (níveis muito baixos ou indetectáveis de DNA) (De Franchis et al. 2003, Pawlotsky 2003). A análise quantitativa do HBV DNA (carga viral) tem sido utilizada no monitoramento da resposta à terapia antiviral (Hollinger 1996b, Mahoney 1999, Lok 2000).

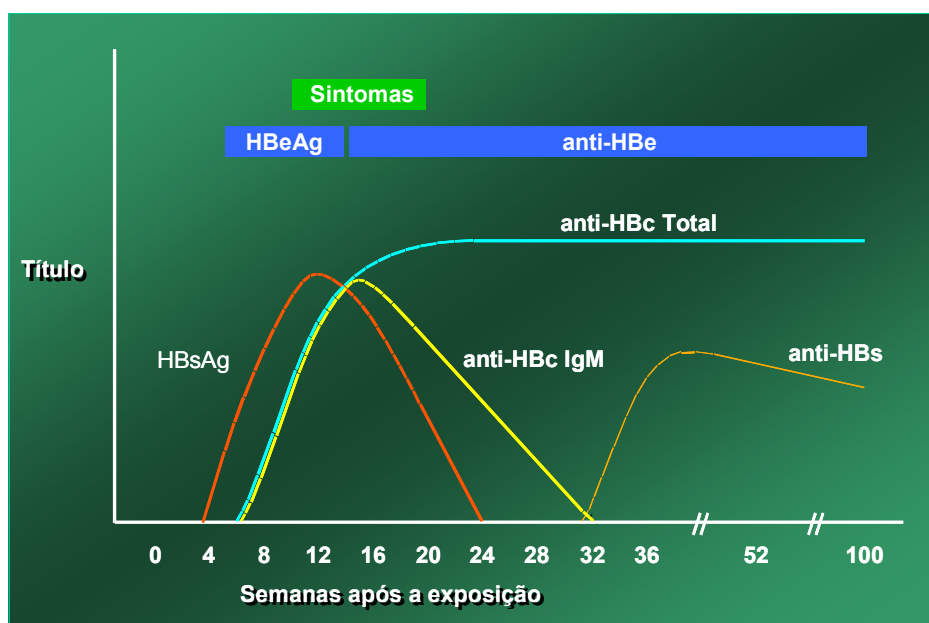


Figura 8 – Perfil sorológico da hepatite B aguda
 Fonte: CDC - www.cdc.gov/hcidod/diseases/hepatitis/slideset (modificado)

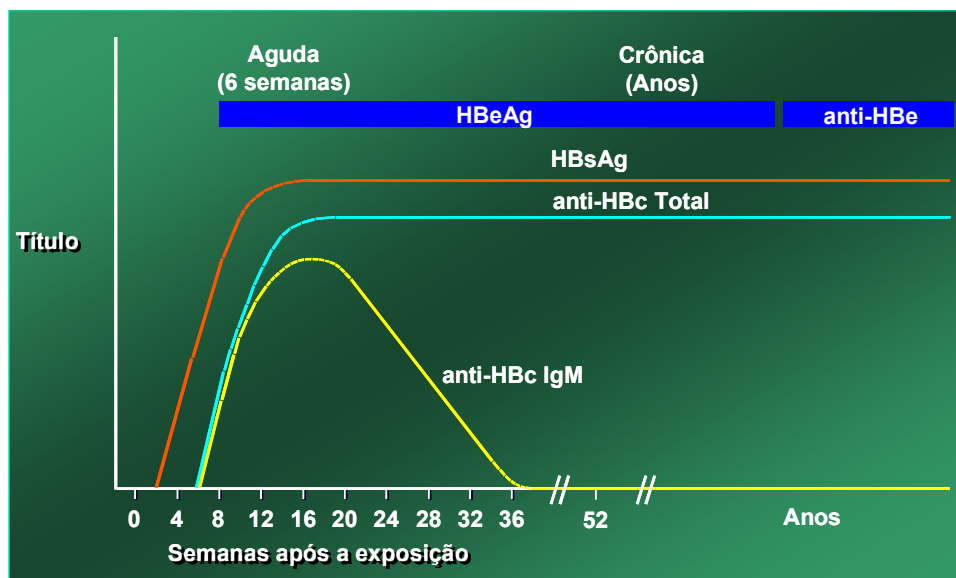


Figura 9 – Perfil sorológico da hepatite B crônica
 Fonte: CDC - www.cdc.gov/hcidod/diseases/hepatitis/slideset (modificado)

A hepatite B oculta, também conhecida como infecção “silenciosa” ou “latente”, é definida pela presença do HBV DNA no soro e/ou no fígado, com concomitante ausência do marcador HBsAg. Geralmente, o HBV é encontrado no soro numa concentração menor que 10^4 - 10^5 cópias/ml, sendo significativamente inferior que naqueles indivíduos que são HBsAg positivos (Hu 2002, Kao 2002, Chemin & Trepo 2005, Hou et al. 2005, Prati et al. 2006). Sendo assim, o HBV DNA pode ser detectado em pacientes HBsAg negativos com anti-HBs detectável, naqueles que são anti-HBc isolados, assim como na ausência de todos os marcadores sorológicos (Nalpas et al. 1985, Tanaka et al. 1990, Fukuda et al. 1999, Chemin et al. 2001).

Na determinação dos genótipos do HBV, diferentes metodologias são utilizadas como o sequenciamento do genoma completo ou da região pré-S/S, que é considerado o método padrão, porém o seu emprego, principalmente em larga escala, tem sido dificultado pela sua complexidade e também por ser considerado mais dispendioso (Naito et al. 2001, Zeng et al. 2004). Assim, outros métodos têm

sido mais utilizados, como a PCR com *primers* genótipo-específicos (Repp et al. 1993, Kato et al. 2001, Naito et al. 2001), ou PCR com posterior análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (Lindh et al. 1998, Mizokami et al. 1999, De Castro et al. 2000, Araújo et al. 2004, Zeng et al. 2004). Esses são métodos de execução mais simples, entretanto, estão sujeitos a dificuldade de interpretação, em especial, quando há infecção com mais de um genótipo (Kato et al. 2002b). A genotipagem pode ainda ser realizada por hibridização reversa dos produtos da PCR (LiPA-Line Probe Assay), que parece ter melhor sensibilidade na detecção de infecções mistas (Osiowy & Giles 2003), PCR em tempo real (pela análise da curva de anelamento) (Yeh et al. 2004, Liu et al. 2006b, Wang et al. 2007), pela utilização de “chips” com oligonucleotídeos (Vernet & Tran 2005, Song et al. 2006, Wang et al. 2007, Tang et al. 2007) e por ELISA com anticorpos monoclonais (Usuda 1999, Usuda 2000).

1.7 Epidemiologia da Infecção pelo HBV

1.7.1 Transmissão do HBV

As principais formas de transmissão do vírus da hepatite B são as vias parenteral/percutânea, sexual, vertical (mãe-filho) e horizontal (intrafamiliar). O HBV é encontrado em diversos fluidos corpóreos de indivíduos infectados, mas apenas o sangue, sêmen e saliva têm demonstrado ser infecciosos (Alter 2003). A presença do HBsAg já foi verificada na saliva, sêmen, leite materno, urina, secreções pancreáticas, biliares e vaginal, lágrima, líquidos menstrual, pleural e nasofaríngeo (Boxall et al. 1974, Heathcote et al. 1974, Villarejos et al. 1974, Irwin et al. 1975, Hoefs et al. 1980, Davison et al. 1987, Hollinger 1996b, Befeler & Di Bisceglie 2000, Knutsson & Kidd-Ljunggren 2000, Maddrey 2000). Um estudo recente, realizado por Kidd-Ljunggren et al. (2006), mostrou a presença de altos títulos do HBV DNA na saliva e no fluido nasofaríngeo e, de títulos mais baixos, nas lágrimas de indivíduos cronicamente infectados. Ainda não há evidências de detecção do HBV nas fezes, e segundo Grabow et al. (1975), isso provavelmente se deve à inativação da partícula viral na mucosa, ou por ação da microbiota intestinal. Ainda, de acordo com Bond et al. (1981), o HBV permanece estável por mais de sete dias em

superfície de ambientes, podendo levar à disseminação do vírus por contato com objetos inanimados.

A transmissão desse agente pode ocorrer pela exposição perinatal, por relações sexuais, transplante de órgãos e tecidos, bem como através da exposição ao sangue ou derivados e fluidos corpóreos, seja em transfusões sanguíneas, procedimentos médico invasivos, acidentes ocupacionais, pelo compartilhamento de seringas e agulhas pelos usuários de drogas injetáveis e ainda na realização de acupuntura e tatuagem de forma inadequada (Alter 2003).

Em regiões de alta prevalência, a transmissão do HBV acontece principalmente na infância, podendo ocorrer no período perinatal, pela exposição do recém-nascido ao sangue ou líquido amniótico, durante a passagem pelo canal vaginal (Lavanchy 2004). Ainda, pode ocorrer pela via horizontal, pelo contato contínuo com familiares portadores do vírus, nos primeiros anos de vida, principalmente em ambientes densamente habitados, com condições socioeconômicas e de higiene precárias (Krugmam & Giles 1970, Margolis et al. 1991, Zampino et al. 2002, Doganci et al. 2005, Chang et al. 2007). Apesar do modo preciso e da dinâmica da transmissão horizontal do vírus da hepatite B não estarem totalmente esclarecidos, sugere-se que este agente pode ser transmitido por contato direto ou indireto entre os membros de um ambiente domiciliar, envolvendo lesões em mucosas ou no tecido percutâneo (Bernier et al. 1982, Chakravarty et al. 2005). Além disso, fatores como o compartilhamento de objetos de higiene pessoal, copos, talheres, balas e doces, tamanho da família, presença de mais de um portador do HBsAg no ambiente domiciliar, *status* de replicação do portador e origem étnica têm sido considerados importantes nesta forma de disseminação da hepatite B (Szmuness et al. 1975, Kim et al. 1993, Martinson et al. 1998, Zhevachevsky et al. 2000, Doganci et al. 2005).

Os índices de transmissão do HBV de mães infectadas aos neonatos são dependentes do *status* dos marcadores HBsAg e HBeAg nas gestantes. Dessa forma, em mulheres HBsAg +/HBeAg +, a transmissão ocorre em 70-90%. Já em mulheres HBsAg+/HBeAg -, esse índice varia de 5 a 20%. A transmissão vertical pode ocorrer principalmente no último trimestre de gestação em caso de uma

infecção aguda pelo HBV nesse período. Porém, esse percentual é menor, caso a mãe seja portadora crônica, ou se infecte nos primeiros meses da gestação (Hollinger 1996b, Chakravarty et al. 2005, Hou et al. 2005).

Em regiões de baixa prevalência, a infecção pelo HBV ocorre principalmente em indivíduos na fase adulta, muitas vezes influenciada por fatores ambientais e comportamentais, como o uso de drogas injetáveis, relações sexuais com múltiplos parceiros (homossexuais e heterossexuais) e realização de procedimentos invasivos sejam eles para fins terapêuticos ou não (cirurgias, transfusões sanguíneas, uso de *piercing*, tatuagem, acupuntura, dentre outros) (Hollinger 1996b, Regan et al. 2000, Alter 2003).

1.7.2 Prevalência da infecção pelo HBV

A hepatite B é uma das doenças infecciosas mais freqüentes no mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), dois bilhões de pessoas foram infectadas pelo HBV e cerca de 400 milhões encontram-se cronicamente infectadas. A cada ano, cerca de 430.000 casos de câncer hepático são causados por hepatites virais, sendo que quase 60% desses estão associados à infecção pelo HBV. Além disso, estima-se que mais de um milhão de pessoas morrem ao ano, por complicações hepáticas devido à infecção por esse vírus (Maddrey 2000, Kao & Chen 2002, Alter 2003, Lai et al. 2003b, Lavanchy 2004).

A prevalência global da infecção crônica pelo HBV varia bastante nas diferentes regiões geográficas, assim como em diferentes subgrupos populacionais. Considerando-se a prevalência para o HBsAg, observa-se três categorias de endemicidade (alta, intermediária e baixa) (Figura 10). Em áreas de alta endemicidade, a prevalência é superior ou igual a 8%. Índices de 2 a 7% definem as áreas de endemicidade intermediária e, em áreas de baixa endemicidade, a prevalência para o HBsAg é menor que 2% (Lavanchy 2004, WHO 2004).

Dessa forma, regiões como África sub-Sahariana, sudeste asiático, Alasca, Bacia Amazônica, parte da China, do Oriente Médio e Ilhas do Pacífico são consideradas de alta endemicidade. Nesses locais, o risco do indivíduo adquirir a

infecção durante a vida é superior a 60% e ocorrem principalmente no período perinatal ou na infância, apresentando, portanto, maiores chances de evolução para a cronicidade. Estima-se que aproximadamente 3/4 dos pacientes com infecção crônica em todo o mundo vivem nesses locais (André 2000, Lai et al. 2003b).

A endemicidade intermediária é observada no leste e sul europeu, Oriente Médio, parte central da Ásia, Japão, Israel, norte da África, Rússia, Tailândia, Coreia e em parte das Américas do Sul e Central. Nesses locais, a possibilidade de um indivíduo adquirir infecção pelo HBV durante a vida varia de 20 a 60%, podendo ocorrer nas diversas faixas etárias. As vias de transmissão são semelhantes às daquelas das regiões de alta endemicidade, sendo a via perinatal menos frequente (Mahoney 1999, André 2000).

Baixa endemicidade é verificada, principalmente, em áreas desenvolvidas, em que a chance de um indivíduo adquirir infecção pelo HBV durante a vida é menor que 20%. Nestes locais, a transmissão envolve principalmente populações de alto risco (usuários de drogas injetáveis, homossexuais, pacientes em hemodiálise, heterossexuais com múltiplos parceiros sexuais, contactantes de pacientes cronicamente infectados, dentre outros). Encontram-se nesse perfil de endemicidade, regiões como a América do Norte, parte da América do Sul, Europa Ocidental e Austrália (Mast et al. 1999, Margolis et al. 1991, André 2000, Tanaka 2000, Alter 2003).

Em relação a América do Sul, a prevalência para o HBsAg é mais alta na Bacia Amazônica e regiões adjacentes (Colômbia, Peru e Venezuela). A prevalência diminui à medida em que se aumenta a distância desses locais, sendo baixa no Chile, Uruguai, Paraguai e Argentina (Custer et al. 2004). Embora, o Brasil seja considerado como de endemicidade intermediária, é possível observar variação na prevalência para o HBsAg entre as regiões e dentro das mesmas (Souto 1999, Tanaka 2000, Chávez et al. 2003).

Na Região Centro-Oeste, Martelli et al.(1999) verificaram em doadores de sangue um índice de positividade para o marcador anti-HBc de 10,7%. Os estudos realizados em Goiânia-Goiás, em diferentes grupos populacionais, mostraram uma

variação na prevalência global de 5,9% a 63,4% e uma prevalência para o HBsAg variando de 0 a 14,5%. Esses estudos estão listados no Quadro 3. Ferreira et al. (2006b), ao estudarem todos os pacientes em hemodiálise no Estado de Goiás (n=1095), encontraram uma prevalência global de 29,8% para o HBV e de 2,4% para o HBsAg.

Quadro 3 - Estudos sobre a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite B realizados em Goiânia -Goiás.

Referência	População	N	Prevalência	
			HBsAg (%)	Global (%)
Cardoso et al. 1990	Feminina	475	-	6,1
Martelli et al. 1990	Prisioneiros	201	-	26,4
Martelli et al. 1990	Primodoadores	1033	-	12,8
Rosa et al. 1992	Pacientes com hanseníase em tratamento ambulatorial	83	4,8	16,9
Rosa et al. 1992	Pacientes com hanseníase institucionalizados	171	8,8	50,5
Azevedo et al. 1994	Profissionais da área da saúde	625	2,3	23,4

Porto et al. 1994	Meninos de/na rua	496	2	13,5
Cardoso et al. 1996	Gestantes	1459	0,5	7,5
Borges et al. 1997	Pacientes em diálise	175	13,7	63,4
Teles et al. 1998	Pacientes em hemodiálise	282	12	56,7
Bastos 2000	Pacientes com doenças falciformes	63	0	12,7
Lopes et al. 2001	Profissionais de hemodiálise	152	0,7	24,3
Silva et al. 2002	Indivíduos com suspeita clínica de hepatite	1396	14,5	50,7
Teles et al. 2002	Pacientes em hemodiálise		5,8	-
Carneiro & Daher 2003	Anestesiologistas	90	0	8,9
Costa 2004	Idosos residentes em asilos	195	0,5	32,3
Souza et al. 2004b	Portadores de doença mental	433	1,6	22,4
Tavares et al. 2004	Hemofílicos	102	1,1	43,7
Silva et al. 2005b	Profissionais de laboratório	648	0,7	24,1
Ferreira et al. 2006b	Pacientes em hemodiálise		2,4	-
Oliveira et al. 2006	Adolescentes	664	0,6	5,9

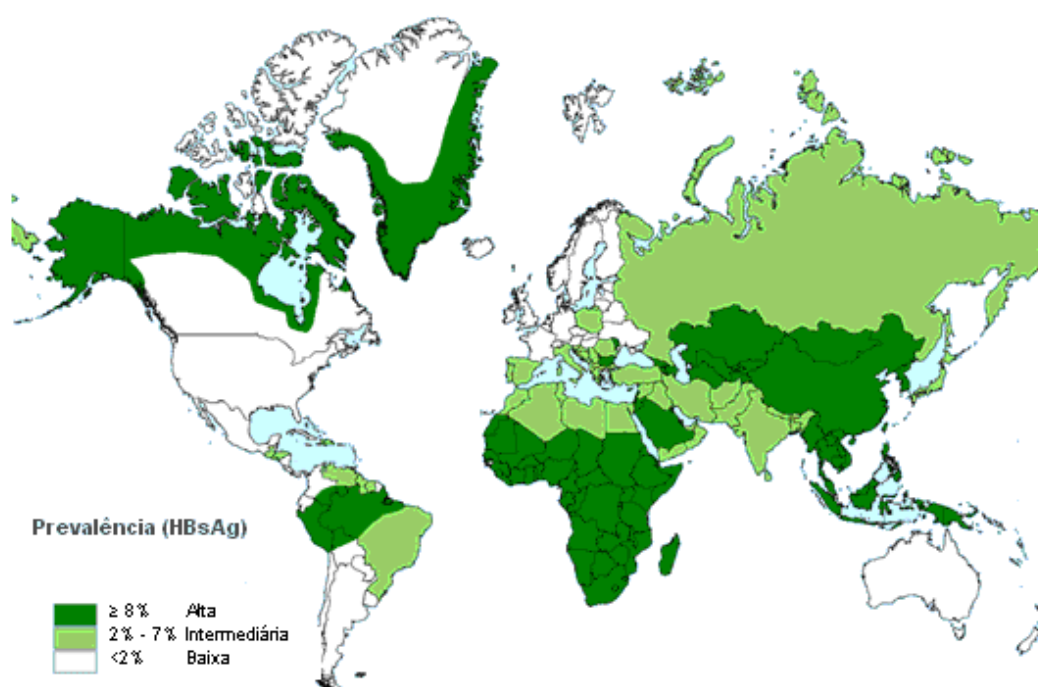


Figura 10 – Distribuição geográfica mundial da hepatite B crônica

Fonte: <http://www.oeaz.at/zeitung/3aktuell/2005/08/bilder/8-oeaz-hepatitis-b-karte.jpg>
(modificado)

Apesar do início dos estudos sobre infecção oculta pelo HBV ser relativamente recente, houve um aumento considerável no número de publicações sobre esse assunto, nos últimos anos. A infecção oculta não está restrita às áreas de alta endemicidade e tem sido verificada em diferentes grupos populacionais. A taxa de prevalência desse tipo de infecção em indivíduos com doença hepática criptogênica varia de 20 a 30% na Europa. Já em portadores da hepatite C, varia de 20% na França a cerca de 80% no Japão (Chemin & Trepo 2005).

Em populações com alto risco para adquirir infecção pelo HBV por via parenteral, índices elevados de 45% em usuários de drogas de Baltimore (Torbensohn et al. 2004) e 51 % em hemofílicos do Japão foram encontrados (Toyoda et al. 2004). Estudos realizados com hemodialisados na Itália, Canadá, Grécia e Turquia encontraram prevalências com variação de 0% a 36,4% (Besisik et al. 2003, Minuk et al. 2004, Fabrizi et al. 2005, Goral et al. 2006, Kanbay et al. 2006, Siagris et al. 2006).

Em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a prevalência da infecção oculta varia de 0 a 89%, conforme estudos realizados no Brasil (5% e 16%)(Gonçales et al. 2003, Santos et al. 2003), França (0,6%, 35% e 37%) (Neau et al. 2005, Piroth et al. 2000, Wagner et al. 2004), Espanha (0%) (Nunez et al. 2002), Itália e México (20%) (Filippini et al. 2006, Torres-Baranda et al. 2006), África do Sul (22%) (Mphahlele et al. 2006), Países Baixos (4%) (Pogany et al. 2005) e Suíça (89%) (Hofer et al. 1998).

Já em doadores de sangue, a prevalência para infecção oculta varia de 0 a 7,7% de acordo com estudos realizados na Alemanha (Henning et al. 2002, Jilg et al. 2001), Estados Unidos (Kleinman et al. 2003) e Venezuela (Gutiérrez et al. 1999). No Brasil, investigações realizadas com esse grupo mostraram prevalência de 2,7% em Recife (Arraes et al. 2003), 3,3% no Rio Grande do Sul (Silva et al. 2005a) e índices variando de 0 a 4% em São Paulo (Almeida Neto et al. 2001 e Gonçales Jr. et al. 2003).

Entretanto, há autores que advertem que a determinação de prevalência da infecção oculta pelo HBV ainda necessita ser realizada com cautela, pois, a mesma pode sofrer influência do método utilizado na investigação. É importante ressaltar que os testes laboratoriais diferem quanto à sensibilidade e especificidade. Além disso, ainda são poucos os estudos que retratam a infecção oculta em indivíduos aparentemente saudáveis, como por exemplo doadores de sangue e população em geral, principalmente em países subdesenvolvidos onde esse tipo de infecção parece ser mais freqüente (Allain 2004, Chemin & Trepo 2005).

1.7.3 Distribuição dos Subtipos e Genótipos

Em relação à distribuição mundial, o subtipo ayw1 é mais encontrado no Vietnã, ayw2 (Mediterrâneo, África central e Grécia), ayw3 (Índia, Antilhas, Américas do Norte e Sul), ayw4 (África Ocidental), ayr (Vietnã), adrq (Polinésia Francesa), adrq+ (Sul e Leste Asiático), adw2 (centro e norte Europeu, leste da África do Sul) e adw4 (Polinésia Francesa, Arquipélago de Marquesa e Argentina) (Courouc -Pauty et al.1983, Norder et al. 2004).

No ano de 1987, Gaspar & Yoshida publicaram um estudo, em que mostrava que os subtipos ayw2, ayw3, ayw4, adw2 e adw4 circulavam no Brasil, com a predominância do adw4 e adw2 na Região Norte, adw2 no Nordeste, ayw3 e ayw2 no Sul, adw2 e ayw3 no Sudeste e adw2 na Região Centro-Oeste. Em 2001, todos esses subtipos foram encontrados em garimpeiros no Estado de Mato Grosso (com exceção do ayw4) (Souto et al. 2001a). Em afro-descendentes de comunidades isoladas de Mato Grosso do Sul, o subtipo adw2 foi predominante, seguido por ayw2 (Motta-Castro et al. 2003).

Em Goiânia-GO, Silva et al. (2002), ao subtiparem amostras de indivíduos com evidência sorológica de hepatite B, encontraram os subtipos adw2 (62,7%), ayw3 (23,5%), ayw2 (9,8%) e adw4 (3,9%). Semelhantemente, Souza et al. (2004b) verificaram uma maior freqüência do subtipo adw2 (60%), seguido por adw4 (20%) e ayw3 (20%) em portadores de problemas mentais. No entanto, esse último subtipo foi dominante em hemodialisados (58,3%), seguido por adw2 (38,9%) e adw4 (2,8%) (Teles et al. 2002).

O genótipo A é freqüentemente encontrado nos Estados Unidos, na parte central da África, África do Sul, Índia, noroeste da Europa, Hong Kong e Filipinas. O genótipo B é prevalente no Japão, Taiwan, Indonésia, Vietnã e China. O genótipo C tem distribuição geográfica semelhante a do genótipo B, sendo também encontrado nas Ilhas do Pacífico. Apesar de apresentar uma distribuição mundial, o genótipo D tem maior prevalência na região do Mediterrâneo, Índia e Estados Unidos. Já o genótipo E, parece ser restrito à África Ocidental. O genótipo F é prevalente nas Américas Central e do Sul e Polinésia. O genótipo G circula nos Estados Unidos e Europa. Finalmente, o genótipo H é mais encontrado nas Américas do Sul e Central (Magnius & Norder 1995, Bowyer et al. 1997, Stuyver et al. 2000, Arauz-Ruiz et al. 2002, Kao 2002, Echavarria et al. 2005, Günther 2006).

Estudos realizados no Brasil, em diferentes grupos populacionais, mostraram a circulação dos genótipos A, B, C, D e F. Entretanto, há predominância dos genótipos A, D e F, enquanto os genótipos B e C foram observados em uma baixa freqüência na cidade de São Paulo e no Estado do Paraná (Moraes et al. 1996, De Casto et al. 2001, Bertolini 2002, Teles et al. 2002, Araújo et al. 2004, Conde et al. 2004, Carrilho et al. 2004, Sitnik et al. 2004, Oliveira 2005, Motta-Castro et al. 2005, Ferreira et al. 2006b).

1.8 Prevenção e Controle da Hepatite B

Algumas medidas foram estabelecidas para prevenção e controle da transmissão do HBV. Elas incluem, vacinação, profilaxia pós-exposição ou durante o parto, triagem do HBsAg em gestantes, dentre outras (Brasil 1989, Brasil 1993, Kupek 2001). Além disso, os bancos de sangue realizam a triagem sorológica dos doadores para o marcador HBsAg em todo o mundo. Adicionalmente em alguns países, é realizada a triagem para o marcador anti-HBc, o que tem contribuído para a redução da hepatite B pós-transfusional, entretanto o risco de transmissão permanece em portadores assintomáticos HBsAg negativos (Regan 2000, Hou et al. 2005, Brasil 1989, 1993). Mais recentemente, está ocorrendo a inserção gradativa de técnicas moleculares na triagem desses doadores em países desenvolvidos (Gessoni et al. 2005, Weber 2005, Fang 2006, Liu et al. 2006a).

A primeira vacina contra o HBV foi licenciada em 1981 e era derivada de plasma humano de portadores crônicos do HBV (Heptavax-B). No entanto, a possibilidade de ocorrer transmissão de outros patógenos veiculados pelo plasma, bem como o avanço da engenharia genética, levaram ao desenvolvimento de vacinas recombinantes de segunda geração, mais seguras, compostas de HBsAg (Engerix-B, Recombivax e outras). Ambas apresentam uma boa imunogenicidade, sendo que 90% dos indivíduos imunocompetentes vacinados desenvolvem imunidade adequada (títulos ≥ 10 mUI/mL). Todas as vacinas recombinantes licenciadas contém hidróxido de alumínio como adjuvante (Assad & Francis 2000, Kao & Chen 2002, Shouval 2003).

A inclusão de vacina contra hepatite B em diversos países ocorreu a partir de 1991, seguindo a recomendação da OMS. Essa intervenção protege os indivíduos em mais de 95% do desenvolvimento da infecção crônica e, conseqüentemente, de cirrose e hepatocarcinoma associados a esse vírus (Lavanchy 2004, WHO 2004). A imunização efetiva de crianças contra o HBV tem demonstrado ser uma ferramenta eficiente para a redução das taxas de prevalência e incidência dessa infecção em diversos locais, como Estados Unidos, Itália, Holanda e África do Sul (Lin et al. 2003, Tsebe et al. 2001, CDC 2004, Da Villa et al. 2007, Van Houdt et al. 2007). Além disso, em Taiwan e Alaska, países considerados previamente como hiperendêmicos, sucesso na adoção dessa medida foi verificado (Harpaz et al. 2000, Ni et al. 2001). Em Taiwan, por exemplo, oito anos após o início da imunização universal, houve redução de cinco vezes no percentual de crianças HBsAg positivas (Wong & Tsang 1994), ocorrendo, ainda, diminuição significativa nos índices de mortalidade por hepatocarcinoma em crianças naquele país, entre 1984 (época do início da vacinação) e 1993 (Lee & Ko 1997). Todos esses estudos, não só ilustram o impacto dessa importante medida de prevenção, como também encorajam todos os países a adotar e manter a imunização na lista das prioridades no que se refere a Saúde Pública.

O Brasil seguiu essa recomendação, implantando, inicialmente, a imunização em áreas de endemicidade elevada (Amazônia Legal, Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo). Posteriormente, a vacina foi oferecida a grupos que apresentavam alto risco de exposição ao HBV, como hemodialisados, profissionais de saúde,

profissionais do sexo, homossexuais, dentre outros. Na década de 90, foi adicionada ao calendário nacional de imunização, a vacina para crianças menores de um ano e, no ano de 2001, a vacina passou a ser oferecida para indivíduos até os 20 anos de idade (Brasil 2003, 2005).

O esquema vacinal recomendado é de três doses, sendo 0, 1 e 6 meses, ou seja, com intervalos de um mês entre as duas primeiras doses e de cinco meses entre a 2ª e 3ª dose. A portaria do Ministério da Saúde (MS nº.597 08/04/2004) estabelece que essa vacina seja administrada no músculo vasto lateral da coxa direita em crianças menores de dois anos e, a partir dessa idade, no músculo deltóide (Brasil 2004). Cerca de 10% dos indivíduos vacinados não desenvolvem títulos de anti-HBs suficientes para conferir proteção ao HBV. Fatores como estocagem inadequada da vacina, predisposição genética, sexo masculino, tabagismo, idade acima de 40 anos, obesidade, imunodeficiência, desnutrição, bem como o local de administração da vacina, podem ser associados à ausência de resposta vacinal (Assad & Francis 2000, Kao & chen 2002, Shouval 2003).

No Brasil, uma vacina recombinante é produzida no Instituto Butantan (São Paulo), denominada Butang®. Sua imunogenicidade têm sido maior quando administrada em indivíduos com idade inferior a 30 anos (Martins et al. 2004). Um estudo realizado com crianças recém-nascidas em Campo Mourão-Paraná mostrou que essa vacina é altamente imunogênica, desenvolvendo resposta protetora em todas as crianças, inclusive as prematuras, vacinadas com três doses de 10 µg (0, 1 e 6 meses) (Isolani et al. 2006). A boa imunogenicidade da vacina também foi comprovada em adolescentes de Goiânia-Goiás, vacinados com três doses de 20 µg (0, 1 e 6 meses) (Oliveira et al. 2006).

A imunoglobulina hiperimune específica (HBIG) confere proteção passiva, sendo empregada em casos de exposição ao HBV, seja em situações de acidente com material contaminado, abuso sexual, contato sexual com parceiro portador ou ainda em neonatos quando a mãe é HBsAg reagentes (Perrillo et al. 1984, Brasil 2005).

Esforços para efetivar a prevenção e controle da transmissão do HBV em ambientes hospitalares têm sido observados em programas de educação continuada, que estimulam a adesão às medidas de biossegurança. Esses programas reforçam o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), prevenção de injúrias com materiais perfuro-cortantes contaminados, uso de técnicas adequadas para esterilização/desinfecção de materiais, preparo de medicações em área exclusiva e em doses individuais. Além desses cuidados, no ambiente hemodialítico, tem sido realizado o isolamento de pacientes HBsAg reagentes em máquinas e salas exclusivas. O conjunto dessas medidas contribuiu substancialmente para a redução da incidência da hepatite B nos locais em que foram implementadas (Brasil 1996, 2005, Mast et al. 1999).

1.9 Os afro-descendentes no Brasil e a comunidade Kalunga

Os africanos chegaram ao Brasil em meados do século XVI, trazidos como forma de mão-de-obra escrava para trabalhar em plantações de cana de açúcar e, mais adiante, nas minas de ouro, diamantes e plantações de café. Estima-se que cerca de 3,5 milhões de africanos vieram para o Brasil entre o período de 1551 e 1850 (Alves-Silva 2000).

Por muito tempo, os escravos foram forçados a viver de forma desumana. Assim, revoltados contra essas condições, se articularam, tentando buscar o direito de serem livres e montaram esconderijos nos locais mais afastados, de difícil acesso, longe dos possíveis ataques. Tais locais foram considerados unidades de resistência e foram chamados de “quilombos” (Silva 2003). O movimento de formação dos quilombos, registra-se como um longo fato histórico que se iniciou em 1630, só terminando em 1888, após a abolição da escravatura (Baiocchi 1999). Atualmente, mais de 1000 comunidades são reconhecidas como remanescentes de quilombos no Brasil, segundo registros da Fundação Palmares, e são considerados locais onde vivem afro-descendentes que preservam a história e tradição do seu povo.

Em 2003, Silva detectou aproximadamente 100 comunidades negras no Brasil Central e considerou que 50 delas eram remanescentes de quilombos. Entretanto, a que mais se destaca, por ser considerada a maior comunidade isolada de afro-descendentes do Brasil, é a comunidade Kalunga, situada no Estado de Goiás. Acredita-se que esses indivíduos têm procedência, em sua maioria, do Congo, Angola e Moçambique (Figura 11) (Baiocchi 1999).

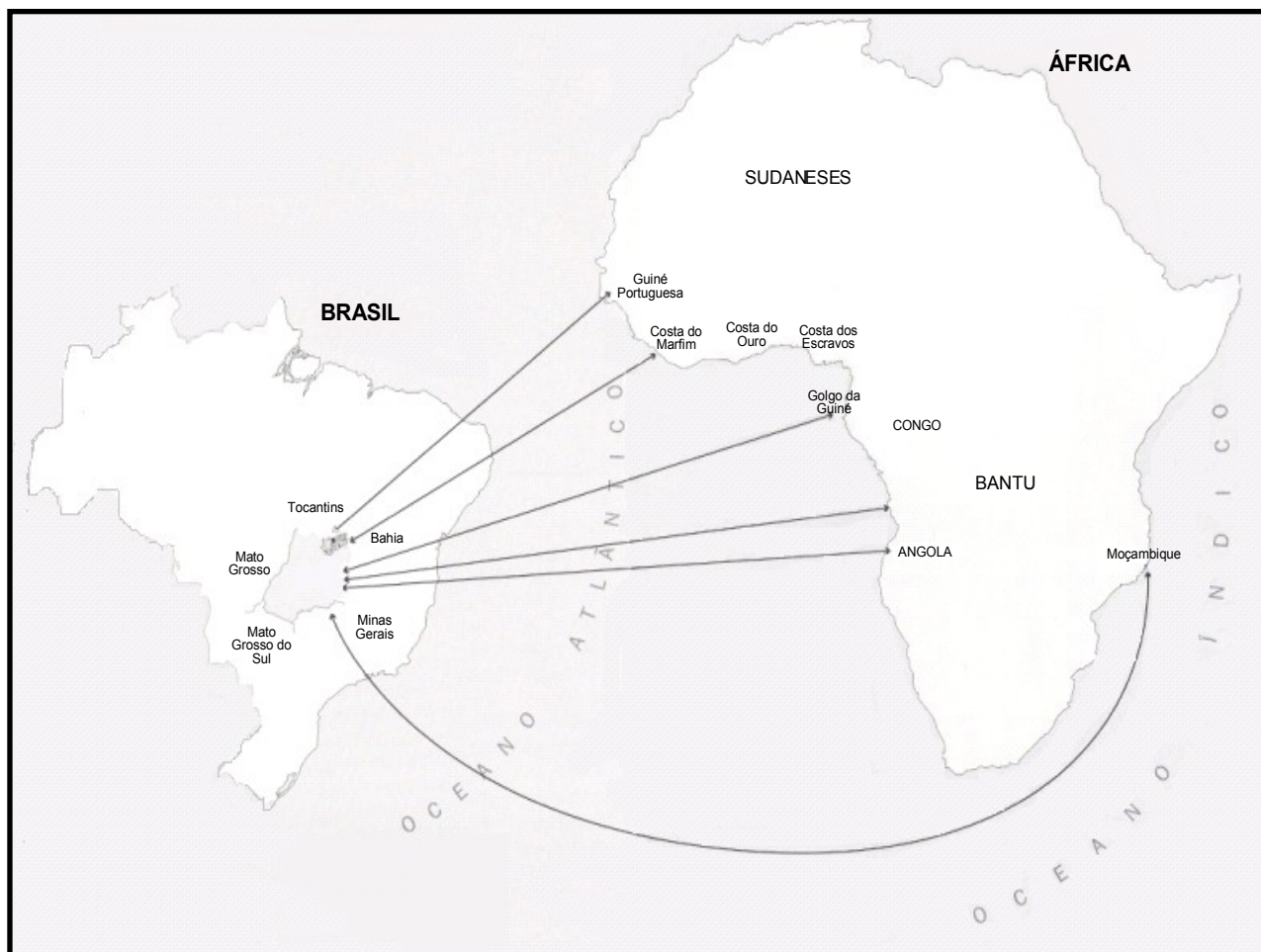


Figura 11 - Rota dos escravos ao Brasil – Origem comunidade Kalunga (Baiocchi, 1999)

A comunidade Kalunga foi formada através dos processos migratórios, vindos das minas de Goyaz e das minas de Tocantins no século XVIII, em que os afro-descendentes agruparam-se nas terras localizadas nos municípios de Cavalcante, Monte Alegre e Teresina de Goiás, às margens do Rio Paranã, entre as serras do Vão de Almas, Vão do Moleque, Contenda e Ribeirão dos Bois. Os Kalungas só foram descobertos em 1982, por ocasião de estudos antropológicos, apoiados pela Universidade Federal de Goiás (Baiocchi 1984). Em 1991, a região habitada por esse povo foi reconhecida como sítio histórico e patrimônio cultural, totalizando uma área de 237.000 hectares. Assim, os Kalungas permanecem praticamente isolados cultural e geograficamente, até os dias de hoje.

Estima-se que a população total seja constituída por aproximadamente 3.000 indivíduos. Os solos da região são variáveis, aptos para a agricultura principalmente, às margens do Rio Paranã, seus afluentes e vãos de serras. A área agricultável corresponde a 30% dos 237.000 hectares, sendo a vegetação predominantemente do cerrado (Baiocchi 1999).

A preservação dos Kalungas, como comunidade isolada, até os dias de hoje, deve-se a vários fatores, dentre eles o difícil acesso à região e sua capacidade de resistência, como a prática da agricultura de subsistência, praticada sem auxílio de máquinas e com a participação de toda a família (mulheres, homens e crianças). Os alimentos mais comuns no plantio são o arroz, mandioca, feijão e milho. A mandioca parece ter um importante valor naquele local, pois serve tanto para o consumo como também para o comércio, sendo a farinha usada para adquirir sal, tecidos, café, querosene, panelas e outros produtos em comércios locais e regionais (Baiocchi 1999, Ministério da Educação 2001).

Além disso, a estrutura alimentar é incrementada com a caça, pesca, criação de gado e porcos, bem como o plantio de alimentos nas proximidades das casas, como hortas (manjerição, coentro, e pimentas) e frutas (banana, mamão, melancia, abacaxi, dentre outras) (Baiocchi 1986, 1999, Silva, 2003).

No geral, o modo de vida dos Kalungas é bastante simples. As casas têm poucos cômodos (sala, cozinha e quartos), sendo feitas de adobe e, na preparação do telhado, são utilizadas palhas e madeira da própria região. O chão é feito de terra batida, os móveis se resumem a bancos, camas, armários de cozinha e o cozimento de alimentos é realizado no fogão a lenha. Os banhos, assim como a lavagem dos utensílios domésticos, como panelas e pratos, se dão nos rios. Não há banheiros nas casas, energia elétrica, água encanada e nem rede de esgotos. A taxa de natalidade é considerada alta, caracterizando a população com uma grande concentração de crianças. O índice de analfabetismo é elevado e, apesar de já existirem escolas construídas com o apoio do Governo Federal, ainda são encontradas escolas de palha, com recursos didáticos escassos e situadas em locais onde as crianças muitas vezes têm que caminhar por muito tempo sob o sol para estudar (Baiocchi 1999, Ministério da Educação 2001, Silva 2003).

No entanto, apesar de todas as aparentes dificuldades, os Kalungas são considerados um povo festivo e religioso. Ao longo do ano, várias festas são realizadas e todas elas fazem alusões comemorativas a santos ou elementos católico-romanos ou africanos. Essas festas são eventos sociais, em que comparecem grupos de todas as idades. Para algumas festas, inclusive, há o deslocamento da família inteira, que viajam por muitas horas ou até dias, a pé ou montados a cavalos, até chegarem aos locais das festividades, onde existem espécies de ranchos construídos com a finalidade de abrigar as famílias, bem como cozinhas, locais para danças e capelas para os rituais.



Figura 12 - Povo Kalunga
<http://photos1.blogger.com/x/blogger/4879/4291/1600/829055/32.jpg>



Figura 13 - Casa Kalunga feita de adobe e palha
<http://www.ecoviagem.com.br/ecoviagem-brasil/aventura/giro-pela-america/os-kalungas.asp>



Figura 14 - Cozinha Kalunga, com fogão a lenha



Figura 15 - Escola Kalunga feita com adobe e palha
<http://www.unb.br/acs/bcopauta/arquitetura5.htm>



Figura 16 - Mulheres Kalunga trabalhando em artesanato
http://www.brasilouest.com.br/fotosmat/kalunga_01.jpg



Figura 17 - Kalungas no preparo da farinha de mandioca
<http://www.labcom.ubi.pt/agoranet/04/cantia-aline-boloni-leonardo-quilombo-kalunga.pdf>



Figura 18 - Sanfoneiro em festa Kalunga
<http://photos1.blogger.com/x/blogger/4879/4291/1600/466839/Sanfoneiro.jpg>



Figura 19 - Crianças da comunidade Kalunga
www.fotografos.com.br/users/marciocabral/normal_134927_photo.jpg

1.10 Justificativa

Apesar de terem se passado mais de três décadas da identificação do agente etiológico da hepatite B e de todos os estudos subsequentes contribuírem para o conhecimento desta infecção, inclusive viabilizando vacinação específica, a hepatite viral do tipo B persiste como um problema de saúde pública mundial, sendo ainda associada a muitos casos de cirrose, hepatocarcinoma e a alta mortalidade (Maddrey 2000, Kao & Chen 2002, Alter 2003, Lai et al. 2003b, Lavanchy 2004).

Estudos epidemiológicos sobre a infecção pelo HBV têm mostrado uma ampla variação nos níveis de endemicidade em todo o mundo, sendo a África considerada uma região de alta endemicidade, que possui um grande número de portadores crônicos da hepatite B e um elevado risco para óbitos como consequências desta infecção (Miller et al. 1998, André 2000, Mulders et al. 2004).

A população brasileira é altamente miscigenada, caracterizada principalmente pela mistura entre três grupos étnicos: ameríndios, europeus (portugueses) e africanos. Estima-se que, do total de imigrantes que chegaram ao Brasil (1500-1972), 40% eram da África (Alves-Silva et al. 2000, Oliveira et al. 2002). Atualmente em nosso País, 1000 comunidades estão oficialmente identificadas como remanescentes de quilombos e poucos são os estudos sobre a infecção pelo HBV nesta população (Motta-Castro et al. 2003, Motta-Castro et al. 2005).

A investigação epidemiológica e molecular da infecção pela hepatite B tem se estendido a diversos grupos populacionais na Região Centro-Oeste. No entanto, ainda são inexistentes, no Estado de Goiás, estudos de prevalência abrangendo populações rurais, principalmente aquelas que apresentam diferenças em sua composição, bem como características culturais e raciais específicas. Levando em consideração esses aspectos, este foi o primeiro estudo realizado com a proposta de traçar o perfil epidemiológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite B em afro-descendentes que vivem em comunidade isolada em nosso Estado. Acredita-se que estas informações sejam valiosas para elaboração ou re-estruturação de estratégias específicas de prevenção e controle da hepatite B na população estudada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ♦ Estudar o perfil epidemiológico e molecular da infecção pelo vírus da hepatite B na população isolada de afro-descendentes no Estado de Goiás (Kalungas), visando proporcionar informações para subsidiar medidas de controle e prevenção da hepatite B na comunidade estudada.

2.2 Objetivos específicos

- ♦ Estimar a prevalência da infecção pelo HBV na comunidade Kalunga em Goiás;
- ♦ Analisar os principais fatores de risco associados a esta infecção;

- ◆ Detectar o DNA viral e os marcadores HBeAg e anti-HBe nas amostras HBsAg reagentes;
- ◆ Verificar o índice de infecção oculta pelo HBV na população estudada;
- ◆ Caracterizar os isolados do HBV, identificando os genótipos e subgenótipos virais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População estudada

Este é um estudo observacional, analítico, de corte transversal, que foi realizado em afro-descendentes de comunidade isolada no Estado de Goiás (Kalungas). Esta população reside em uma área de aproximadamente 237 mil hectares, nos municípios de Cavalcante, Teresina de Goiás e Monte Alegre. Os Kalungas vivem isolados nos vãos entre serras às margens de rios, formando os núcleos de Vão de Almas, Vão do Muleque e Engenho. Atualmente a população total é constituída de aproximadamente 3.000 habitantes.

Para obter a prevalência estimada da infecção pelo HBV em torno de 30%, com uma precisão de 5%, seria necessário estudar o mínimo de 691 indivíduos, considerando um poder estatístico de 80% ($\beta=20\%$) e um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$). Desta forma, esta investigação contou com a participação de 878 afro-descendentes.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Goiás.

3.2 Entrevista e coleta de sangue

Em maio de 2004, foi realizada uma visita à comunidade Kalunga, afim de conhecer a realidade do local e a população a ser estudada. Na oportunidade, realizou-se a divulgação do estudo e agendamento das entrevistas, bem como das coletas de sangue, para o mês de julho de 2004, em escolas e centros comunitários.

Após informação prévia sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, os indivíduos consentiram em participar da investigação por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ou da coleta de impressão digital dos indivíduos analfabetos. Para indivíduos menores de idade, o referido termo foi autorizado pelos pais ou responsáveis. Em seguida, os mesmos foram submetidos à entrevista utilizando-se um questionário padrão (em anexo), que abordava questões sobre características sócio-demográficas, fatores de risco relacionados à infecção pelo HBV, antecedentes sobre hepatite/icterícia e vacinação contra hepatite B.

A amostra de sangue de cada participante (10 mL) foi obtida por punção da veia cubital e foram centrifugadas a 3000 rpm, em temperatura ambiente, durante 10 minutos. O sobrenadante (soro) foi separado em duas alíquotas, identificadas com o número do registro de cada participante. Os soros foram estocados em *freezer* a -20°C (no Hospital Municipal de Cavalcante) e transportados para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), onde foram armazenados nas mesmas condições, até a realização dos testes sorológicos e moleculares.

3.3 Testes sorológicos

Os testes sorológicos foram realizados através do ensaio imunoenzimático (ELISA), empregando-se kits comerciais. Inicialmente, todas as amostras foram testadas para a detecção dos marcadores HBsAg, anti-HBc e anti-HBs. Em seguida,

as amostras que foram reagentes ao HBsAg foram testadas para detecção do HBeAg e anti-HBe.

3.3.1 Detecção do HBsAg

Para a detecção do marcador HBsAg foram empregados reagentes comerciais (Hepanostika HBsAg Uni-Form II, Biomérieux-Holanda). Este teste consiste em um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado no princípio de *sandwich* em uma única etapa. Em uma microplaca sensibilizada com anticorpos anti-HBs monoclonais e contendo uma esfera de conjugado (anti-HBs marcado com peroxidase), foram adicionados as amostras e controles em suas respectivas câmaras. Após este procedimento, a placa foi incubada e, posteriormente, lavada com tampão fostato. Em seguida, o substrato/cromógeno (tetrametilbenzidina/peróxido de uréia) foi adicionado. Após nova incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 1N.

Após o término da reação, a leitura espectrofotométrica foi realizada em filtro simples (450 nm), onde foram consideradas positivas as amostras que apresentaram absorbâncias maiores ou iguais ao valor do *cut-off*, obtido através da soma ($CN_x + 0,050$), onde CN_x é a média das absorbâncias dos controles negativos.

3.3.2 Detecção do anti-HBc total

A detecção do marcador anti-HBc Total foi realizada com reagentes comerciais (Hepanostika anti-HBc Uni-Form, Biomérieux-Holanda). O princípio da reação era baseado em inibição competitiva. Cada câmara da placa era revestida com antígeno *core* do vírus da hepatite B (HBcAg). O conjugado era constituído de anticorpos anti-HBc humano interligado à enzima peroxidase.

As amostras em teste e os controles foram incubados juntamente com o conjugado durante 90 minutos a 37°C e, em seguida, a placa foi lavada com o tampão fosfato. Posteriormente, foi adicionada a solução substrato/cromógeno (tetrametilbenzidina/peróxido de uréia) e incubou-se por 30 minutos. Finalmente, a

reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 1N e a leitura espectrofotométrica realizada em leitora de microplaca com uso de filtro simples (450 nm).

O valor do *cut-off* foi obtido pela fórmula: $0,25 (CNx + 3CPx)$ onde “CNx” é igual ao valor médio das absorbâncias dos controles negativos e “CPx” ao dos controles positivos. Assim, foram consideradas amostras positivas, aquelas que apresentaram absorbância menor ou igual ao valor do *cut-off*.

3.3.3 Detecção de anti-HBs

A detecção de anticorpos anti-HBs foi realizada através do método imunoenzimático direto (tipo *sandwich*) em microplacas sensibilizadas com HBsAg (ad e ay). As amostras e controles foram adicionados às suas respectivas câmaras. A placa foi incubada e, em seguida, lavada. Após a adição do conjugado (HBsAg marcado com peroxidase), a placa foi incubada novamente. Realizada a lavagem, a mistura substrato/cromógeno foi adicionada, sendo a placa novamente incubada. Então, a reação foi bloqueada pela ação de ácido sulfúrico, e a leitura realizada em filtro duplo (450 nm e 620nm).

O *cut-off* foi definido por $(CNx + 0,040)$, onde “CNx” é igual a média das absorbâncias dos controles negativos. Os resultados foram obtidos através da razão entre a absorbância da amostra e o valor do *cut-off*. As amostras com relação $\text{absorbância}/\text{cut-off} \geq 1,0$ foram consideradas positivas; com relação $\text{absorbância}/\text{cut-off} \leq 0,9$ foram negativas e, quando esta razão foi igual a 0,9 as mesmas foram indeterminadas.

3.3.4 Detecção do HBeAg e anti-HBe

O teste ELISA Hepanostika HBeAg é baseado no princípio *sandwich* e, para a detecção do anti-HBe, numa modificação da inibição do *sandwich*.

No ensaio para HBeAg, adicionou-se as amostras e controles na microplaca sensibilizada com anticorpos anti-HBe humano. Em seguida, realizou-se a incubação e a lavagem. O conjugado (anti-HBe humano ligado à peroxidase) foi

acrescentado. Após a segunda incubação e a lavagem, a reação foi revelada pela adição do substrato/cromógeno (peróxido de uréia e TMB). A reação foi interrompida, sendo considerada positiva a leitura espectrofotométrica (filtro 450 nm) que mostrou absorbância maior ou igual ao *cut-off*, definido de acordo com as instruções do fabricante como a soma das médias das absorbâncias dos controles negativo e positivo x 0,5.

Para detecção do anti-HBe, em microplaca sensibilizada com anti-HBe, foram adicionadas as amostras e controles, juntamente com uma solução contendo HBeAg. Após a incubação, os procedimentos foram os mesmos utilizados para detecção do HBeAg, porém foram consideradas positivas as amostras que apresentaram absorbância menor que a do *cut-off*, obtido conforme a descrição acima.

3.4 Detecção e genotipagem do HBV DNA

3.4.1 Extração do HBV DNA

As amostras HBsAg reagentes (n=16), bem como amostras positivas para o anti-HBc (n=295) foram submetidas à extração do ácido nucléico viral, realizada em duas etapas, conforme Niel et al. (1994). Resumidamente, a primeira consistiu na adição de 250 µL do soro em 80 µL de solução de lise, sendo esta composta por solução A (Tris 200 mM, SDS 1%, NaCl 700 mM, EDTA 20 mM, tRNA 0,1 mg/mL) e solução B (proteínase K 2mg/mL dissolvida em solução de CaCl₂ 0,36 mM; o pH final foi ajustado para 9,0 utilizando o HCL). Os soros, juntamente com a solução de lise, foram incubados a 37° C por 4 horas. O DNA viral foi extraído pelo uso de fenol/clorofórmio, centrifugado, e a fase superior transferida para tubos contendo etanol. Estes foram mantidos a -20°C durante a noite. A segunda etapa da reação, caracterizou-se pela centrifugação do material e a formação de um precipitado, que em seguida foi lavado com etanol a 70%, seco e ressuspenso em 30 µL de água (milliQ autoclavada).

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a extração do DNA, realizou-se uma *semi-nested* PCR, para amplificação e detecção do DNA viral relativo a região pré-S/S, que foi realizada em duas etapas, de acordo com Motta-Castro et al. (2005).

Para a PCR-1 (1ª etapa), utilizou-se uma mistura contendo 1 pmol de cada *primer*: PS1 e S2/S22 (Invitrogen) (Quadro 4), responsáveis pela amplificação do fragmento de DNA do nucleotídeo 2826 ao 841 do genoma; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1U de Taq DNA polimerase, num volume final de 50 µL. Dois microlitros do HBV DNA extraído de cada amostra obtido na fase anterior, além dos controles negativos (água) e controle positivo (amostra HBV DNA positiva) foram misturados aos componentes descritos acima, e em seguida esta mistura levada ao termociclador com o seguinte programa: 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial), 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 40 segundos e 72°C por 2 minutos (desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente) e 72°C por 7 minutos (alongamento final).

A segunda etapa (PCR-2) foi realizada empregando-se os *primers* PS1 e SR (Invitrogen) (Quadro 4), além dos mesmos componentes mencionados acima. O produto final da PCR-1 (2 µL) foi adicionado à nova mistura da reação e levado ao termociclador, com o seguinte programa: 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial), 30 ciclos de 94° C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 1 minuto (desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente) e 72°C por 7 minutos (alongamento final). O produto final da PCR-2 era composto de 1099 pares de base (pb).

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Ao gel de agarose preparado a 1% em tampão TBE (Tris-Borato EDTA), foi acrescentado brometo de etídeo em uma concentração final de 0,5 µg/mL. Os produtos da PCR-2 foram misturados a 5 µL do corante Azul de bromofenol, aplicados ao gel e submetidos à eletroforese. As bandas formadas foram visualizadas através de luz ultravioleta com auxílio de um transluminador, e comparadas ao controle positivo.

Para evitar contaminação, vários cuidados foram tomados, como a preparação dos reagentes pré-PCR, amplificação do DNA e a eletroforese em gel dos produtos de PCR em ambientes separados.

3.4.4 Genotipagem por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism -Análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição)

O fragmento de DNA amplificado foi analisado pelo método de RFLP, utilizando-se três enzimas de restrição ou endonucleases. As enzimas, *EcoRI*, *BamHI* e *StuI* (New England BioLabs), foram diluídos segundo as recomendações do fabricante, tendo como componentes água milliQ (8 µL), tampão específico para cada enzima (2 µL) e enzima (10U).

Dez microlitros do produto obtido após a PCR-2 com igual volume de cada enzima foram incubados a 37°C durante quatro horas. Após este período, as amostras contendo DNA digerido foram misturadas a 5µL de Azul de bromofenol, aplicadas em gel de agarose a 3% e submetidas à eletroforese. Utilizou-se, também, o marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder- Invitrogen) (1 µL/mL do marcador, 10 µL de TBE e 5 µL de Azul de bromofenol). As bandas formadas foram visualizadas através de luz ultravioleta com o auxílio de um transluminador e comparadas às bandas do marcador de peso molecular.

O método de RFLP permite, através da interpretação dos padrões eletroforéticos, a distinção entre os genótipos A, D e F, conforme descrito por Araújo et al. (2004).

3.5 Sequenciamento da região Pré-S/S

3.5.1 Amplificação das amostras para a região Pré-S/S

As amostras HBsAg e HBV DNA positivas, genotipadas pela técnica de RFLP, foram também submetidas à *semi-nested* PCR para amplificação da região Pré-S/S. Na primeira PCR, foram utilizados os *primers* externos P01 e S2/S22 (Quadro 4). A segunda PCR foi realizada com os *primers* PS1 e S2/S22. O processo para amplificação, nas duas etapas, incluíram os seguintes passos: desnaturação inicial das amostras a 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, a 52°C por 40 segundos e a 72°C durante 2 minutos. Finalizando, com alongamento a 72°C por 7 minutos.

3.5.2 Purificação do DNA

O volume total (100 µL) do produto amplificado para região Pré-S/S foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo. Em seguida, as bandas foram extraídas do gel e colocadas em tubos “eppendorfs” (1,5 mL) para serem eluídas e purificadas utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA).

Para cada 10 mg de fragmento do gel, adicionou-se 10 µL de solução de ligação à membrana. A mistura foi homogeneizada em vórtex e incubou-se a 50°C por aproximadamente 10 minutos até a completa dissolução do gel. A seguir, o material foi transferido para uma coluna que foi adaptada a um tubo de coleta, sendo incubado a temperatura ambiente por um minuto e centrifugou-se a 14000 rpm durante um minuto. O resíduo do tubo de coleta foi desprezado. Posteriormente, adicionou-se 700 µL de solução de lavagem previamente diluída com etanol a 95% e centrifugou-se a 14000 rpm por um minuto, sendo o produto do tubo de coleta novamente desprezado. Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução de lavagem e centrifugou-se a 14000 rpm por cinco minutos. Para finalizar, a coluna foi adaptada a um novo tubo “eppendorf” (1,5mL) e adicionou-se 50 µL de água livre de nucleases à coluna, deixando incubar a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugando a

14000 rpm por mais um minuto. A coluna foi desprezada e o DNA coletado no tubo “eppendorf” foi armazenado a -20°C.

Na etapa seguinte, foi realizada a quantificação do DNA purificado. O produto foi aplicado em gel de agarose a 2%, num volume de 4 µL de cada amostra. Também aplicou-se 4 µL do marcador de massa e peso molecular “low DNA mass ladder” para comparar a intensidade das bandas e calcular a concentração, determinando, assim, o volume de DNA utilizado na técnica de sequenciamento.

3.5.3 Sequenciamento e análise da região Pré-S/S

As seqüências nucleotídicas das amostras amplificadas para região Pré-S/S foram determinadas utilizando o Kit BigDye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com *primers* específicos (PS1, S4, PS2 e S2). Quando necessário, os *primers*: PS4 e S7 foram utilizados (Quadro 4).

Para cada reação de sequenciamento, empregou-se 5 µL do DNA na concentração de 40 a 60 ng/µL, adicionados a 1,5 µL de água e 1 µL dos *primers* específicos para a região Pré-S/S. As reações para sequenciamento foram realizadas em um seqüenciador automático ABI 373 (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise das seqüências foi realizada utilizando um programa desenvolvido pelo Grupo de Genética da Universidade de Wisconsin. Para análise filogenética, foi construída uma árvore pelo método “Neighbor-joining” usando o programa Mega versão 3.0 (Kumar et al. 2004).

Os genótipos das amostras do HBV deste estudo foram determinadas acrescentando-se, na análise filogenética, seqüências de referência dos oito genótipos conhecidos (A-H), bem como dos subgenótipos do vírus, disponíveis no

GenBank (designadas na árvore filogenética pelo número de acesso e o local de origem - Figura 23).

Quadro 4-*Primers* utilizados na amplificação da região Pré-S/S e sequenciamento

Primers	Sentido	Seqüência (5' ► 3')
P01	sense	GGACTCATAAGGTGGGGAA
PS1	sense	CCATATTCTTGGAACAAGA
PS2	anti-sense	GGTCCCCAGTCCTCGAGAAG
PS4	sense	ACACTCATCCTCAGGCCATGCAGTG
S2	anti-sense	GGGTTTAAATGTATACCCAAAGA
S4	sense	TGCTGCTATGCCTCATCTTCT
S7	anti-sense	TGAGCCAGGAGAAACGGGCT
S22	anti-sense	GTATTTAAATGGATACCCAAAGA
SR	anti-sense	CGAACCACTGAACAAATGGC

3.6 Processamento e análise dos dados

Os dados obtidos nas entrevistas, bem como os resultados dos testes sorológicos e moleculares, foram analisados no programa Epi-Info versão 6.04 (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta. GA). Prevalência e estimativa de risco foram calculadas com intervalo de confiança de 95%. Os testes Qui-quadrado, Qui-quadrado para tendência e exato de Fisher foram utilizados quando apropriados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Após o cálculo da estimativa de risco dos fatores associados à exposição ao HBV (positividade ao marcador anti-HBc) pela análise univariada, realizou-se a análise multivariada, por regressão logística múltipla, através do pacote estatístico SPSS, versão 11.0 *for Windows* para identificar as possíveis variáveis confundidoras.