REGIANE SARAIVA DE SOUZA MELO ALENCAR

**Ocorrência da infecção oculta pelo vírus da
hepatite B (VHB) em pacientes com cirrose
hepática pelo vírus da hepatite C (VHC)
com ou sem carcinoma hepatocelular
(CHC)**

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

Área de concentração:
Gastroenterologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. Flair José
Carrilho

SÃO PAULO

2006

**Aos meus pais Jamil e
Regina pelo dom da vida,
educação, carinho e amor.**

À minha segunda família:
Francisco e Nancy, Salete,
Núria e Maite; Luiz Alberto e
Glauber e Gabriela.
Obrigada pela amizade.

**Às minhas queridas irmãs:
Regineide, Regilene e Regiclea e ao
meu pequeno e tão querido
sobrinho Pedro Victor.
Amo muito vocês**

A

**todos os meus amigos que a distância
separou, mas a lembrança e o carinho
permanecem gravados no meu coração.**

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho científico é uma somatória de conhecimentos técnicos, aprendizado e principalmente de relacionamento e convivência humana.

O meu desejo de vida acadêmica teve início em 1992, quando ingressei na atividade de Iniciação científica do CNPq, sob a supervisão da Prof. Dra. Maria da Paz Carvalho Silva, no LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – Universidade Federal de Pernambuco, a quem devo agradecimentos eternos pela dedicação e paixão pelo ensino e principalmente pela amizade e confiança em mim depositadas.

Aos meus preceptores do Hospital Universitário Osvaldo Cruz – Residência de Clínica Médica – que tanto me incentivaram na busca pela ciência: Drs. Oscar, Crezo, Luiz Cláudio, Roberto e Dra. Zoraia.

Gostaria de agradecer as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para realização deste:

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Flair José Carrilho, pela oportunidade e por todos os momentos dedicados a mim, aprendi muito e continuo aprendendo, não só nos termos científicos, mas éticos e exemplo de humanismo, dignidade e simplicidade.

Também de maneira muito especial, a Dra. Wanda Regina Cally por toda influência no gosto pela pesquisa, ensinamentos e pelo carinho de mãe, desde a ocasião da residência de Gastroenterologia clínica no Hospital Heliópolis até os dias de hoje, já que também participou da minha banca de qualificação.

Aos amigos João Renato Rebello Pinho e Isabel Maria V.G.C. Mello, pelas orientações, sugestões e todo o desenvolvimento da parte técnico-laboratorial e idéias, que sem dúvida nenhuma, tiveram uma importância ímpar.

Da mesma forma, gostaria de agradecer a Roberta Sitnik pelo empenho depositado na realização da parte técnico-laboratorial.

Às amigas Michele Mesquita Soares Gomes e Fernanda de Mello Malta, por toda ajuda, amizade e apoio, principalmente quando as reações não davam certo, quando tudo parecia desmoronar, bem como a revisão do conteúdo da Metodologia. Meu agradecimento todo especial.

Aos meus colegas de Pós-graduação: Celso Eduardo Lourenço Matielo, Cláudia Megumi Tani, Luciana Oba Kikuchi, Suzete Notaroberto, assim como os colegas de trabalho: Suzane Kioko Ono-Nita, Alberto Queiroz Farias, Luís Cláudio, Eduardo Zanandréa e Fabrício Guimarães, pela convivência saudável, pelos momentos de alegria e pela troca de aprendizagem.

Ao Dr. Evandro Sobroza de Mello por toda assistência na parte histopatológica, paciência e todas as sugestões que me foram de grande valia na minha qualificação e na realização deste trabalho.

À Dra. Cláudia Oliveira pelo carinho e sugestões de grande importância para o desenvolvimento e confecção deste.

Aos grandes amigos, agora um pouco distante, José Eymard Medeiros Moraes Filho e Juliano Oliveira, com os quais aprendi muito. Eymard, grande responsável por parte deste trabalho, minha enorme gratidão.

À Cláudia de Arruda e Ivan Roberto de Arruda Júnior, por toda ajuda, compreensão e ânimo, indispensáveis em todas as horas, vocês são nossa alavanca e, sobretudo pelo carinho e amizade, meus agradecimentos sinceros.

À Júlia Fukushima pelo auxílio fundamental na análise estatística.

À Fabiana Renata Soares Bispo, pela dedicação a pós-graduação, interesse e sempre nos lembrando dos nossos prazos. Obrigada.

À toda equipe da Gastroenterologia Clínica, médicos, enfermeiros, auxiliares, residentes e secretárias.

À toda equipe da Cirurgia e Transplante do Fígado do HCFMUSP, principalmente a Ana Lúcia por toda ajuda e liberação da soroteca.

À *Alves de Queiroz Family Fund for Research* , pelo suporte dado ao nosso grupo.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Epígrafe

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Casuística e Métodos.....	8
3.1. Casuística	8
3.1.1. Critérios de Inclusão.....	9
3.2. Métodos.....	9
3.2.1. Coleta e armazenagem dos soros.....	9
3.2.2. Revisão de prontuários.....	10
3.2.3. Avaliação Histopatológica.....	12
3.2.4. Testes sorológicos.....	18
3.2.5. Detecção e genotipagem do vírus da Hepatite C no soro.....	18
3.2.5.1. Extração do RNA.....	18
3.2.5.2. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	19
3.2.5.3. Primeira PCR.....	19
3.2.5.4. Segunda PCR (“Nested” PCR).....	20
3.2.5.5. Análise do produto amplificado.....	21
3.2.5.6. Seqüenciamento da região 5’UTR do vírus da Hepatite C.....	21
3.2.5.7. Quantificação do DNA do VHC.....	22

3.2.5.8. Reação de seqüenciamento.....	22
3.2.5.9. Purificação do DNA após a reação de seqüenciamento e análise eletroforética.....	23
3.2.5.10. Análise das seqüências.....	24
3.2.5.11. Genotipagem do vírus da Hepatite C.....	25
3.2.6. Detecção do vírus da Hepatite B no soro.....	27
3.2.6.1. Extração do DNA do VHB.....	27
3.2.6.2. Primeira PCR.....	27
3.2.6.3. Segunda PCR (“Nested” PCR).....	28
3.2.6.4. Análise do produto amplificado.....	28
3.2.7. Metodologia da PCR em tempo real.....	29
3.2.8. Biossegurança.....	30
3.2.9. Extração do DNA em tecido.....	30
3.2.9.1. Detecção do gene da beta actina.....	32
3.2.9.2. Primeira PCR.....	33
3.2.9.3. Segunda PCR (“Nested” PCR).....	34
3.2.9.4. Análise do produto amplificado.....	34
4. Análise estatística.....	35
5. Resultados.....	36
6. Discussão.....	48
7. Conclusões.....	61
8. Referências Bibliográficas.....	62
9. Anexos.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-HBc total – Anticorpo contra o antígeno core total do vírus da hepatite B

Anti-HBs – Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-HCV – Anticorpo contra o vírus da hepatite C

APTS – Aminopropiltrethoxi-silane

BSA - Albumina bovina sérica

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CHC – Carcinoma hepatocelular

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTT – Ditionitrito

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos

ddNTPs – didesoxirribonucleotídeos

dl - Decilitro

ELISA – Enzima imuno-ensaio

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GT – Isotiocianato de guanidina

° C – Graus Celsius

g – Grama

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

H₂O – Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

INR – International Normalization Ratio para o tempo de protrombina

L - Litro

Log_e – Logaritmo neperiano

ml – Mililitro

mg – Miligrama

MMLV-RT – Transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney

M – Molar

mM – Milimolar

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MELD – “Model for end stage liver disease”

μl – Microlitro

μM – Micromol

ng – Nanograma

nM – Nanomol

NaN₃ - Azida sódica

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pmol – Picomol

% - Porcento

pb – Pares de bases

PBS – Solução tampão fosfato

RNA – Ácido ribonucléico

RNAsin – Inibidor de RNAses

rpm – Rotação por minuto

SBP – Sociedade Brasileira de Patologia

SBH – Sociedade Brasileira de Hepatologia

TaqDNA Polimerase – DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

TA – Temperatura ambiente

UV – Ultravioleta

U – Unidade

UTR – Região não traduzida

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

V – Voltz

WHV – Vírus da hepatite da marmota

RESUMO

ALENCAR, R.S.S.M.. **Ocorrência da infecção oculta pelo vírus da hepatite B (VHB) em pacientes com cirrose hepática pelo vírus da hepatite C (VHC) com ou sem carcinoma hepatocelular (CHC)**. São Paulo, 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O presente estudo avaliou materiais de 50 pacientes com cirrose hepática pelo vírus da hepatite C (VHC) que foram submetidos ao transplante hepático no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo no período de 1993 a 2004, sendo divididos em dois grupos: Grupo 1 (33 pacientes com cirrose pelo VHC) e Grupo 2 (17 pacientes com cirrose pelo VHC com carcinoma hepatocelular). Nosso objetivo foi estudar a ocorrência da infecção oculta pelo VHB em pacientes com cirrose pelo VHC com ou sem CHC através do estudo molecular do genoma viral (DNA do VHB) no soro, tecido hepático tumoral e não tumoral pela utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pelos métodos *in house* e em tempo real. Todos os pacientes eram HBsAg negativos, possuíam soroteca e bloco de explante hepático em parafina, não apresentando concomitância com doenças hepáticas colestáticas, metabólicas e autoimunes. Foram avaliados os prontuários por um único pesquisador no sentido de coletar informações tais como: sexo, idade, dados de exames laboratoriais bioquímicos, sorológicos, α fetoproteína e coagulação; além de dados clínicos tais como ascite e encefalopatia hepática para cálculos de índices prognósticos da cirrose (Child

e MELD). Todo o material de explante hepático teve o Escore de Ishak e a Classificação das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia para hepatites crônicas avaliados, assim como a Classificação de Edmondson e Steiner para os que apresentassem CHC. A técnica de PCR *in house* para detecção do DNA do VHB no soro e em tecido hepático tumoral e não tumoral apresentou negatividade em todas as amostras. Na técnica de PCR em tempo real apenas um caso do grupo 2 foi positivo no soro (sexo masculino, 66 anos, Anti-HBC total isolado e CHC); no tecido hepático tumoral no grupo 2 tivemos dois casos com resultados indeterminados e no tecido hepático não tumoral também do grupo 2, tivemos dois casos indeterminados. O grupo 1 não apresentou positividade para nenhuma das técnicas utilizadas. Concluimos que entre nossos pacientes com ou sem carcinoma hepatocelular associados à cirrose hepática pelo VHC, a infecção oculta pelo VHB foi muito baixa, provavelmente devido à baixa prevalência da infecção pelo VHB na nossa população.

Descritores: 1.VÍRUS DA HEPATITE B/diagnóstico 2.VÍRUS DA HEPATITE B/epidemiologia 3.HEPACIVÍRUS 4.INFEÇÃO 5.FIBROSE 6.CARCINOMA HEPATOCELULAR.

Summary

ALENCAR, R.S.S.M.. **Occurrence of occult hepatitis B virus infection (HBV) in patients with liver cirrhosis due to hepatitis C virus (HCV) with or without hepatocellular carcinoma (HCC).** São Paulo, 2005. Master Thesis - School of Medicine, University of São Paulo, Brazil.

This study evaluated serum and liver tissue samples from 50 patients with liver cirrhosis due to hepatitis C virus (HVC) that underwent liver transplant at the Hospital das Clínicas – University of São Paulo School of Medicine during the period of 1993 to 2004, divided into two groups: Group 1 (33 cirrhotic patients due to HCV) and Group 2 (17 cirrhotic patients due to HCV with hepatocellular carcinoma – HCC). Our aim was to study the occurrence of occult HBV0 infection in cirrhotic patients due to HCV with or without HCC through the molecular study of HBV DNA in the serum, tumoral liver tissue and non tumoral liver tissue by the polymerase chain reaction (PCR) techniques using in house and real time PCR. All the patients were HBsAg negative, having previous serum samples frozen at -20°C and liver tissue explanted in paraffin, without presenting concomitant cholestatic, metabolic and autoimmune liver diseases. The following variables were collected: gender, age, biochemical and coagulation laboratory tests and HBV serology (HBsAg, anti-HBc total,

anti-HBs). Among the clinical data, ascites and encephalopathy were collected for the Child and MELD prognostic indexes. In the explanted liver tissue the Ishak's Score, The Brazilian Society of Pathology and Hepatology Classification for chronic hepatitis, and Edmondson and Steiner Classification for HCC were applied in the liver tissue. All samples with or without tumoral liver tissue and serum were negative for HBV DNA using in house PCR technique. By the real time PCR technique only one case from Group 2 was HBV DNA positive in serum (male, 66, isolated anti-HBc total positive and HCC). In the tumoral and non-tumoral liver tissues there were two indeterminated HBV DNA cases among Group 2 patients. All samples for Group 1 patients were negative for HBV DNA using both techniques. In conclusion, our study has shown the extremely low occult hepatitis B virus infection among the HCV cirrhotic patients with or without HCC, maybe due to the low HBV past infection among the Southeastern Brazilian population.

Descriptors: 1-Hepatitis B virus/diagnosis 2-Hepatitis B/epidemiology
3-Hepacivirus 4-Infection 5-Fibrosis 6-Hepatocellular carcinoma.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo. Apresenta elevada incidência nas áreas de maior densidade demográfica do globo, como Sudeste Asiático e a África Central e baixa incidência na Europa Ocidental e na América do Norte. Na América Latina, a incidência estimada é considerada intermediária: 0,7 a 9,9 casos por 100.000 habitantes por ano. No Sudeste Asiático, a elevada incidência deve-se à superposição com a infecção crônica pelo Vírus da Hepatite B (VHB), enquanto na África Central prevalece, além da infecção pelo VHB, a exposição às aflatoxinas originadas das precárias condições de armazenamento de grãos (1,2). Nesses pacientes, o CHC se desenvolve freqüentemente em indivíduos mais jovens e na ausência de cirrose.

Além da infecção crônica pelo VHB, o Vírus da Hepatite C (VHC) também está relacionado ao desenvolvimento do CHC. Na América do Norte e na Europa Ocidental, a cirrose secundária à infecção pelo VHC é, juntamente com o álcool, o principal fator envolvido na patogênese do CHC (1,2).

A infecção crônica pelo VHB é o fator mais freqüentemente associado ao desenvolvimento do CHC em todo o mundo, sendo os seus mecanismos carcinogênicos ainda obscuros. Nem todos os pacientes com infecção pelo VHB apresentam o mesmo risco de desenvolvimento de CHC, sendo aqueles com inflamação mais ativa ou com disfunção hepatocelular mais avançada os mais propensos ao surgimento da neoplasia. O VHC tem papel

menos claro na patogênese do CHC quando comparado ao VHB. O genótipo 1b do VHC aparenta estar associado à doença hepática mais grave e ao CHC. Entretanto, se isso reflete propriedades intrínsecas desse genótipo ou se deve à menor resposta terapêutica, permanece ainda uma incógnita. A concomitância das infecções pelo VHB e VHC, fato comum, pode levar a um quadro mais grave, sendo o surgimento do CHC mais comum na dupla infecção. As duas viroses podem interagir causando uma inflamação mais intensa e acelerando a progressão à cirrose. Os efeitos oncogênicos diretos das duas viroses podem ser aditivos ou sinérgicos. Similarmente, a infecção oculta pelo VHB pode ser um cofator no desenvolvimento de CHC, se a infecção por si só causa cirrose ou CHC ainda permanece incerto (3,4).

Vários estudos clínicos têm mostrado que a infecção pelo VHC pode exercer um efeito de interferência viral, levando ao estado de portador de VHB ou supressor desta infecção (5-9).

A infecção crônica pelo VHB é caracterizada pela persistência do HBsAg sérico e da viremia por período superior a seis meses (10,11). Acredita-se que o clareamento do HBsAg em pacientes com infecção pelo VHB esteja associado ao desaparecimento da viremia e remissão da doença. Porém, dados acumulados indicam que um baixo nível de DNA do VHB permanece detectável no soro e tecido hepático em alguns pacientes que clarearam espontaneamente o HBsAg após infecção aguda auto-limitada ou infecção crônica pelo VHB. O mesmo tem sido também demonstrado após tratamento eficaz para o VHB. Esta observação resultou na introdução do conceito de infecção pelo VHB “oculta”, “silenciosa” ou

“latente”, que se define pela presença de infecção pelo VHB (por detecção de DNA viral no soro e/ou tecido hepático) com HBsAg sérico indetectável (12,13).

Infecção oculta pelo VHB é mais frequentemente observada nos pacientes com anticorpo anti-HBc como único marcador sorológico para o VHB (14). Porém, é também relatado em pacientes sem nenhum marcador sorológico para infecção pelo VHB (12-16).

Várias possibilidades foram aventadas como mecanismo de infecção oculta pelo VHB:

1. mutações na seqüência do DNA do VHB;
2. integração do DNA do VHB dentro dos cromossomos dos hospedeiros;
3. infecção das células mononucleares do sangue periférico através da resposta imune do hospedeiro;
4. formação de complexos imune contendo VHB;
5. resposta imune alterada do hospedeiro e,
6. interferência do VHB por outros vírus (VHC principalmente).

A maioria dos estudos acha que a infecção oculta pelo VHB esteja relacionada aos baixos níveis de VHB com níveis subdetectáveis de HBsAg e não infecção com variantes de VHB que possam não expressar proteína S ou variantes que expressam proteína S com epítomos aberrantes que não podem ser detectados por ensaios sorológicos convencionais (13) .

A exata prevalência da infecção oculta pelo VHB envolve diferentes aspectos clínicos, como o risco potencial de transmissão através de

transusão sangüínea, hemodiálise e transplante de órgãos, assim como transmissão vertical (17).

Embora a infecção oculta pelo VHB tenha sido identificada em pacientes com hepatite crônica pelo VHC, sua prevalência e significância clínica não estão estabelecidas (20).

Essa infecção pode servir como causa de doença hepática criptogênica, contribuindo para exacerbação aguda de moléstia crônica, ou até mesmo hepatite fulminante, além de poder afetar a progressão e a resposta terapêutica da hepatite crônica pelo VHC (17).

Sua presença tem sido associada ao desenvolvimento do CHC e, recentemente, tem sido relatada a detecção do DNA do VHB em tecidos tumorais [através da reação em cadeia de polimerase (PCR) e hibridização *Southern blot*] em pacientes com hepatite crônica pelo VHC e carcinoma hepatocelular com HBsAg negativo (18).

Em modelos animais, a infecção pelo VHB também foi demonstrada em marmotas infectadas pelo WHV (Vírus da Hepatite da Marmota), que se relaciona ao VHB humano. Nestes animais, o CHC encontra-se relacionado à infecção pelo vírus, que persiste com baixos níveis de replicação de forma persistente tanto no fígado quanto nos tecidos linfáticos após cura espontânea de infecção aguda pelo WHV (19).

Sumarizando, a infecção oculta pelo VHB parece estar associada à interação entre fatores do hospedeiro e virais, podendo envolver diferentes mecanismos: mutações ou integração da sequência do DNA do VHB; alteração da expressão de proteínas do VHB, resultando em HBsAg

indetectável e possível escape da resposta imune do hospedeiro. Infecção persistente do VHB pode ser mantida por replicação do VHB extra-hepático, por exemplo, em células mononucleares do sangue periférico (linfócitos). Co-infecção do VHB com outros vírus hepatotrópicos pode resultar em interferência e inibição da replicação do VHB. Permanece a ser determinado se o genótipo do VHB e mutações de outras regiões que não pré-S/S do genoma do VHB desenvolvem algum papel na patogênese da infecção oculta pelo VHB (21).

A exata prevalência da infecção oculta pelo VHB varia em diferentes partes do mundo e com a técnica utilizada para a detecção do DNA do VHB, estando presente em parte substancial de pacientes com cirrose e CHC (22).

Importante observação em pacientes com infecção oculta pelo VHB tem sido o baixo nível de DNA do VHB: 10^{2-3} cópias/ml no soro e 0,01 – 0,1 cópias por célula hepática (23,24). A frequência da detecção do DNA do VHB tem sido mais alta em tecido hepático do que em soro e mais frequentemente em tecidos congelados do que em tecidos parafinados. Portanto, o material usado e a sensibilidade dos ensaios para detecção do DNA do VHB podem influenciar nos resultados.

A maioria dos estudos prévios utilizou observações retrospectivas sem grupos controles, perdendo assim a associação direta da infecção oculta pelo VHB com suas alterações patológicas específicas e progressão da doença. Análises quantitativas altamente sensíveis através da biologia molecular, combinadas a um ensaio clínico bem elaborado e prospectivo, poderão prover melhor conhecimento do papel da infecção oculta pelo VHB

e de sua prevalência em pacientes com CHC, podendo ser assim tanto fator de risco como marcador para o desenvolvimento de câncer (25).

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo estudar a ocorrência da infecção oculta pelo VHB em pacientes com cirrose hepática pelo VHC com ou sem carcinoma hepatocelular através do:

- Estudo molecular do genoma viral (DNA do VHB) no soro, tecido hepático tumoral e não tumoral pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Papel dos genótipos de ambas infecções na carcinogênese.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Foram analisados materiais de 50 pacientes, incluindo soro e tecido hepático (proveniente de explante hepático), todos portadores de cirrose hepática pelo VHC, submetidos à transplante hepático no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, dos quais 17 apresentavam carcinoma hepatocelular. Sendo divididos em dois grupos: **Grupo 1** – Pacientes com cirrose hepática pelo VHC (33 pacientes); **Grupo 2** – Pacientes com cirrose hepática pelo VHC com carcinoma hepatocelular (17 pacientes).

Os soros foram colhidos no período de 1993 a 2004 por ocasião do transplante hepático. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 039/04, para a pesquisa de DNA viral.

3.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo pacientes que preencheram os seguintes critérios:

- Ser portador de cirrose hepática pelo VHC com ou sem carcinoma hepatocelular submetidos ao transplante hepático;
- Sorologia negativa para HBsAg;
- Soroteca por ocasião do transplante hepático;
- Possuir bloco de explante hepático em parafina;
- Não ser portador de insuficiência renal crônica;
- Não possuir concomitância de doenças hepáticas metabólicas, autoimunes e colestáticas.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. COLETA E ARMAZENAGEM DOS SOROS

As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos e centrifugadas em temperatura ambiente, com intervalo máximo de 6 horas para o processamento e armazenamento. Cada soro foi distribuído em várias alíquotas com volume aproximado de 1ml em tubos plásticos, que foram imediatamente estocados a -20° C para análise posterior (como se trata de extração de DNA, o mesmo é mais estável em temperatura mais alta).

3.2.2. REVISÃO DE PRONTUÁRIOS

Foram revisados 50 prontuários dos pacientes por um único pesquisador, no sentido de coletar informações sobre as seguintes variáveis: sexo, idade, dados de exames laboratoriais bioquímicos {alanina amino transferase [10-44U/L](ALT), aspartato amino transferase [10-34U/L] (AST), bilirrubina total [0,2-1,0 mg/dl], albumina [3,5-5,0 g/dl], creatinina [0,6-1,4 mg/dl], α fetoproteína [até 10 ng/ml], fosfatase alcalina [45-122U/L], gama-glutamilttransferase [11-50U/L]}, coagulação [INR (até 1,0)] e sorológicos (HBsAg, anti-HBc total, anti-HBs, anti-VHC), realizados no período da coleta do soro e próximo ao transplante hepático (até 2 semanas antes). Além de dados laboratoriais, foram avaliados dados clínicos para cálculos da classificação do prognóstico da cirrose hepática tais como: Child-Tourcotte modificado por Pugh (**Quadro 1**)(26), que avalia o declínio da função hepática dos cirróticos em três classes: A, B e C, representando uma redução na função hepática de aproximadamente 30, 50 e 90%, respectivamente e MELD (**Quadro 2**)(27) (do acróstico “Model for End-stage Liver Disease”), como presença de ascite e encefalopatia hepática. Devido à limitação da Classificação de Child, principalmente em avaliar o nível de falência da função renal – um dos fatores prognósticos mais importantes na descompensação da cirrose -, o MELD foi proposto, baseado num sistema de escore que avalia: bilirrubina total sérica, nível de creatinina, International Normalized Ratio (INR) para o tempo de protrombina e a etiologia da doença hepática. O objetivo desse escore é prever a mortalidade dos pacientes em

três meses (90 dias), para assim estabelecer prioridades para o transplante hepático. Porém, a acurácia desse escore diminui a longo prazo. A taxa de sobrevivência estimada foram de 85,4; 83,3 e 46,8% para pacientes com escore de MELD: < 10; 11 a 20; e 21 a 40,respectivamente.

Quadro 1- Classificação Child-Tourcotte Modificado por Pugh (26).

Escore (pontos)	1	2	3
Bilirrubina mg/dl	< 2,0	2,0 – 3,0	> 3,0
Albumina g/dl	> 3,5	2,8 – 3,5	< 2,8
Ascite	Ausente	Moderada	Tensa
Encefalopatia	Ausente	Grau I/II	Grau III/IV
<i>INR</i>	<1,7	1,7 – 2,3	> 2,3

A: 5 a 6 pontos

B: 7 a 9 pontos

C: 10 a 15 pontos

Quadro 2- Classificação da Insuficiência Hepática de acordo com gravidade (Sistema MELD)(27).

MELD-“ Model for End-stage Liver Disease”

$$\text{MELD} = 0,38 \log_e (\text{Bilirrubina}) + 1,12 \log_e (\text{INR}) + 0,98 \log_e (\text{creatinina}) + 0,64 (\text{etiologia}) \times 10$$

- Escore máximo = 40
- Valor preditivo de mortalidade em 90 dias independente da etiologia da hepatopatia e da presença de complicações.

3.2.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Todo o material de explante hepático teve o Escore de Ishak calculado – Índice de Atividade Histológica – que avalia o **estágio** (medida da fibrose e alteração estrutural hepática) e o **grau** de atividade necroinflamatória (avalia a intensidade da atividade necroinflamatória nas hepatites crônicas)(**Quadro 3**)(28) e a Classificação da SBP-SBH (Sociedade Brasileira de Patologia – Sociedade Brasileira de Hepatologia) (**Quadro 4**)(29), assim como a classificação de Edmondson e Steiner para a análise de diferenciação histológica do carcinoma hepatocelular (**Quadro 5**)(30).

Quadro 3 – Escore de IshaK (Índice de Atividade Histológica)(28).

Grau – Atividade Inflamatória

Atividade Necroinflamatória	Escore
A-Inflamação periportal ou hepatite de interface	0-4
Ausente	0
Leve	1
Leve/moderada	2
Moderada	3
Intensa	4
B- Necrose confluyente	0 – 6
Ausente	0
Necrose confluyente focal	1
Necrose de zona 3 em poucas áreas	2
Necrose de zona 3 em muitas áreas	3
Necrose de zona 3 + ocasionais pontes Portal-Central (P-C)	4
Necrose de zona 3 + múltiplas pontes P-C	5
Panacinar ou necrose multiacinar	6
C- Necrose lítica focal, apoptose e inflamação focal	0 – 4
Ausente	0

Um foco ou menos pela objetiva 10X	1
Dois ou quatro focos pela objetiva 10X	2
Cinco a dez focos pela objetiva 10X	3
Mais de dez focos pela objetiva 10X	4
D- Inflamação portal	0 – 4
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Moderada/intensa	3
Intensa	4

Grau = A + B + C + D

Escore máximo = 18

Estágio – Alteração estrutural hepática

Alteração estrutural hepática	Escore
Ausência de alteração, fibrose a Cirrose	0 – 6
Ausência de fibrose	0
Expansão fibrosa de poucas áreas portais, com ou sem curtos septos de fibrose	1
Expansão fibrosa de muitas áreas portais, com ou sem septos de fibrose	2
Expansão fibrosa de muitas áreas portais com ocasionais pontes Portal-Portal (P-P)	3
Expansão fibrosa de muitas áreas portais com	4

marcadas pontes P-P assim como pontes Portal-Central (P-C)	5
Marcadas pontes (P-P e/ou P-C) com ocasionais nódulos	6
Cirrose	

Escore máximo = 6

Quadro 4 – Classificação da SBP-SBH (29).

Critérios de semiquantificação

1. alterações estruturais:

0- normal

1- expansão fibrosa de espaço porta

2- expansão fibrosa portal com septos porta-porta

3- preservação parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, podendo ser visto esboço de nódulos

4- cirrose

2.infiltrado inflamatório portal(atividade portal):

0- raros linfócitos portais

1- aumento discreto dos linfócitos portais

2- aumento moderado dos linfócitos portais

3- aumento acentuado dos linfócitos portais

4- aumento muito acentuado dos linfócitos portais

3. Atividade periportal:

0- ausência de lesões

1- extravasamento de linfócitos para a interface (spill over), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados

2- necrose em saca-bocados discreta

3- necrose em saca-bocados moderada

4- necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços porta

4. Atividade parenquimatosa:

0- hepatócitos normais

1- alterações discretas dos hepatócitos

2- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitários em numerosos sítios

3- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitários em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente

4- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfocitários em numerosos sítios, associada a necrose confluyente extensa/múltipla.

Quadro 5 – Classificação de Edmondson e Steiner (30).

Classificação de Edmondson e Steiner	
Grau	
0	Ausência de tumor
I	Tumores bem diferenciados, com trabeculação fina e sem atipia nuclear
II	Estruturas acinares ou glandulares associada com estrutura trabecular com atipia nuclear variável
III	Macrotrabéculas, núcleos grandes com hipercromasia e podendo haver células gigantes numerosas
IV	Tumores com crescimento mais sólidos e células bizarras
V	Indiferenciado

3.2.4. TESTES SOROLÓGICOS

Todos os pacientes foram submetidos à pesquisa dos marcadores sorológicos de infecção pelo VHB e VHC (HBsAg, anti-HBc total, anti-HBs, anti-VHC) através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Abbott, EUA) como parte da rotina de exames do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.2.5. DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C NO SORO

O ácido nucléico viral foi amplificado através da reação de “nested” PCR, técnica adaptada do método proposto por Garson et al (31), o qual possui duas etapas de amplificação permitindo o aumento da sensibilidade da reação.

3.2.5.1. EXTRAÇÃO DO RNA

O RNA viral foi extraído do soro utilizando-se o método de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio, como descrito por Chomczynski & Sacchi, 1987 (32). Para a extração, foram acrescentados 300 µl de uma solução de isotiocianato de guanidina (GT) e 50 µl de clorofórmio PA (Merck Sharp & Dome, Campinas-SP) gelado a 100 µl da amostra de soro. Após homogeneização, incubação e centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o RNA do VHC precipitado com 300 µl de Etanol PA

(Merck Sharp & Dome, Campinas-SP) gelado por duas vezes. Depois de aspirar o sobrenadante com bomba de vácuo, foi adicionada a mistura para síntese do cDNA (DNA complementar).

3.2.5.2. SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada com a utilização da enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MMLV-RT) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o “primer” reverso específico NCR2 (5' ATA CTC GAG GTG CAC GGT CTA CGA GAC CT 3'). A reação foi realizada adicionando-se ao RNA extraído uma mistura contendo 5 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl de DTT (0,1M), 2 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de RNAsin, 1 µl do “primer” NCR2 (20 pmol/ µl), 0,5 µl da enzima Transcriptase Reversa (MMLV-RT), e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 25 µl. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C para síntese do DNA complementar, seguido por incubação a 95°C por 15 minutos em termociclador Eppendorf (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para inativação da enzima.

3.2.5.3. PRIMEIRA PCR

Foram adicionados a 10 µL de cDNA de cada amostra 40 µL de uma mistura contendo 5 µl de 10X PCR Buffer, 2 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de cada “primer” [PTC1 (5' CGT TAG TAT GAG TGT CGT GC 3') e NCR2] na concentração de 20 pmol/µl, 0,3 µl de Platinum

Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 40 µl. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura em termociclador Eppendorf (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com o programa específico que consistiu de 25 ciclos a 94°C por 55 segundos (denaturação), 55°C por 40 segundos (anelamento), 72°C por 40 segundos (extensão). Ao término dos ciclos de amplificação foi acrescentado um passo de extensão a 72 °C por 5 minutos para finalização de alguma polimerização incompleta. A cada 5 amostras, foi colocada uma amostra de água Milli-Q como controle negativo da reação e a cada protocolo foi colocado um controle positivo.

3.2.5.4. SEGUNDA PCR (“NESTED” PCR)

Para a segunda amplificação, foram adicionados 5µl do produto da primeira amplificação a 45 µL de uma mistura contendo 5 µl de 10X PCR Buffer, 2 µl de dNTPs (10mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de cada “primer” [PTC3 (5’AGT GTC GTG CAG CCT CCA GG 3’) e NCR4 (5’CAC TCT CGA GCA CCC TAT CAG GCA GT 3’)] na concentração de 20 pmol/µl, 0,3 µl de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 45 µl. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura conforme descrito para a primeira amplificação.

3.2.5.5. ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

O produto amplificado foi identificado por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Para isto, foram misturados 4 µl do produto da segunda amplificação com 1µl do tampão 10X Bluejuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a mistura foi aplicada em gel de agarose 2% preparado com tampão tris-borato EDTA 1X e 0,02% de brometo de etídeo. Com as amostras, foram aplicados os controles positivos e negativos de cada reação assim como um marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA,EUA). O gel foi submetido a eletroforese de 110 V por 30 minutos e ao final o produto amplificado foi visualizado em um transiluminador de luz Ultra Violeta (U.V.) acoplado a um sistema de captura de imagem (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, INC. CA, EUA).

3.2.5.6. SEQUÊNCIAMENTO DA REGIÃO 5'UTR DO VÍRUS DA HEPATITE C

Para o seqüenciamento, foi utilizada a técnica de seqüenciamento por PCR, derivada da metodologia de Sanger et al., 1977 (33), utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o “Kit” ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

3.2.5.7. QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO VHC

A quantificação do DNA foi realizada nas amostras que apresentaram resultado positivo após a segunda PCR. Foram misturados 4 μ l do DNA amplificado com 1 μ l do tampão 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a mistura foi aplicada em gel de agarose 2% preparado com tampão tris-borato EDTA 1X e 0,02% de brometo de etídeo. Juntamente com as amostras, foram aplicados no gel 4 μ l de um padrão de massa molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

O gel foi submetido à eletroforese de 110V por 30 minutos, e ao final o DNA foi visualizado em um transiluminador de luz U.V. acoplado a um sistema de captura de imagem (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, INC. CA, EUA). A concentração do DNA presente na amostra foi determinada por comparação da intensidade das bandas das amostras com a intensidade das bandas do padrão, conforme instruções do fabricante.

3.2.5.8. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Após a quantificação 2 μ L de DNA (1-3ng) foram adicionados a uma mistura contendo 4 μ l da solução PCR Reaction Mix ("Kit ABI Prism^R BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction - Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que contém didesoxinucleotídeos marcados e não marcados, as enzimas *AmpliTa**q* DNA polimerase, FS e *rTth* pirofosfatase, 4 μ l do tampão de sequenciamento 5X [Tris-HCl (pH 9,0) e

MgCl₂ (50 mM)], 2 µl dos “primers” utilizadas na segunda PCR (PTC3 e NCR4, separadamente) na concentração de 1pmol/ µl, e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 20 µl. Em seguida, as amostras foram submetidas a 25 ciclos de variação de temperatura (30 segundos a 90 °C, 15 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C) em termociclador (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para síntese da fita complementar e incorporação dos ddNTPs marcados.

3.2.5.9. PURIFICAÇÃO DO DNA APÓS A REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE ELETROFORÉTICA

Para remover resíduos de didesoxinucleotídeos marcados que não foram incorporados ao DNA, “primers” e enzima, as amostras foram submetidas ao seguinte tratamento: foram adicionados 80 µl de isopropanol 75 % (Merck Sharp & Dome, Campinas- SP) ao produto da reação, e, após agitação, a mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente (TA) com posterior centrifugação a 16.000 x g por 20 minutos (TA). Após a centrifugação, todo o isopropanol foi retirado e o DNA precipitado lavado duas vezes pela adição de 1000 µl de Etanol 70 % (Merck Sharp & Dome, Campinas-SP) e centrifugação a 16.000 x g por 15 minutos. Ao término da segunda lavagem, todo o Etanol foi retirado e os resíduos evaporados pelo aquecimento do tubo em termobloco a 94°C por aproximadamente 2 minutos.

O DNA purificado após a reação de seqüenciamento foi ressuspenso com 4 µl do tampão de amostra (5 partes de Formamida deionizada [Sigma,

Saint Louis, MO,EUA] e 1 parte de Blue dextran [Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA]). Posteriormente, as amostras de DNA foram incubadas a 94 °C por 4 minutos para denaturação das fitas, com posterior resfriamento em banho de gelo e aplicação de 1,5 µl no gel de poliacrilamida. Para o preparo do gel, foi utilizada uma solução comercial de acrilamida e bisacrilamida (Long Ranger Gel Solution 50%, BMA), seguindo-se o procedimento recomendado pela Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA. Após aplicação das amostras o gel foi submetido à eletroforese no seqüenciador automático ABI PRISM^R 377, da Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA.

3.2.5.10. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As seqüências geradas foram validadas e editadas no programa Phred-Phrap-Consed. Após analisadas quanto à sua qualidade no programa Phred (34) as fitas “sense” e “anti-sense” de cada amostra que alcançaram um escore >20 em suas bases foram validadas para a formação da seqüência consenso “contig” pelo programa Phrap (34). A seqüência consenso formada admite apenas 1 erro a cada 10.000 pares de base em conformidade com o critério de qualidade proposto, sendo analisada e editada pelo programa Consed (35).

3.2.5.11. GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C

Depois da validação, cada amostra ficou representada por uma sequência consenso. Estas seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X (Thompson et al., 1997) (36) editada no programa Bioedit e o alinhamento foi visualizado no programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analalysis) versão 2.1 (Kumar et al., 2001) (37), as seqüências foram alinhadas e comparadas com seqüências da região 5'UTR de cada genótipo retiradas do *GenBank*, (seqüências padrão) cujos números de acesso estão relacionados na tabela 1, para a identificação dos diferentes genótipos.

Tabela 1 – Número de acesso das seqüências de diferentes genótipos do VHC retiradas do “GenBank” utilizadas para a genotipagem

Número de acesso	Genótipo
M62321	1a
GCHCV1A	1a
M67463	1a
D10749	1a
AF054247	1b
AF054248	1b
AF054249	1b
D14484	1b
D11168	1b
D14853	1c
GCHCV2A	2a
D00944	2a
GCHCV2B	2b
D01221	2b
D00828	2b
D50409	2c
D17763	3a
D28917	3a
D14312	3a
D16617	3b
D26556	3b
D37854	3b
Y11604	4a
D45194	4a
Y13184	5a
D50467	5a
D84262	6a
Y12036	6b

3.2.6. DETECÇÃO DO VIRUS DA HEPATITE B NO SORO

Para a pesquisa do DNA do VHB nas amostras negativas para HBsAg foram realizadas reações de “nested” PCR com “primers” específicos para a região do Core do VHB descritos por TAKAHASHI et al., 1995 (38).

3.2.6.1. EXTRAÇÃO DO DNA DO VHB

O DNA viral foi extraído do soro utilizando-se o método de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio conforme descrito para a extração do RNA do VHC. Após extração, o DNA precipitado foi ressuspenso em 50 µl de água Milli-Q estéril.

3.2.6.2. PRIMEIRA PCR

Foram adicionados a 10 µL do DNA extraído de cada amostra 90 µL de uma mistura contendo 10 µl de 10X PCR Buffer, 6 µl de dNTPs (10mM), 4 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada “primer” [1778 (5' GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT 3') e 2032 (5' CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT 3')] na concentração de 25 pmol/ µl, 0,3 µl de Platinum Taq DNA polimerase (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 90 µl. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura, em termociclador Eppendorf (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com o programa específico, que consistiu de 1 ciclo de denaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos a 94°C por 30 segundos

(denaturação); 45°C por 30 segundos (anelamento); 72°C por 30 segundos (extensão). Ao término dos ciclos de amplificação foi acrescentado um passo de extensão a 72°C por 5 minutos para finalização de alguma polimerização incompleta.

A cada 5 amostras, foi colocada uma amostra de água Milli-Q como controle negativo da reação e a cada protocolo foi colocado um controle positivo.

3.2.6.3. SEGUNDA PCR (“NESTED” PCR)

Para a segunda amplificação, foram adicionados 10 µl do produto da primeira amplificação a 90 µL de uma mistura contendo 10 µl de 10X PCR Buffer, 6 µl de dNTPs (10mM), 4 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada “primer” [1763 (5' GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA 3') e 2017 (5' ATG GGA TCC CTG GAT GCT GGG TCT TCC AAA 3')] na concentração de 25 pmol/ µl, 0,3 µl de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 90 µl. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura conforme descrito para a primeira PCR.

3.2.6.4. ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

Foi realizada conforme descrito anteriormente para o VHC.

Limite de detecção desta reação é de 300 cópias/ml.

3.2.7. METODOLOGIA DA PCR EM TEMPO REAL

Para esta reação o DNA foi extraído com o Kit QiAamp DNA mini kit (QIAGEN) a partir de 200 µl da amostra de soro, ressuspendido em 50 µl de volume final. A extração do DNA a partir do tecido hepático parafinado foi realizada conforme descrito anteriormente.

Para a realização da real time PCR foram adicionados 5 µl do DNA extraído a uma mistura contendo 25 µl do Master Mix 2X, 4,5 µl (20 µM) de cada primer (F e R), 1,5 µl (20µM) da sonda Taqman marcada com FAM, 5 µl do mix IPC 10X, 0,5µl de controle exógeno IPC DNA 50X e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 50 µl. Todos os reagentes utilizados foram da Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA. Para controlar a reação foi utilizado em conjunto o KIT IPC (TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents (VIC Probe), Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Uma amostra extraída da mesma forma e com carga viral conhecida foi usada em diluições seriadas como curva padrão. Os primers e sondas correspondentes ao gene S foram escolhidos utilizando o programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) baseados em um banco de dados de seqüências do VHB (Sitnik et al., 2004)(32).

A quantificação absoluta do DNA extraído foi realizada em um aparelho ABI PRISM 750 utilizando as condições universais de ciclagem que consistiram nos seguintes ciclos de variação de temperatura: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15

segundos e 60°C por 1 minuto. O limite de detecção desta reação é de 69 UI/ml.

3.2.8. BIOSSEGURANÇA

As amostras depois de coletadas foram acondicionadas em embalagens apropriadas para transporte de material biológico e transportadas em isopor para o Instituto Adolfo Lutz Central (IAL) e para o Laboratório do Dr. João Renato Rebello Pinho – Patologia Molecular do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo – SP.

Os experimentos foram executados no Laboratório de Biologia Molecular e de Hepatites, os quais possuem as condições de biossegurança necessárias para o trabalho com o material acima citado.

O descarte de material biológico e químico seguiu todas as normas de biossegurança já empregadas nos referidos laboratórios.

3.2.9. EXTRAÇÃO DO DNA EM TECIDO

Para a extração do DNA do material emblocado em parafina, utilizou-se uma secção de 10 micrômetros de tecido hepático.

Após seccionado, cada espécime foi colocado em um tubo de micro centrífuga. Para evitar riscos de contaminação, o micrótomo era limpo depois de cada amostra, primeiramente com xilol (retirada da parafina) e posteriormente com hipoclorito de sódio. Era trocada a navalha entre cada amostra e a extração era realizada em local separado da reação da PCR.

Antes da realização da extração do DNA a parafina contida nos cortes foi removida com xilol seguindo-se o procedimento descrito por *Coral et al., 2003* (40). Foi adicionado 1ml de xilol aquecido (95°C) aos cortes histológicos contidos nos tubo de micro centrífuga e procedeu-se com incubação a 37 °C por 30 minutos com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, todo o xilol foi retirado e o procedimento de adição de xilol aquecido, centrifugação e remoção do xilol foi repetido por mais duas vezes, porém sem realização da incubação a 37°C. Posteriormente foram realizadas duas lavagens com etanol para a retirada do solvente orgânico (Xilol), que consistiram na adição de 500 µl de etanol absoluto gelado com posterior centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos a 4°C e remoção do sobrenadante. Ao final da segunda lavagem, todo o etanol foi retirado e os resíduos evaporados pelo aquecimento do tubo em termobloco a 94°C por aproximadamente 2 minutos.

Após remoção da parafina o DNA viral foi extraído a partir do tecido hepático utilizando-se o Kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. Ao final da extração, o DNA foi eluido em um volume final de 50 µl e antes da realização da PCR para detecção do DNA do VHB realizou-se a amplificação do gene da beta actina, utilizando-se os “primers” descritos por Dakhama et al., (1996) (41), para servir de controle de qualidade do DNA extraído.

3.2.9.1. DETECÇÃO DO GENE DA BETA ACTINA

Para a amplificação do gene da beta actina, adicionou-se a 5 µl do DNA extraído uma mistura contendo 5 µl de 10X PCR Buffer, 1 µl de dNTPs (10mM), 2,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada “primer” [Actina A (5' TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG 3') e Actina B (5' CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT 3')] na concentração de 20 pmol/ µl, 0,5 µl de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 45 µl. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura, em termociclador Eppendorf (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com o programa específico, que consistiu de 1 ciclo de denaturação inicial a 94°C por 4 minutos, e 35 ciclos a 94°C por 1 minuto (denaturação); 55°C por 1 minuto (anelamento); 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão). Ao término dos ciclos de amplificação foi acrescentado um passo de extensão a 72°C por 8 minutos para finalização de alguma polimerização incompleta.

O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose corado com brometo de etídeo, conforme metodologia descrita anteriormente. A amplificação do gene da beta actina foi identificada pela observação de um fragmento de DNA de 154 pares de base. Na ausência deste fragmento o procedimento de extração foi repetido até obtenção de uma concentração de DNA que permitisse um resultado satisfatório.

3.2.9.2. PRIMEIRA PCR

Foram adicionados a 10 μ l do DNA extraído a partir do tecido parafinado de cada amostra, 90 μ L de uma mistura contendo 10 μ l de 10X PCR Buffer, 6 μ l de dNTPs (10mM), 4 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 1 μ l de cada “primer” [1778 (5' GAC GAA TTC CAT TGA CCC GTA TAA AGA ATT 3') e 2032 (5' CTG ACT ACT AAT TCC CTG GAT GCT GGG TCT 3')] na concentração de 25 pmol/ μ l, 0,3 μ l de Platinum Taq DNA polimerase (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 90 μ l. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura, em termociclador Eppendorf (Eppendorf MasterCycler® Gradiente, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), com o programa específico, que consistiu de 1 ciclo de denaturação inicial a 94°C por 2 minutos e 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (denaturação); 45°C por 30 segundos (anelamento); 72°C por 30 segundos (extensão). Ao término dos ciclos de amplificação foi acrescentado um passo de extensão a 72°C por 5 minutos para finalização de alguma polimerização incompleta.

A cada 5 amostras, foi colocada uma amostra de água Milli-Q como controle negativo da reação e a cada protocolo foi colocado um controle positivo.

3.2.9.3. SEGUNDA PCR (“NESTED” PCR)

Para a segunda amplificação, foram adicionados 10 µl do produto da primeira amplificação a 90 µl de uma mistura contendo 10 µl de 10X PCR Buffer, 6 µl de dNTPs (10mM), 4 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada “primer” [1763 (5' GCT TTG GGG CAT GGA CAT TGA CCC GTA TAA 3') e 2017 (5' ATG GGA TCC CTG GAT GCT GGG TCT TCC AAA 3')] na concentração de 25 pmol/ µl, 0,3 µl de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água Milli-Q estéril em quantidade suficiente para 90 µl. As amostras foram submetidas a diferentes ciclos de variação de temperatura conforme descrito para a primeira PCR.

3.2.9.4. ANÁLISE DO PRODUTO AMPLIFICADO

Foi realizada conforme descrito anteriormente para o VHC.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de análise estatística foram calculados utilizando-se o Software SPSS versão 12. As variáveis classificatórias foram apresentadas em tabelas de contingência contendo frequências absolutas e relativas (%). A associação com o grupo foi avaliada com o teste qui-quadrado ou teste da razão de verossimilhança ou teste exato de Fisher.

As variáveis quantitativas foram apresentadas em tabelas contendo média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos. As médias de idade foram comparadas com o teste t-Student. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram avaliadas com teste Mann-Whitney (42,43).

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

Na tabela 2 estão apresentados os dados dos pacientes em relação ao gênero e idade entre os grupos 1 e 2. Em relação ao gênero não houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,3570$). Porém, em relação à idade, foi de $53,7 \pm 8,6$ (50,7 - 56,7) anos e $59,5 \pm 5,7$ (56,7 - 62,6) anos, respectivamente para os pacientes dos grupos 1 e 2, diferença esta significativa ($p= 0,0029$).

Tabela 2 – Características gerais dos pacientes entre os grupos 1 e 2

		Grupo 1	Grupo 2	p
Sexo	Masculino	21	13	0,3570
	Feminino	12	4	
Idade		$53,7 \pm 8,6$	$59,5 \pm 5,7$	0,0029
		[50,7 - 56,7]	[56,4 – 62,6]	

Na tabela 3 estão apresentados os resultados dos índices prognósticos da cirrose hepática entre os grupos 1 e 2, segundo as classificações de Child-Tourcotte modificado por Pugh e MELD. A distribuição dos pacientes segundo a classificação de Child foi diferente entre os grupos estudados ($p=0,0090$). Porém, não houve diferença entre os grupos segundo a classificação de MELD ($p=0,3730$).

Tabela 3 – Classificação prognóstica da cirrose entre os grupos 1 e 2

		Grupo 1	Grupo 2	P
Child	A	0	4	0,0090
	B	17	7	
	C	16	6	
MELD		13,80 ± 5,03	12,56 ± 6,33	0,3730

Na tabela 4 estão apresentados os dados referentes à presença de marcadores sorológicos para o VHB entre os grupos 1 e 2. A análise dos resultados não demonstrou diferença entre os grupos, respectivamente, para o Anti-HBc total ($p=0,7280$) e Anti-HBs ($p=1,0000$).

Tabela 4 – Marcadores sorológicos para o VHB entre os grupos 1 e 2

	Grupo 1	Grupo 2	p
Anti-HBc total	7/33 (21,2%)	5/17 (29,4%)	0,7280
Anti-HBs	7/33 (21,2%)	3/17 (17,6%)	1,0000

Na tabela 5 estão apresentados os dados referentes às variáveis laboratoriais bioquímicas e da coagulação entre os grupos 1 e 2. A análise dos resultados demonstrou não haver diferenças estatísticas entre os grupos em relação às variáveis AST ($p=0,3895$), ALT ($p=0,3566$), GGT ($p=0,4222$), FA ($p=0,5863$), bilirrubina total ($p=0,4669$), albumina ($p=0,5315$), creatinina ($p=0,4455$), α fetoproteína ($p=0,2643$) e INR ($p=0,4521$).

Tabela 5 – Comparação das variáveis bioquímicas e da coagulação entre os grupos 1 e 2

Variável	Grupo 1	Grupo 2	p
AST(U/L)	71,9 ± 40,6	80,0 ± 67,2	0,3895
ALT(U/L)	64,2 ± 40,7	72,1 ± 61,8	0,3566
GGT(U/L)	157,9 ± 192,1	86,7 ± 96,9	0,4222
FA(U/L)	177,2 ± 162,6	140,8 ± 63,0	0,5863
Bilir Total(mg/dl)	2,6 ± 1,6	2,2 ± 1,5	0,4669
Albumina(g/dl)	3,0 ± 0,6	3,4 ± 0,7	0,5315
Cr(mg/dl)	1,2 ± 0,8	1,1 ± 0,3	0,4455
αfetoproteína(ng/ml)	23,0 ± 47,1	106,5 ± 328,7	0,2643
<i>INR</i>	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,4	0,4521

Na tabela 6 estão apresentados os dados referentes à estratificação da αfetoproteína segundo os resultados de 0 a 9 (p=0,3518), 10 a 99 (p=0,5106) e ≥ 100 ng/ml (p=0,5973) e entre todas as estratificações (p=0,4930). A análise dos resultados demonstrou não haver diferença estatística na estratificação dos resultados.

Tabela 6 – Comparação da α fetoproteína entre os grupos 1 e 2 de maneira estratificada

α fetoproteína(ng/ml)	Grupo 1	Grupo 2	P
0 – 9	23/33 (69,7%)	9/17 (52,9%)	0,4930
10 – 99	8/33 (24,2%)	6/17 (35,3%)	
≥ 100	2/33 (6%)	2/17 (11,7%)	

Na tabela 7 estão apresentados os dados referentes aos genótipos do VHC entre os grupos 1 e 2. A análise dos resultados mostrou não haver diferença estatística entre os grupos ($p=0,2010$).

Tabela 7 – Comparação dos genótipos do VHC entre os grupos 1 e 2

Genótipo	Grupo 1	Grupo 2	P
1	15	5	0,2010
Não 1	9	9	
Indeterminado	9	3	

Nas tabelas 8 e 9 estão apresentados os dados referentes à avaliação histopatológica da atividade inflamatória hepática em tecido não tumoral entre os grupos 1 e 2. Podemos observar que os resultados não foram diferentes estatisticamente entre os grupos, utilizando-se tanto o escore de Ishak et al. ($p=0,3817$) como a da classificação das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia, em relação às atividades portal ($p=0,2170$), periportal ($p=0,7550$) e parenquimatosa ($p=0,3170$).

Tabela 8 – Comparação da avaliação histológica em relação à atividade inflamatória hepática entre os grupos 1 e 2, segundo Ishak et al (28).

Grupo 1	Grupo 2	p
7,34 ± 2,82	7,46 ± 1,56	0,3817

Tabela 9 – Análise histopatológica segundo a Classificação SBP-SBH (29) entre os grupos 1 e 2

		Grupo 1	Grupo 2	p
Inflamação	1/2	11	2	0,2170
Portal	3/4	22	15	
Atividade	1/2	13	5	0,7550
Peri				
Portal	3/4	20	12	0,3170
Atividade	1/2	26	14	
Parenquimatosa				0,3170
	3/4	7	3	

Na tabela 10 está apresentada a distribuição dos pacientes do grupo 2 de acordo com o grau de diferenciação histológica segundo Edmondson e Steiner, observando-se predominância das formas mais iniciais da diferenciação celular.

Tabela 10 - Distribuição de carcinoma hepatocelular de acordo com grau de diferenciação histológica de Edmondson – Steiner do grupo 2

Grau de diferenciação	número de pacientes
0	0
I	2
II	11
III	4
IV	0
V	0
Total	17

Na tabela 11 estão apresentados os dados referentes ao tamanho (precoce/avançado) e quantidade de nódulos de carcinoma hepatocelular (CHC) do grupo 2. Observa-se a predominância de CHC precoce e nódulo único.

Tabela 11 – Avaliação do tamanho e quantidade de nódulos de CHC no grupo 2

Tamanho	Número de casos
< 3,0cm (precoce)	15
> 3,0cm (avançado)	2
Quantidade de nódulos de CHC	
1 nódulo	11
2 nódulos	5
3 nódulos	1

Na tabela 12 estão apresentados os dados referentes à determinação do DNA do VHB no soro dos pacientes dos grupos 1 e 2, não havendo diferenças estatísticas entre as técnicas utilizadas (PCR *core in house*, $p=1,0000$; PCR em tempo real, $p=0,3400$). A detecção do DNA do VHB ocorreu em apenas um caso do grupo 2 com a técnica da PCR em tempo real.

Tabela 12 – Comparação da detecção do DNA do VHB no soro entre as técnicas de PCR- core *in house* e em tempo real entre os grupos 1 e 2

DNA do VHB no soro	Grupo 1	Grupo 2	p
PCR-core <i>in house</i>	0/33	0/17	1,0000
PCR em tempo real	0/33	1/17	0,3400

No gráfico 1 está representada a curva padrão da PCR em tempo real do DNA do VHB no soro e a amostra positiva detectada.

Gráfico 1- Curva padrão da PCR em Tempo Real do DNA do VHB no soro e amostra positiva

O asterisco indica amostra positiva para PCR em tempo real do DNA do VHB no soro, na curva padrão.

No gráfico 2 estão representadas as curvas padrão e das amostras de soro dos pacientes dos grupos 1 e 2 do DNA do VHB pela técnica da PCR em tempo real.

Gráfico 2 - Curva padrão e amostra positiva da PCR em tempo real do DNA do VHB no soro

A seta indica amostra positiva para PCR em tempo real do DNA do VHB no soro do caso do grupo 2 (CHC e Anti-HBc total positivos).

Figura 1 - Gel de Beta Actina (extração do DNA do tecido parafinado)

A figura 1 mostra o gene da Beta Actina, comprovando a extração do DNA nos tecidos hepático tumoral e não tumoral. Todas as amostras foram positivas pela técnica utilizada.

Tabela 13 – Comparação da detecção do DNA do VHB no tecido hepático tumoral e não tumoral entre as técnicas de PCR - *core in house* e em tempo real entre os grupos 1 e 2

DNA do VHB no tecido hepático		Grupo 1	Grupo 2	p
PCR- <i>core in house</i>	Tecido tumoral		0/17	0,485
	Tecido não tumoral	0/33	0/17	
PCR em tempo real	Tecido tumoral		2/17	0,111
	Tecido não tumoral	0/33	2/17	

Na tabela 13, no grupo 2 (CH VHC + CHC) foram analisados tecido hepático tumoral (17 casos) e não tumoral (17 casos), pela técnica da PCR em tempo real, nos quais obtivemos 2 casos com resultados indeterminados no tecido tumoral e não tumoral. Não foi possível a detecção do DNA do VHB nestes casos, talvez devido à presença de inibidores na reação.

6. DISCUSSÃO

A infecção oculta pelo VHB geralmente é definida como a detecção do DNA do VHB no soro ou tecido hepático de pacientes HBsAg negativos (44). A infecção oculta pelo VHB foi primeiramente relatada no início de 1980 quando as técnicas de hibridização para detecção do DNA do VHB puderam ser avaliadas. Esses estudos mostravam que o DNA do VHB podia ser detectado em pacientes HBsAg negativos com carcinoma hepatocelular (CHC)(45). Estudos recentes usando técnicas mais sensíveis confirmaram essas observações. Entretanto, várias questões permanecem sem respostas. Qual é a prevalência da infecção oculta pelo VHB em pacientes com CHC? A infecção oculta pelo VHB é um achado ao acaso, um cofator ou único culpado no desenvolvimento do CHC? Qual é a base para a falência da detecção do HBsAg circulante?

Antes dessas questões serem respondidas, é necessário o estabelecimento de um critério diagnóstico padrão para a infecção oculta pelo VHB. Sabe-se que neste tipo de infecção, os níveis de DNA do VHB são muito baixos e é necessário o uso de técnicas sensíveis e específicas para a sua detecção. A frequência da detecção do DNA do VHB é mais alta em tecido hepático do que no soro e mais frequente em tecido hepático fresco do que embebido em parafina (13,23,24).

A prevalência da infecção oculta pelo VHB está normalmente relacionada à infecção pelo VHB conforme a sua ocorrência em diferentes

países. No Brasil essa prevalência é bastante variável, visto ser um país de grande extensão geográfica e diversidade cultural, étnica e socioeconômica. A maioria das regiões brasileiras apresenta endemicidade intermediária, variando de 1 a 2%, em estudos envolvendo população sadia e candidatos a doadores de sangue. Apenas indivíduos do Sudoeste do Paraná e algumas populações indígenas da região Norte do Brasil apresentam soropositividade de HBsAg em torno de 8%. Mesma importância é dada à presença de marcadores sorológicos de exposição ao VHB. Em estudo multicêntrico envolvendo seis países da América Latina, a prevalência de Anti-HBc total foi avaliada em quatro cidades brasileiras de diferentes regiões no ano de 2000: Manaus - 21%, Porto Alegre - 7,5%, Rio de Janeiro - 5,5% e Fortaleza - 1,2%. Constatou-se ainda que no Brasil há maior soroprevalência de VHB em indivíduos do sexo masculino que feminino e que o VHB é duas vezes mais freqüente em grupos socioeconômicos baixos (51,52,53). Então, a prevalência da infecção oculta pelo VHB é mais alta em pacientes soropositivos, particularmente nos que apresentam Anti-HBc isolados do que nos que apresentam Anti-HBs isolados ou nos soronegativos (ausência de marcadores para o VHB).

Estudos recentes relatam alta prevalência da infecção oculta do VHB entre os pacientes com hepatite crônica pelo VHC (20,47-50). Isto sugere que uma infecção pelo VHB “mascarada” pode interferir com os resultados clínicos da hepatite crônica pelo VHC e favorecer ou acelerar a evolução à cirrose. Cirrose é considerada o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Então, em adição a sua

possível propriedade oncogênica direta, a infecção oculta pelo VHB pode favorecer transformação neoplásica em pacientes infectados pelo VHC através de sua contribuição na evolução para cirrose (20).

Muitos estudos epidemiológicos e moleculares indicam que a infecção persistente pelo VHB pode ter um papel crítico no desenvolvimento do CHC em pacientes HBsAg negativos. Esta hipótese é sustentada pelos estudos mostrando que, ambos esquilos e marmotas, uma vez infectados pelo vírus da hepatite da marmota e pelo vírus da hepatite do esquilo, respectivamente, possuíam um risco aumentado para o CHC a despeito do aparente clareamento do vírus (54,55). Infecção oculta pelo VHB e sua potencial oncogenicidade são tradicionalmente considerados como uma consequência da capacidade do vírus se integrar ao genoma do hospedeiro, embora muitas observações mostrem que genomas episomais livres do VHB possam persistir nos hepatócitos durante a infecção oculta (56,57).

Diante de tantas perguntas sem respostas, foi nosso interesse estudar os pacientes do setor de Hepatologia do HCFMUSP, avaliando a ocorrência da infecção oculta pelo VHB em cirróticos pelo VHC, verificando se essa ocorrência é maior nos portadores de CHC e padronizar técnicas de detecção sensíveis e específicas para determinação dessa infecção.

6.1. OBJETIVOS

Este estudo da ocorrência da infecção oculta pelo VHB em pacientes cirróticos pelo VHC, teve como objetivo verificar se essa infecção aumenta o risco para o carcinoma hepatocelular, assim como também avaliar sua presença em vários compartimentos tais como: soro, tecido hepático tumoral e não tumoral.

Foi também nosso interesse a padronização de técnicas sensíveis e específicas da reação em cadeia da polimerase (PCR), através do desenvolvimento da PCR *in house* (38) e a utilização da PCR em tempo real (39). A utilização dessas técnicas contou com rigoroso controle de contaminação, evitando-se assim possíveis casos de falsos positivos e valorização da técnica utilizada.

O estudo dos genótipos de ambas infecções (VHC e VHB) na amostra estudada, adveio da curiosidade de estudarmos nossa população de pacientes e verificar se a frequência de determinado genótipo favoreceria o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular.

6.2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

6.2.1. CASUÍSTICA

Foram estudados, retrospectivamente, pacientes do nosso serviço portadores de cirrose hepática pelo VHC que haviam sido submetidos ao transplante hepático, no período de 1993 a 2004, que possuíssem soroteca previamente ao transplante e blocos de parafina do material explantado.

Foram analisados materiais de 50 pacientes, divididos em 2 grupos, destes 17 possuíam CHC. Todos apresentavam sorologia negativa para HBsAg, não portavam concomitância com doenças hepáticas metabólicas, auto-imunes e colestáticas. A seleção dos pacientes foi adequada, amostragem homogênea, reduzindo assim os fatores de interferência na análise dos dados. O número de pacientes foi significativo para o nosso meio, por se tratar de cirróticos pelo VHC submetidos ao transplante hepático, que tem um número reduzido no nosso meio (não é a causa mais comum de transplante hepático) e ao custo tanto financeiro como de mão-de-obra do trabalho.

A pesquisa de DNA do VHB em soro e tecido hepático tumoral e não tumoral é bastante dispendiosa por se tratar de técnicas altamente sensíveis e não padronizadas no país. A necessidade de material de consumo em número elevado, a existência de estrutura laboratorial que permita a separação e armazenamento das amostras, assim como os cortes de tecido

parafinado de maneira adequada a não permitir contaminação, entre outros fatores, são essenciais para o bom andamento do estudo.

Todas as informações colhidas e apresentadas neste trabalho foram coletadas por um único pesquisador para evitar a existência de viés. A distribuição de indivíduos em cada grupo, por ser um trabalho retrospectivo e de levantamento de dados, não dependeu da distribuição de sexo e idade, e sim da presença ou não de carcinoma hepatocelular, ou seja: grupo 1 – cirróticos pelo VHC sem CHC; grupo 2 – cirróticos pelo VHC com CHC. Porém todas essas informações e outras características, tais como: avaliação histopatológica [Classificação SBP-SBH (29), Ishak (28) e Edmondson e Steiner (30)], critérios prognósticos da cirrose [Child (26) e MELD (27)], tamanho e número de nódulos foram analisadas e condizentes com a literatura geral.

6.2.2. COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue armazenadas e os cortes de parafina de tecido hepático tumoral e não tumoral foram bem acondicionadas, respeitando-se as normas e procedimentos de biossegurança, evitando contaminação e realizada em laboratório apropriado para o estudo de biologia molecular.

Por se tratar de extração de DNA do VHB, que é mais estável, não houve interferência por parte da armazenagem e estocagem a - 20°C e por longo período, já que havia soro desde 1993. Todas as amostras tiveram o

DNA extraído, porém algumas não conseguimos extrair o RNA do VHC, pois esse é menos estável à temperatura e ao tempo de armazenagem.

6.2.3. MÉTODOS

As reações de PCR, seqüenciamento e genotipagem foram realizadas em ambiente apropriado, pela mesma equipe, apesar de ter sido utilizado dois laboratórios, reduzindo assim fatores que pudessem interferir com os resultados.

Nas amostras de soro foram realizadas a PCR do RNA do VHC, através da “nested” PCR e, das amostras positivas, realizadas a genotipagem pelo seqüenciamento da região 5’UTR, avaliando a prevalência dos genótipos na nossa amostragem. A extração do DNA do VHB foi realizada pela técnica de PCR *in house* através da região core do VHB (padrão-ouro) e se esta fosse positiva, seguiria para detecção de outra região (região S) e após isso, o seqüenciamento e genotipagem do VHB. Porém, isso não foi possível devido à negatividade em todas as amostras. O limite de detecção para essa técnica é de 300 cópias/ml.

Realizada também a técnica da PCR em tempo real, cujo limite de detecção é de 69 UI/ml. Nessa reação, apenas uma amostra foi positiva, apresentando um “cut off” baixo (conforme mostrado nos resultados), posteriormente foi repetida a reação, confirmando-se o resultado. Essa amostra se trata de um paciente com as seguintes características: sexo

masculino, 66 anos, Anti-HBc isolado, portador de CHC, 2 nódulos < 3,0 cm (precoce), genótipo 1b, Child 10 e MELD 7.

Após a realização das técnicas no soro, prosseguiu-se a extração do DNA do VHB em tecido parafinado, etapa de maior dificuldade devido à retirada da parafina. Como ainda não havia uma técnica bem padronizada, várias tentativas foram feitas até conseguirmos bons resultados utilizando-se a técnica descrita na tese de doutorado de *Gabriela Perdomo Coral*, 2003 (40), que utilizou o xilol em várias etapas para retirada por completo da parafina. Utilizamos como controle interno para a extração do DNA o gene da beta actina, após várias tentativas com outros controles, conseguindo assim a padronização da técnica de extração em tecidos.

6.3. RESULTADOS

Em relação ao sexo, os grupos 1 e 2 não diferiram estatisticamente (tabela 2), apesar da prevalência mundial do CHC ser mais comum no sexo masculino (58,59). Quando comparamos a idade entre os grupos 1 e 2, verificamos significância estatística com p de 0,0029, mostrando que o CHC ocorreu significativamente em pacientes cirróticos com idade mais avançada (58-60).

Nós avaliamos a distribuição dos paciente dos dois grupos em relação aos índices prognósticos da cirrose (tabela 3). Na classificação de Child-Tourcotte modificado por Pugh (26), observamos significância estatística entre os grupos 1 e 2 ($p = 0,0090$), com predominância dos pacientes com

CHC nas classes mais avançadas (Child B e C). O mesmo não foi observado em relação à classificação de MELD. A explicação para tal fato se baseia na própria classificação, já que não se leva em consideração parâmetros clínicos tais como ascite e encefalopatia, apresentando relevância apenas parâmetros laboratoriais tais como creatinina, bilirrubina e coagulação. Como na nossa casuística não havia associação com doença renal crônica e nem com doenças colestáticas, o MELD não apresentou diferenças entre os grupos.

A ocorrência de marcadores sorológicos para o VHB entre os dois grupos não apresentou diferenças. Em relação à presença de Anti-HBc total foram contabilizados 12 casos, sendo 7 no grupo 1 (21,2%) e 5 no grupo 2 (29,4%). Quanto ao marcador Anti-HBs, sua presença total foi 10 casos: 7 no grupo 1 (21,2%) e 3 no grupo 2 (17,6%). Quando comparamos os marcadores isoladamente, tivemos os seguintes resultados: 4 casos de anti-HBc total isolado no grupo 1 (12,1%) e 3 casos no grupo 2 (17,6%); 3 casos de Anti-HBs isolado no grupo 1 (9%) e 1 caso no grupo 2 (5,8%). Excetuando-se os casos de contato prévio com o VHB (imunização ativa), esperava-se um maior número de casos Anti-HBs positivos isolados devido imunização passiva (vacinação), já que se tornou procedimento padrão nos pacientes cirróticos sem marcadores sorológicos para o VHB.

Na nossa casuística não observamos diferenças entre variáveis laboratoriais tais como ALT, AST, GGT, entre outras, nos dois grupos estudados (tabela 5). A afetoproteína mostrou-se bastante variável entre os grupos, com valores baixos até valores superiores a 1000 ng/ml (tabela 6).

Nota-se valores elevados no grupo 1 (sem CHC) e valores baixos no grupo 2 (com CHC), verificando-se assim a baixa sensibilidade desta variável na nossa casuística, fato esse não muito diferente da literatura, onde a α fetoproteína como teste de “screening” para CHC está tendendo a ser abandonado, mostrando maior sensibilidade com “cut off “ acima de 200 ng/ml (61). A α fetoproteína está diretamente relacionada ao tamanho do tumor e diferenciação celular, CHC bem diferenciado tem menor expressão da α fetoproteína. Como tivemos predomínio de CHC precoce e nódulo único, esse marcador não teve tanta relevância.

A distribuição dos genótipos do VHC nos dois grupos não apresentou diferenças estatísticas. No grupo 1 houve uma tendência ao genótipo 1, enquanto que no grupo 2 (CHC), tendência ao genótipo não 1, predominando o genótipo 3a. Na população brasileira, há predomínio do genótipo 1, podendo corresponder até 70% dos casos, seguido pelo genótipo 3 (20% dos casos, em média), genótipo 2 (5 a 10% dos casos) e genótipo 4 em 1 a 5% dos casos (62).

A avaliação histopatológica usando as classificações de Ishak et al (28) e das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia (29), mostrou uniformidade entre os grupos, no que tange às graduações inflamatórias, não havendo portanto diferenças.

O carcinoma hepatocelular foi estudado no grupo 2, avaliando a sua distribuição de acordo com o grau de diferenciação histológica pela classificação de Edmonson e Steiner (30). Notamos que na nossa casuística, o grau II de E-S foi o mais comum, observando-se predominância

das formas mais iniciais de diferenciação celular. Em relação ao tamanho e número de nódulos tumorais, novamente as fases mais iniciais dominaram. Os CHCs precoces, ou seja, menores de 3,0 cm e os nódulos únicos foram os mais comuns no nosso estudo.

A análise da presença do DNA do VHB pela utilização de metodologia da biologia molecular, reação em cadeia de polimerase (PCR), avaliadas no soro e em tecido hepático tumoral e não tumoral através de duas técnicas de PCR: *in house* e em tempo real, teve de ser aprimorada e padronizada no nosso serviço, visto que seu uso no Brasil é inédito. Para as amostras de soro, na técnica *in house* não obtivemos positividade, cujo limite de detecção é de 300 cópias/ml. Então, algumas questões advêm: nossa população é realmente negativa para infecção oculta pelo VHB ou nossa técnica tem baixa sensibilidade? Utilizando outra técnica, PCR em tempo real, cujo limite de detecção é de 69 UI/ml, bem mais sensível, observamos positividade em apenas uma amostra. A reação foi repetida, confirmando o resultado. Então, no soro, a população estudada apresentou apenas uma ocorrência de infecção oculta pelo VHB, com carga baixa e tendendo a zero, diferindo assim, dos trabalhos da literatura, onde essa ocorrência é de intermediária a alta. Pollicino et al. (3) em 2004, encontrou DNA do VHB em 63,5% estudando tecido hepático tumoral e não tumoral em pacientes HBsAg negativos e com carcinoma hepatocelular e em 32,8% em pacientes portadores de hepatites crônicas sem CHC. Cacciola et al. (20) em 1999, avaliou 200 pacientes portadores de hepatite crônica pelo VHC, realizando PCR no soro e tecido hepático, encontrou positividade para o DNA do VHB

em 73/200 no tecido hepático e 45/200 no soro, todos eram HBsAg negativos. Shintani et al. (21) em 2000, avaliou a presença do DNA do VHB em tecido tumoral de pacientes portadores de VHC com CHC e HBsAg negativos, encontrando 50% de casos de infecção oculta pelo VHB por PCR e 12,5% através de “*Southern hybridization*”. Paterlini et al. (23) em 1995, detectou DNA do VHB em 6 de 13 pacientes HBsAg negativos com CHC, usando PCR. Vários trabalhos mostraram a presença de infecção oculta pelo VHB, tanto em cirróticos associados ou não ao VHC com ou sem CHC e em adultos saudáveis (63,64,65).

Souza et al. (66) em 2004, avaliou a presença de infecção oculta pelo VHB, em pacientes com hepatite C e hepatites não A-E no estado de São Paulo, utilizando a técnica de PCR no soro, com negatividade em todas as amostras. Kao et al. (67) em 2002, avaliou 210 pacientes VHC positivos e HBsAg negativos (destes: 50 com CHC; 110 com hepatite crônica pelo VHC submetidos ao tratamento combinado de interferon + ribavirina) com grupo controle de 100 adultos saudáveis HBsAg negativos, encontrando 14,8% do DNA do VHB nos pacientes com VHC e 15% nos adultos saudáveis. Não houve diferença na resposta terapêutica nos pacientes com e sem infecção oculta pelo VHB. Concluiu que em áreas onde o VHB é endêmico, a infecção oculta pelo VHB não demonstra significância clínica, isso talvez seja explicado pelo fato de que a maioria dos pacientes tivesse sido infectada por ocasião do nascimento e na infância, induzindo a uma imuno tolerância ao VHB. Ghisetti et al. (68) em 2004, avaliando a significância clínica da infecção oculta em pacientes HBsAg negativos submetidos ao transplante

hepático, encontrou DNA do VHB em 64% no fígado dos pacientes receptores e em nenhum dos doadores. Verificando que não houve aumento de episódios de rejeições agudas, coinfeção com vírus hepatotrópicos ou desenvolvimento de infecção B “de-novo”.

Avaliando os resultados obtidos com as técnicas de PCR *in house* e em tempo real no tecido hepático tumoral e não tumoral, observamos na nossa casuística dois casos de resultados indeterminados tanto no tecido hepático tumoral quanto no tecido não tumoral do grupo 2 (CH VHC + CHC) pela técnica em tempo real. Como comentado anteriormente nos resultados, esses valores indeterminados se deve talvez ao fato da metodologia de leitura não ser tão sensível ou algum controle externo ter causado efeito inibitório, impossibilitando assim, uma leitura confiável da reação.

Se isso se deve a baixa endemicidade da nossa população para o VHB, por ser o Brasil, com extensão geográfica continental, bastante variável, a nossa amostra não foge dos padrões da literatura (51,52,53). Talvez a técnica utilizada precise ser aprimorada, trabalhando com tecido hepático congelado, não mais com tecido parafinado (pois esse diminui a sensibilidade da reação) para assim otimizar a sensibilidade e especificidade da metodologia empregada. Pode haver muitos casos de falsos positivos na literatura, contaminação das amostras utilizadas. A técnica da PCR protegida seria uma reação interessante a ser desenvolvida, afastando assim possíveis vies nos resultados. Muitas questões ainda devem ser respondidas e trabalhos futuros hão de surgir na tentativa de esclarecimento real para tais perguntas.

7. CONCLUSÕES

- 7.1. A frequência da infecção oculta pelo VHB em nossos pacientes com cirrose hepática pelo VHC com ou sem carcinoma hepatocelular foi muito baixa, provavelmente devido à baixa prevalência da infecção pelo VHB na nossa população;
- 7.2. O estudo dos genótipos do VHB não permitiu analisar seu papel na carcinogênese, devido à sua baixa ocorrência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DiBisceglie AM. Malignant neoplasms of the liver. In: Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC eds. Schiff's Diseases of the liver. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999, 1281 – 1304. 2.
2. Alter MJ, Mast EE. The Epidemiology of viral hepatitis in the United States. Gastroenterology Clinical of North America 1994; 23: 437 – 455.
3. Pollicino T, Squandrito G, Cerenzia G et al. Hepatitis B virus (HBV) maintains its pro-oncogenic properties in case of occult HBV infection. Gastroenterology 2004; 126:102-110.
4. Tagger A, Donato F, Ribeiro ML et al. Case-control study on hepatitis C virus as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC study. Cancer 1999; 81: 695-9.
5. Ono-Nita SK, Moraes CR, Carrilho FJ, Pinho JRR, Da Silva LC et al. A prospective study of the prevalence of hepatitis B and C vírus co-infection among pacientes with chronic renal disease under hemodialysis. Journal of Hepatology 2004; 40:715-719.
6. Dai CY, Yu ML, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, et al. Influence of hepatitis C virus on the profiles of patients with chronic hepatitis B virus infection. Journal of Gastroenterology and Hepatology 2001; 16:636-640.

7. Jardi R, Rodriguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Galimany R, et al. Role of hepatitis B, C and D viruses in dual and triple infection: influence of viral genotypes and hepatitis B precore and basal core promoter mutations on viral replicative interference. *Hepatology* 2001; 34:404-410.
8. Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, et al. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *Journal of Biology and Chemistry* 2003; 278:591-607.
9. Shih CM, Chen CM, Chen SY, Lee YH. Modulation of the trans-suppression activity of hepatitis C virus core protein by phosphorylation. *Journal of Virology* 1995; 69:1160-1171.
10. Chan HLY, Lok ASF. Hepatitis B in adults. A clinical perspective: *Clinical Liver Disease* 1999; 3: 291 –307.
11. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *New England Journal of Medicine* 1997; 337: 1733 – 1745.
12. Grob P, Jilg W, Bornhak H et al. Serological pattern 'anti-HBc alone': report on a workshop. *Journal medical of Virology* 2000; 62: 450 – 455.
13. Brechot C, Thiers V, Krensdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Brechot P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: Clinically significant or purely 'occult'? *Hepatology* 2001; 34: 194 – 206.

14. Hoofnagle JH, DiBisceglie S. Serologic diagnosis of acute and chronic hepatitis. *Seminars of Liver Disease* 1991; 11: 73 – 83.
15. Hu K-Q, Vierling JM. Molecular diagnosis for the viral hepatitis infection. *Gastroenterology Clinical of North America* 1994; 23: 479 – 498.
16. Hoofnagle JH, Seef LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. The type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *New England Journal of Medicine* 1978; 298: 1379 – 1383.
17. Nalpas B, Berthelot P, Thiers V et al. Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *Journal of Hepatology* 1985; 1: 89 – 97.
18. Hu K-Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *Journal of Virology and Hepatology* 2002; 9: 243 – 257.
19. Lew Y-Y, Michalak TI. In vitro and In vivo Infectivity and Pathogenicity of the lymphoid cell-derived Woodchuck hepatitis virus. *Journal of Virology* 2001; 75: 1770 – 1782.
20. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *New England Journal of Medicine* 1999; 341: 22 – 26.

21. Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi, Kimura S, Koike K. The significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma of patients with hepatitis C. *Cancer*, 2000; 88: 2478 – 2486.
22. Lok ASF. Occult hepatitis B virus infection: diagnosis, implications and management? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 19:114-117.
23. Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 313-231.
24. Cacciola I, Pollicino T, Squandrito G et al. Quantification of intrahepatic hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with chronic HBV infection. *Hepatology* 2000; 31: 507-12.
25. Su, Q; Schröder, C. H.; Hofmann, W.J.; Otto, G.; Pichlmayr, R.; Bannasc, P. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998, 27: 1109 - 1120.
26. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. *Hepatology* 1987; 4:660-4.
27. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients

- undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31:864-71.
28. Ishak K et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* 1995; 22: 696-699.
29. Gayotto LCC e Comitê SBP-SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED* 2000; 19:137-40.
30. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: study of 100 cases among 48700 necropsies. *Cancer* 1954 7:462-503.
31. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JAJ, Contreras M, Aolysius S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by “nested” polymerases chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet* 335: 1419-1422, 1990.
32. Chomczynski P. and Sacchi N.. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159, 1987.
33. Sanger F, Nicklen S. and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(12): 5463-7, 1977.
34. Erwing B, Hillier L, Wendl MC and Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genetic Research* 8: 175-185, 1998.

35. Gordon D, Abajian C and Green P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genetic Research* 8: 195-202, 1998.
36. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997 Dec 15; 25(24): 4876-82.
37. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001; 17(12): 1244-5.
38. Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, Mishiro S. The pre-core/core promoter mutant (T1762a1764) of hepatitis B virus: clinical significance and a easy method for detection. *Journal of Genetic and Virology* 1995; 76:3159-64.
39. Sitnik R, Pinho JRR, Bertolini DA, Bernardini AP, Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatitis B vírus genotypes and precore and core mutants in brazilian patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004:2455-2460.
40. Coral GP. Polimorfismo genético da glutathione S-transferase μ 1 (GSTM1) nas lesões hepáticas secundárias à infecção pelo vírus da hepatite C antes e após o transplante hepático. Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.

41. Dakhama D, Macek V, Hogg JC, Hegele RG. Amplification of Human B-Actin Gene by the Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction: Implications for assessment of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded material. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1996;44:1205-1207.
42. Siegel S, Castellan NJ Jr. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill, 1998.
43. Armitage P, Berry G. *Statistical methods in medical research*. 3rd ed.. London: Blackwell Scientific, 1994.
44. Conjeevaram HS, Lok AS. Occult Hepatitis B virus infection: a hidden menace? *Hepatology* 2001; 204-206.
45. Brechot C, Degos F, Lugassy C, Thiers V, Zafrani S, Franco D, Bismuth H, Trepo C, Benhamou JP, Wands J, Isselbacher K, Tiollais P, Berthelot P. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *New England Journal of Medicine* 1985; 312:270-276.
46. Matsumoto C, Nishika K, Oguchi T, Mitsunaga S, Nojiri N, Tadokoro K, Juji T. Detection and quantitation of HBV DNA by semi-nested PCR in donated blood: comparison with HBV serological markers. *Journal of Virology and Methodology* 1997; 66:61-69.
47. Lizuka H, Ohmura K, Ishijima A, Satoh K, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Correlation between anti-

- HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HBsAg. *Vox Sang* 1992; 63:107-111.
48. Douglas DD, Taswell H, Rakela J, Rabe D. Absence of hepatitis B virus DNA detected by polymerase chain reaction in blood donors who are hepatitis B surface antigen negative and antibody to hepatitis B core antigen positive from a United States population with a low prevalence of hepatitis B serologic markers. *Transfusion* 1993; 33:212-216.
49. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific-a-determinant of hepatitis B virus surface antigen and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus lacking detectable HBsAg in serum. *Journal of Genetic and Virology* 2000; 81:1165-1174.
50. Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M, Hamamoto S, Satoh S, Tanaka S, Kushiya Y, Uchida Y, Iihara S, Akagi S, Watanabe M, Kinoshita Y. Serologically silent hepatitis B virus coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *Journal of Medicine and Virology* 1999; 58:201-207.
51. Clemens SA, Fonseca JC, Azevedo T et al. Hepatitis A and hepatitis B seroprevalence in 4 centers in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2000; 33:1-10.
52. Fonseca JCF. Aspectos peculiares das hepatites na Amazônia. Monografia, 1994.

53. Focaccia R. Etio-epidemiologia das hepatites virais tipo A e B. Contribuição ao estudo da prevalência e risco de contágio em funcionários hospitalares. Tese de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil, 1982.
54. Korba BE, Wells FV, Baldwin B, et al. Hepatocellular carcinoma in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks: presence of viral DNA in tumor tissue from chronic carriers and animals serologically recovered from acute infections. *Hepatology* 1989; 9:461-470.
55. Marion PL. Ground squirrel hepatitis vírus. In: McLachlan A, ed. *Molecular biology of hepatitis B vírus*. Boca Raton, Fla.:CRC Press, 1991:39-51.
56. Liang TJ, Blum HE, Wands JR. Characterization and biological properties of a hepatitis B vírus isolated from a patient without hepatitis B vírus serologic markers. *Hepatology* 1990; 12:204-212.
57. Zhang Y-Y, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. *Hepatology* 1993; 17:538-544.
58. Calvet X, Bruix J, Ginés P, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma in Spain. Five year's experience in 249 cases. *Journal of Hepatology* 1990; 10:311-317.

59. Carrilho FJ. Carcinoma hepatocelular e cirrose hepática. Estudo caso-controle de variáveis clínicas, bioquímicas, sorológicas e histológicas. São Paulo, 1993. 181p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
60. Bruix J, Sherman M. Management of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 2005; 42:1208-1236.
61. Trevisani F, D'Intino PE, et al. Serum α -fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *Journal of Hepatology* 2001; 34:570-575.
62. Campiotto S. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C (HCV) nas diferentes regiões brasileiras. 2002. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
63. Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Enomoto M, Koh N, Takeda T, Shiomi S, Hirohashi K, Kinoshita H, Otani S. Sequencing of human-viral DNA junctions in hepatocellular carcinoma from patients with HCV and occult HBV infection. *Journal of Medicine and Virology* 2003; 69:475-81.
64. Squadrito G, Orlando ME, Pollicino T, Raffa G, Restuccia T, Cacciola I, Di Marco V, Picciotto A, Colucci G, Craxi A, Raimondo G. Virological profiles in patients with chronic

hepatitis C and overt or occult HBV infection. *America Journal of Gastroenterology* 2002; 97:1518-23.

- 65.Ohba K, Kubo S, Tamori A, Tanaka H, Shuto T, Nishiguchi S, Kinoshita H. Previous or occult hepatitis B vírus infection in hepatitis B surface antigen negative and anti-hepatitis C negative patients with hepatocellular carcinoma. *Surgery Today* 2004; 34:842-8.
- 66.Souza LO, Pinho JRR, Carrilho FJ, da Silva LC. Absence of hepatitis B vírus DNA in patients with hepatitis C and non-A-E hepatitis in the State of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Medicine and Biology Research* 2004; 37:1665-8.
- 67.Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Occult hepatitis B vírus infection and clinical outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical and Microbiology* 2002; 40:4068-71.
- 68.Ghisetti V, Marzano A, Zamboni F, Barbui A, Franchello A, Gaia S, Marchiaro G, Salizzoni M, Rizzetto M. Occult hepatitis B vírus infection in HBsAg negative patients undergoing liver transplantation: clinical significance. *Liver Transplantation* 2004; 10:356-62.

9. ANEXOS

Anexo 1- Características gerais dos pacientes e α -fetoproteína dos grupos 1 e 2.

GRUPO 1 CH -VHC	CASO	IDADE (anos)	SEXO	α -fetoproteína (ng/ml)
	1	43	M	4,1
	2	74	F	10,8
	3	62	M	4,6
	4	42	M	8,2
	5	54	M	5,1
	6	48	M	4,4
	7	57	M	5,3
	8	53	M	16,9
	9	54	F	8,9
	10	52	M	7,3
	11	54	F	19
	12	41	F	211,8
	13	74	F	17,4
	14	69	F	8,2
	15	44	M	3,5
	16	56	M	5,6
	17	60	F	8,1
	18	58	M	9,4
	19	55	M	5,7
	20	64	M	9,5
	21	53	M	1,2
	22	44	M	11,7
	23	44	F	5,3
	24	61	M	4,1
	25	49	M	161,2
	26	60	F	9,6
	27	55	M	1,7
	28	42	M	2
	29	48	F	3,2
	30	51	F	41,1
	31	53	M	51,9
	32	53	F	22,9
	33	52	M	3,4
GRUPO 2 CH - VHC + CHC	CASO	IDADE	SEXO	α -fetoproteína (ng/ml)
	1	57	M	7,1
	2	57	M	7,4
	3	54	M	70,4
	4	59	F	3,7
	5	69	F	7,3
	6	61	F	23,4
	7	58	M	3,3
	8	50	M	46
	9	68	M	20
	10	54	M	11,5
	11	66	F	8,7
	12	59	M	138
	13	64	M	8
	14	58	M	1199
	15	52	M	1,4
	16	66	M	4,4
	17	53	M	20,1

Anexo 2 – Dados laboratoriais bioquímicos, clínicos e classificação prognostica da cirrose hepática (Child e MELD) dos grupos 1 e 2.

GRUPO 1 CH -VHC	CASO	AST	ALT	GGT	FA	Cr	BT	INR	Alb	Ascite	Encef	child	MELD
	1	38	109	58	44	1,0	2,1	1,3	3,7	3	1	B8	12
	2	28	21			1,0	3,0	1,0	3,9	3	3	C10	10,8
	3	52	95	153	177	1,4	1,5	1,1	2,9	3	1	B8	11,9
	4	74	54	26	136	1,0	2,4	1,1	3,2	3	1	B9	11,1
	5	13	11	9	286	0,7	1,8	1,1	3,3	1	3	B8	6,7
	6	160	85	135	206	1,1	4,2	1,2	4,1	3	1	B9	14,9
	7	26	19	19	136	2,2	3,3	1,7	3,2	2	2	C10	24,1
	8	48	35	38	198	1,2	2,2	1,2	2,4	3	3	C12	12,9
	9	75	159			1,1	3,8	1,1	4,9	3	1	C11	13,5
	10	85	26	32	122	1,0	4,2	1,9	2,7	3	3	C14	19,2
	11	56	40	148	151	1,0	1,3	1,6	2,3	3	3	C11	12,5
	12	106	63	703	126	0,8	1,1	1,4	2,2	2	1	B8	8,7
	13	94	91	102	111	1,1	1,7	1,8	2,3	3	1	C10	16,2
	14	69	44	356	212	1,2	1,8	1,2	4,0	3	1	B7	12,7
	15	130	38	358	245	0,7	3,0	1,2	2,8	3	2	C10	9,6
	16	32	7	106	155	0,9	2,1	1,6	2,9	3	1	B9	13,3
	17	70	117	107	185	0,8	1,1	1,6	2,4	3	1	B9	9,8
	18	74	77	116	297	1,3	2,9	1,0	3,0	3	1	B9	13
	19	56	72	517	940	0,7	2,3	1,0	2,7	3	1	C10	5,9
	20	103	188	20	70	0,9	0,8	1,4	3,1	3	1	B8	8,3
	21	88	60			1,3	2,3	1,4	2,8	2	3	C10	15,7
	22	48	34	49	191	0,8	3,7	1,9	2,9	2	3	C12	16,3
	23	18	13			0,8	1,2	1,2	3,5	3	1	B7	7,3
	24	45	77	285	162	5,2	1,0	1,0	4,3	3	1	B7	21,8
	25	155	120	66	285	0,7	2,0	1,7	3,0	1	1	B8	11,4
	26	88	68	28	62	0,9	4,1	1,7	3,4	2	1	B9	16,8
	27	42	26	16	100	1,4	2,4	1,8	2,1	1	2	C10	19,8
	28	105	83	23	114	1,4	4,3	2,0	3,5	3	2	C11	22,8
	29	30	31	44	96	0,5	2,5	1,8	3,0	3	1	C10	10
	30	155	119	426	119	0,7	1,7	1,2	3,4	3	2	B9	7,2
	31	34	51	590	114	1,3	8,3	1,3	2,6	2	2	C11	20,1
	32	68	56	17	57	0,8	5	2,4	2,5	3	1	C12	19,9
	33	29	26	34	43	0,9	1,0	1,7	3,0	1	3	B8	11,2
GRUPO 2 CH- VHC+CHC	CASO	AST	ALT	GGT	FA	Cr	BT	INR	Alb	Ascite	Encef	Child	MELD
	1	74	37			1,0	3,9	1,2	3,4	1	2	B9	13,2
	2	71	137	190	64	1,2	2,0	1,1	4,1	3	2	B9	11,9
	3	37	54	42	90	1,5	5,7	1,1	4,6	3	1	B9	18,3
	4	236	227	89	141	0,9	1,3	1,3	4,3	2	1	A6	9,1
	5	20	16	14	150	1,6	0,3	1,0	3,6	2	1	A6	6,6
	6	35	26	11	120	1,1	1,1	1,4	3,1	3	2	B6	11,1
	7	105	61	45	89	0,8	2,9	1,3	2,5	3	3	C12	11,6
	8	15	14			1,0	9,4	1,3	2,3	3	1	C11	18,0
	9	93	66	65	210	0,9	1,7	1,1	3,5	1	1	A5	8,4
	10	26	20	51	161	0,7	1,7	1,3	3,0	3	1	B8	7,9
	11	19	45	112	295	0,9	1,3	0,9	3,5	2	1	A6	5,6
	12	20	18			1,1	1,8	1,5	2,3	3	1	B9	14,4
	13	193	147	364	178	1,1	0,8	1,2	3,3	3	2	B9	8,5
	14	37	31	96	79	1,2	2,6	1,7	2,8	3	2	C11	17,7
	15	75	69	21	100	1,9	4,7	2,3	3,1	3	1	C11	27,5
	16	14	14			0,8	0,7	1,4	2,7	3	2	C10	7,0
	17	93	39	27	154	1	2,5	2,3	2,3	3	1	C12	19,1

Anexo 3 – Dados da sorologia e biologia molecular dos grupos 1 e 2.

GRUPO 1 CH -VHC	SOROLOGIA					BIOLOGIA MOLECULAR			
	CASO	HBsAg	Anti-HBc total	Anti-HBs	Anti-HCV	GENOTIPO VHC	PCR-VHC QUALI	PCR HBV CORE	PCR HBV REAL TIME
	1	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	2	neg	pos	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	3	neg	pos	neg	pos	1a	pos	neg	neg
	4	neg	neg	pos	pos	1a	pos	neg	neg
	5	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	6	neg	neg	neg	pos	1a	pos	neg	neg
	7	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	8	neg	neg	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	9	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	10	neg	neg	neg	pos	1a	pos	neg	Neg
	11	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	12	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	13	neg	pos	pos	pos	1a	pos	neg	neg
	14	neg	neg	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	15	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	16	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	17	neg	pos	pos	pos	3a	pos	neg	neg
	18	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	19	neg	neg	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	20	neg	pos	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	21	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	22	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	23	neg	neg	neg	pos	1a	pos	neg	neg
	24	neg	pos	pos	pos	1b	pos	neg	neg
	25	neg	neg	pos	pos	1b	pos	neg	neg
	26	neg	neg	pos	pos	3a	pos	neg	neg
	27	neg	pos	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	28	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	29	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	30	neg	neg	neg	pos	1a	pos	neg	neg
	31	neg	neg	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	32	neg	neg	pos	pos	1a	pos	neg	neg
	33	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
GRUPO 2 CH-VHC+CHC	SOROLOGIA					BIOLOGIA MOLECULAR			
	CASO	HBsAg	Anti-HBc total	Anti-HBs	Anti-HCV	GENOTIPO VHC	PCR-VHC QUALI	PCR HBV CORE	PCR HBV REAL TIME
	1	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	2	neg	pos	pos	pos	3a	pos	neg	neg
	3	neg	pos	pos	pos	3a	pos	neg	neg
	4	neg	neg	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	5	neg	neg	pos	pos	2b	pos	neg	neg
	6	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	7	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	8	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg
	9	neg	pos	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	10	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	11	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	12	neg	neg	neg	pos	1a	pos	neg	neg
	13	neg	pos	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	14	neg	neg	neg	pos	1b	pos	neg	neg
	15	neg	neg	neg	pos	3a	pos	neg	neg
	16	neg	pos	neg	pos	1b	pos	neg	pos
	17	neg	neg	neg	pos		pos	neg	neg

Anexo 4 – Dados da avaliação histopatológica segundo a classificações SBP-SBH e o escore de Ishak, grau de diferenciação histológica de Edmondson e Steiner, tamanho e número dos nódulos (CHC).

GRUPO 1 CH -VHC	CASO	Classificação SBP - SBH				ISHAK Escore		Classificação o Edmondson- Steiner	Tamanho e nº dos Nódulos HCC
		ALT EXTR	AP	APP	A PARE				
	1	4	3	3	2	6	8		
	2	3A(4)	3	2	2	6	2		
	3	4	3	3	2	6	6		
	4	4	2	1	1	6	6		
	5	4	2	2	2	6	5		
	6	4	3	3	2	6	5		
	7	4	2	2	2	6	9		
	8	4	2	2	1	6	7		
	9	4	3	3	3	6	6		
	10	4	3	3	3	6	7		
	11	4	2	2	2	6	9		
	12	4	3	2	2	6	8		
	13	4	3	3	3	6	5		
	14	4	2	2	2	6	15		
	15	4	3	2	2	6	7		
	16	4	3	4	3	6	7		
	17	4	3	3	2	6	8		
	18	4	3	3	2	6	6		
	19	4	3	3	2	6	8		
	20	4	3	2	2	6	5		
	21	4	3	3	2	6	11		
	22	4	2	3	1	6	6		
	23	4	3	3	3	6	7		
	24	4	3	3	2	6	14		
	26	4	4	4	4	6	7		
	27	4	2	2	1	6	6		
	28	4	3	3	2	6	4		
	29	4	2	3	2	6	7		
	30	4	2	3	2	6	5		
	31	4	3	3	1	6	15		
	32	4	2	2	2	6	6		
	33	4	3	3	4	6	6		
	34	4	3	2	1	6	6		
GRUPO 2 CH- VHC+CH C	CASO	Classificação SBP - SBH				Ishak score		Classificação o Edmondson- Steiner	Tamanho e nº dos Nódulos HCC
		ALT EXTR	AP	APP	A PARE	Estágio/	Grau		
	1	4	2	2	2	6	5	G III	2,5cm 1N
	2	4	4	4	3	6	8	G II	1,0cm 1N
	3	4	3	3	2	6	8	GII	2,5 e 1,5cm 2N
	4	4	3	3	2	6	8	GII	1,6cm 1N
	5	4	3	2	2	6	7	GII	1,0cm 1N
	6	4	3	3	3	6	10	GI	2,5cm 1N
	7	4	3	3	2	6	8	GII	1,0 e 1,3cm 2N
	8	4	3	2	2	6	6	GIII	1,5cm 1N
	9	4	3	2	2	6	5	GIII	3,0 e 2,0cm 2N
	10	4	3	3	2	6	6	GII	1,6cm 1N
	11	4	3	3	2	6	7	GIII	4,5cm 1N
	12	4	3	3	2	6	7	GII	1,3cm 1N
	13	4	3	3	3	6	10	GIII	1,8 e 1,3cm 2N
	14	4	3	3	2	6	8	GII	1,8, 1,0 e 0,6cm 3N
	15	4	2	2	1	6	5	GII	1,1cm 1N
	16	4	3	3	2	6	8	GII	1,6 e 1,7cm 2N
	17	4	3	3	2	6	7	G II	1,0 cm 1 N

Anexo 5 - Dados de sorologia e biologia molecular entre os grupos 1 e 2 no tecido hepático tumoral e não tumoral.

GRUPO 1 CH -VHC	CASO	HBsAg	Anti-HBc total	Anti-HBs	GENOTIPO VHC	PCR HBV CORE Parênquim	Tumor	PCR HBV REAL TIME Parênq	Tumor
	1	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	2	neg	pos	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	3	neg	pos	neg	1a	neg	neg	neg	neg
	4	neg	neg	pos	1a	neg	neg	neg	neg
	5	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	6	neg	neg	neg	1a	neg	neg	neg	neg
	7	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	8	neg	neg	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	9	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	10	neg	neg	neg	1a	neg	neg	Neg	Neg
	11	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	12	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	13	neg	pos	pos	1a	neg	neg	neg	neg
	14	neg	neg	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	15	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	16	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	17	neg	pos	pos	3a	neg	neg	neg	neg
	18	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	19	neg	neg	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	20	neg	pos	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	21	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	22	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	23	neg	neg	neg	1a	neg	neg	neg	neg
	24	neg	pos	pos	1b	neg	neg	neg	neg
	25	neg	neg	pos	1b	neg	neg	neg	neg
	26	neg	neg	pos	3a	neg	neg	neg	neg
	27	neg	pos	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	28	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	29	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	30	neg	neg	neg	1a	neg	neg	neg	neg
	31	neg	neg	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	32	neg	neg	pos	1a	neg	neg	neg	neg
	33	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
GRUPO 2 CH- VHC+CHC	Sorologia				BIOLOGIA MOLECULAR				
	CASO	HBsAg	Anti-HBc total	Anti-HBs	GENOTIPO VHC	PCR HBV CORE Parênquim	Tumor	PCR HBV REAL TIME Parênq	Tumor
	1	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	Neg
	2	neg	pos	pos	3a	neg	neg	neg	neg
	3	neg	pos	pos	3a	neg	neg	neg	indeter
	4	neg	neg	neg	1b	neg	neg	indeter	neg
	5	neg	neg	pos	2b	neg	neg	neg	neg
	6	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	7	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	indeter
	8	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg
	9	neg	pos	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	10	neg	neg	neg	3a	neg	neg	indeter	neg
	11	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	12	neg	neg	neg	1a	neg	neg	neg	neg
	13	neg	pos	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	14	neg	neg	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	15	neg	neg	neg	3a	neg	neg	neg	neg
	16	neg	pos	neg	1b	neg	neg	neg	neg
	17	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg