PATRICIA MOMOYO YOSHIMURA ZITELLI

Estudo sobre a influência do vírus da hepatite E na infecção crônica pelo vírus da hepatite C em pacientes virgens de tratamento antiviral

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Dr. Mário Guimarães Pessoa

São Paulo

2019

PATRICIA MOMOYO YOSHIMURA ZITELLI

Estudo sobre a influência do vírus da hepatite E na infecção crônica pelo vírus da hepatite C em pacientes virgens de tratamento antiviral

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Dr. Mário Guimarães Pessoa

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zitelli, Patricia Momoyo Yoshimura
Estudo sobre a influência do vírus da hepatite E na infecção crônica pelo vírus da hepatite C em pacientes virgens de tratamento antiviral / Patricia Momoyo Yoshimura Zitelli. -- São Paulo, 2019.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Mário Guimarães Pessôa.

Descritores: 1.Hepatite E 2.Hepatite C crônica 3.Diabetes Mellitus tipo 2 4.Cirrose hepática 5.Taxa de sobrevida 6.Histopatologia

USP/FM/DBD-351/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, **Masahiro Yoshimura e Masae U. Yoshimura**, que me ensinaram a importância do respeito ao próximo e a dedicação no dia-a-dia. Amor oculto, com atitudes incomparáveis.

Ao meu marido **Leandro Zitelli**, indescritível a imensa relevância em minha vida. Caminhos que traçamos juntos e as grandes conquistas alcançadas. Muita gratidão e amor.

Aos meus filhos, **Gianluca Hiroki e Ettore Kenzo**, que são a minha razão de vida e meus maiores tesouros. Obrigada por serem a minha maior alegria.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Àqueles que se doaram à pesquisa, sem se incomodarem, simplesmente para ajudar e compartilhar da evolução do estudo clínico. Estes são os pacientes que disponibilizaram o seu precioso tempo e colaboraram pela maturação do meu aprendizado. Agradecimento imenso a todos os pacientes, participantes desta pesquisa.

Muitas pessoas me incentivaram e me conduziram no processo de elaboração e desenvolvimento deste estudo clínico. Dedico esses agradecimentos a todos que contribuíram nesta etapa tão importante para mim.

Ao meu orientador Dr. Mário Guimarães Pessoa, pelo aceite e pelas suas orientações, ao desmedido incentivo na construção e as suas contribuições desse trabalho. Proporcionando-me imensa oportunidade para o meu crescimento e amadurecimento dentro da pesquisa clínica. Além de ser um símbolo educador e grande influenciador na minha vida acadêmica.

À comissão do Programa de Pós-graduação em Ciências em Gastroenterologia, representada pela Profª. Dra. Claudia Oliveira, Prof. Dr. José Jukemura e pela Vilma Libério por viabilizar e criar estratégias para o melhor desenvolvimento dos trabalhos acadêmicos.

Ao Prof. Dr. Daniel Mazo, Dra. Alice Song e Prof. Dr. Eleazar Chaib, que fizeram parte da minha banca de qualificação, agradeço pelos comentários e indicações valiosas com compartilhamento de amplo conhecimento.

Ao Laboratório de Investigação Médica – LIM 7, representado pelo Prof. Dr. João Renato Pinho, pela a pesquisadora Dra. Michele Gomes-Gouvêa e pela a Ariana Ferreira que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo, compartilhando todos os seus conhecimentos e as suas técnicas competentes, associada ao zelo e a eficiência no andamento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Julio Singer que analisou todos os dados minuciosamente, com grande relevância para aprimorar os conhecimentos e mensurar a grandeza da importância dos dados na pesquisa científica. Por também ensinar os valores e compartilhar os aprendizados em sua experiência de vida.

Ao Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves e Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa do Departamento de Patologia pela sua valiosa contribuição neste estudo, que me permitiu aquilatar uma série de conhecimento na histologia hepática.

Ao Prof. Dr. Alberto Queiroz Farias, pelo imenso conhecimento científico e acadêmico, um grande pesquisador que me ensina e compartilha todos os seus pensamentos e argumentos, o que fortalece o meu aprendizado no mundo científico.

À Enf. Danusa de Souza Ramos, por ter aberto o meu caminho na pesquisa clínica, incentivando-me em todos os momentos, com o seu conhecimento, orientações, sugestões e ideias para crescer como coordenadora de pesquisa clínica. Orgulho em poder te mostrar a discípula que você criou.

Agradeço imensamente aos membros de um grupo que tenho muito prazer em trabalhar Dra. Reneé Mignolo, Dra. Betânia Rocha, Dr. Evandro de Oliveira, Dr. Roque Gabriel Rezende, Dra. Débora Terrabuio, Dr. Ricardo Miyake, Psicóloga Mary Ellen, e tantos outros, que proporcionaram essa evolução e, ao longo da minha trajetória, contribuíram em todos os sentidos para o enriquecimento do meu aprendizado.

A toda equipe do ambulatório de transplante de fígado que me ensinou a importância do cuidado do paciente, o respeito e o trabalho em equipe para a melhoria do serviço.

Agradeço também aos funcionários administrativos do Departamento da Gastroenterologia e Hepatologia Clínica, representada pela Claudia Arruda, Fátima Gomes, Sonia Lazzarini e Sergio Watanabe, todos sempre dispostos a oferecer estrutura adequada ou soluções apropriadas para execução desse trabalho.

Ao Departamento de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a oportunidade de realizar esse trabalho. Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho e Prof. Dr. Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque por ajudarem a viabilizar e incentivar a pesquisa multidisciplinar.

Epígrafe

“O bambu que se dobra é mais forte que o carvalho que resiste.”

Provérbio japonês

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, et al. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Vírus da Hepatite E 1
1.2 Epidemiologia mundial 2
1.3 Epidemiologia no Brasil 5
1.4 Marcadores do vírus da hepatite E 7
1.5 Sintomatologia 8
1.6 Tratamento para HEV 10
1.7 Hepatite C crônica e coinfecções virais 11

2. JUSTIFICATIVA 14

3. OBJETIVOS 14

3.1 Primário 14
3.2 Secundários 14

4. MÉTODOS 15

4.1 Desenho do estudo 15
4.2 Caracterização da amostra 15
4.3 Procedimentos realizados no estudo 16
4.3.1 Coleta e análise para o vírus da Hepatite E 17
4.3.1.1 Pesquisa dos marcadores sorológicos 17
4.3.1.2 Diagnóstico por técnicas de biologia molecular 17
4.3.1.3 Extração de RNA 17
4.3.1.4 Detecção do HEV RNA 18
4.3.1.5 PCR quantitativo em tempo real 18
4.3.1.6 Sequenciamento 18
4.3.1.7 Análise das sequências 19
4.3.1.8 PCR quantitativo com o kit Eurobio® 19
4.3.2 Avaliação Histológica 20
4.3.4 Métodos não invasivos para análise de fibrose hepática 23
4.4 Análise estatística 24
4.5 Aspectos Éticos 25

5 RESULTADOS 26

5.1 Casuística da população geral 26
5.2 Perfil sorológico do vírus da Hepatite E 28
5.2 Perfil demográfico 29
5.3 Dados clínicos e laboratoriais 32
5.4 Análise da histologia hepática 34

5.4 Análise do seguimento dos pacientes 36
5.4.1 Seguimento dos pacientes com anti-HEV IgM.....36
5.4.2 Tratamento da hepatite C crônica.....36
5.4.3 Fibrose e curva de sobrevida.....38
6. DISCUSSÕES.....41
6.1 Aspectos gerais 41
6.2 Diabetes Mellitus e HEV 43
6.3 HEV e complicações da doença hepática.....44
6.4 HEV e histologia hepática 46
6.5 Tratamento.....47
7 CONCLUSÕES 50
REFERÊNCIAS.....51
ANEXOS 56

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagnóstico do HEV 8

Figura 2. Infecção HEV. Aparecimento do RNA do vírus da hepatite E, período de incubação e anticorpos durante a infecção por HEV. IgG. imunoglobulina G; IgM. imunoglobulina M 9

Figura 3. Tratamento do HEV em pacientes transplantados de fígado 11

Figura 4. Concordância entre medidas de elastografia em unidades kPa e graus de fibrose hepática. (A) Vírus C; (B) Co-infecção virus C e HIV; (C) Vírus C pós transplante; (D) Vírus B; (E) Doença hepática colestática; (F) Cirrose alcoólica; (G) Doença gordurosa não-alcoólica. Fonte: de Lédinghen et. al, 2010. 23

Figura 5 . Diagrama de fluxo de inclusão dos pacientes 26

Figura 6. Gráfico com a distribuição da frequência pelos marcadores para o vírus da Hepatite E..... 28

Figura 7. Diagrama de fluxo da análise histológica 34

Figura 8. Curva de sobrevivência de pacientes HEV positivos e negativos com desfecho óbito 39

Figura 9. Curva de sobrevivência de pacientes HEV positivos e negativos com desfecho óbito e transplante 40

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS DA INFECÇÃO PELO HEV..... 2

TABELA 2 – POSITIVIDADE DE HEPATITE E EM DOADORES DE SANGUE..... 3

TABELA 3 – PREVALÊNCIA DO ANTI-HEV IGG EM POPULAÇÃO GERAL EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL 6

TABELA 4 – PREVALÊNCIA DO ANTI-HEV IGG EM POPULAÇÃO DE RISCO EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL 7

PARA ANALISAR MINUCIOSAMENTE OS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS, ALÉM DA FIBROSE HEPÁTICA, FORAM ANALISADAS OUTRAS CARACTERÍSTICAS COMO SISTEMA DE *SCORE* HISTOLÓGICO PARA ESTEATOHEPATITE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA (EHNA) NA TABELA 6, AS ALTERAÇÕES COLESTÁTICAS COM AVALIAÇÃO DE REAÇÃO DUCTULAR E ESTASE BILIAR, A PRESENÇA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS LOBULARES E GRAU DE SIDEROSE EM HEPATÓCITOS E CÉLULAS DE KUPPFER. 20

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DAS HEPATITES VIRAIS DE ACORDO COM A SBH/SBP. 21

TABELA 6 - SISTEMA DE SCORE HISTOLÓGICO PARA A CLASSIFICAÇÃO DE EHNA (ESTEATOHEPATITE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA).....22

TABELA7. FREQUÊNCIA RELATIVA DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO PORTADORES DO VÍRUS DA HEPATITE C.....27

TABELA 8 - FREQUÊNCIA DE PACIENTES COM DIFERENTES COMBINAÇÕES DOS RESULTADOS DE TESTES PARA HEV 29

TABELA 9. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA COMPARAÇÃO DOS PACIENTES HEV NEGATIVOS COM OS PACIENTES HEV POSITIVOS. 30

TABELA 10. VALORES P PARA O EFEITO DE DIFERENTES VARIÁVEIS EM MODELOS DE REGRESSÃO LOGÍSTICA 30

TABELA 11. PERFIL DO VÍRUS DA HEPATITE C ENTRE OS GRUPOS MONOINFECTADOS E COINFECTADOS PELO HEV. 31

TABELA 12. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DE PACIENTES HEV POSITIVOS COM OS PACIENTES HEV NEGATIVOS RELATIVAMENTE ÀS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS CONTÍNUAS. ...32

TABELA 13. COMPARAÇÃO DE PACIENTES HEV POSITIVOS COM OS PACIENTES HEV NEGATIVOS RELATIVAMENTE AS COMPLICAÇÕES DA DOENÇA DO FÍGADO. 33

TABELA 14. COMPARAÇÃO DE CHILD-PUGH PARA OS CIRRÓTICOS. 34

TABELA 15 – ANÁLISE HISTOLÓGICA ENTRE GRUPOS CASO-CONTROLES DE COINFECTADO HCV E HEV E MONOINFECTADOS. 35

TABELA 16. CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM ANTI-HEV IGM POSITIVO.....36

TABELA 17. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE USO DE RIBAVIRINA 37

TABELA 18: FREQUÊNCIA DE ÓBITOS PARA PACIENTES QUE TOMARAM RIBAVIRINA.....37

TABELA 19. FREQUÊNCIA DE ÓBITOS OU TRANSPLANTE DE FÍGADO PARA PACIENTES QUE TOMARAM RIBAVIRINA 37

TABELA 20. MEDIDAS RESUMO PARA A VARIAÇÃO DAS MEDIDAS DO FIBROSCAN (INICIAL - ATUAL) 38

TABELA 21: MEDIDAS RESUMO PARA O TEMPO (MESES) ENTRE A COLETA DO HEV E A OCORRÊNCIA DE HCC.....38

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
APRI	AST to Platelet Ratio Index
AST	Aspartato aminotransferase
CHC	Carcinoma hepatocelular
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes mellitus
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HAV	Vírus da hepatite A
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDV	Vírus da hepatite D
HEV	Vírus da hepatite E
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IAH	Índices de Atividade Histológica
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INR	Razão Normalizada Internacional
MELD	*Model for End-stage Liver Disease*
NA	Não se aplica
Não A - C	Não Hepatite A, B ou C
ORFs	*Open reading frames*
OR	*Odds Ratio*
PCR	Reação de polimerase em cadeia
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RVS	Resposta virológica sustentada
STROBE	*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*

Resumo

RESUMO

Zitelli PMY. *Estudo sobre a influência do vírus da hepatite E na infecção crônica pelo vírus da hepatite C, em pacientes virgens de tratamento antiviral* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: No Brasil, a hepatite E é rara, com prevalência variando de 1% a 12,9% em indivíduos saudáveis. Sabe-se que, em pacientes com hepatite crônica C (HCV), pode haver a exacerbação da lesão hepática pela coinfecção com o vírus da hepatite A (HAV) ou com o vírus da hepatite B (HBV). Porém, poucos estudos avaliaram a coinfecção do HCV com o HEV. Desta forma, avaliamos esta coinfecção para que, se comprovado uma maior progressão da doença, possam ser tomadas no futuro medidas preventivas e/ou curativas em relação ao vírus E. **Objetivos:** Determinar a prevalência da infecção pelo HEV entre os pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C, avaliando o impacto da coinfecção na doença do fígado. **Métodos:** Estudo observacional e transversal. As coletas de amostras foram realizadas no período de 2013 a 2016. Os critérios de inclusão foram: a) Idade acima de 18 anos; b) virgem de tratamento antiviral para hepatite crônica C; e d) concordância do paciente em participar do estudo. Os critérios de exclusão foram: pacientes portadores do vírus HBV e/ou HIV e pacientes hepatopatas com etiologia não HCV. Utilizamos os kits para os testes para anticorpos IgG e IgM - ensaio imunoenzimático (ELISA) (recomWell HEV IgG e IgM, Mikrogen, Neuried , Alemanha) e, RNA HEV por testes QIAamp® MinElute® Virus Spin (Qiagen, Estados Unidos da América). Analisamos a histologia hepática com pareamento de 1:2 dos pacientes coinfectados e monoinfectados. **Resultados:** Anti-HEV IgG foi positivo em 22/181 (12,0%), anti-HEV IgM foi positivo em 3/181 (1,6%) pacientes e o RNA HEV em tempo real foi inconclusivo em 9/181 (4,9%) pacientes. Quando comparamos pacientes com e sem coinfecção por HEV, observamos que os casos positivos para HEV apresentaram uma maior gravidade da doença hepática, determinada pelos seguintes parâmetros: fibrose hepática ≥3 vs ≤2 (p <0,001), elastografia hepática transitória > 9,5 kPa (p=0,020) e ascite (p=0,025). Adicionalmente, pacientes HEV positivos tiveram uma razão de chance 2,84 (IC95% 1,22-6,64) vezes para diabetes mellitus que em pacientes HEV negativos (p=0,0158). Utilizamos a técnica de Kaplan-Meier para comparar as curvas de sobrevida de pacientes com HEV positivos e negativos, a partir da data de coleta do HEV e como desfecho: i) morte ou ii) morte ou transplante. Em ambos os casos, os pacientes positivos para HEV apresentaram desfechos significativamente piores do que os pacientes negativos para HEV (p=0,002 para morte e p=0,008 para morte ou transplante). Foi realizado um grupo controle de 2 pacientes monoinfectados para cada 1 coinfectado, pareando quanto a idade, gênero, genótipo do HCV e grau de fibrose hepática na biópsia hepática. No entanto, não observamos nenhuma característica histológica do vírus da hepatite E, sem nenhuma diferença estatística. **Conclusões:** A prevalência de IgG anti-HEV (12,0%) na infecção crônica pelo HCV não foi maior do que na população geral. A infecção pelo HEV teve um impacto importante na gravidade da doença hepática em nossos pacientes com HCV. Ao parear biópsias hepáticas com o mesmo grau de fibrose, não pudemos observar nenhuma característica específica da coinfecção por HEV. Apesar da infecção pelo HCV possa aumentar a chance de o indivíduo desenvolver DM2, o fator de coinfecção pelo HEV parece ser um fator de risco aumentado para DM2

Descritores: Hepatite E; Hepatite C crônica; Diabetes Mellitus tipo 2; Cirrose hepática; Taxa de sobrevida; Histopatologia.

ABSTRACT

Zitelli PMY. *Study on the influence of hepatitis E virus on chronic hepatitis C virus infection in virgin antiviral patients* [dissertation]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: In Brazil, hepatitis E (HEV) is rare, with a prevalence ranging from 1% to 12.9% in healthy subjects. It is known that in patients with chronic hepatitis C (HCV), hepatic lesions may be exacerbated by coinfection with hepatitis A virus (HAV) or hepatitis B virus (HBV). However, few studies have evaluated HCV coinfection with HEV. Therefore, we evaluated the impact of HEV infection on the disease severity of chronic HCV infection. **Aims:** To determine the prevalence of HEV infection among patients with chronic hepatitis C virus, assessing the impact of coinfection on liver disease severity. **Methods:** Observational and cross-sectional study. Samples were collected from 2013 to 2016. Inclusion criteria: a) Age above 18 years, b) Consecutive chronic HCV adults; c) naïve for HCV treatment, d) patient's agreement to participate in the study. Exclusion criteria: HBV or HIV infection and patients with non-HCV liver disease. HEV serology was performed with IgG and IgM antibody assays (ELISA, Mikrogen, Germany) and, HEV RNA by QIAamp® MinElute® Virus Spin (Qiagen, United States of America). Liver histology was analyzed with a 1:2 pairing of coinfected and monoinfected patients. **Results:** Anti-HEV IgG was positive in 22/181 (12.0%) patients, anti-HEV IgM was positive in 3/181 (1.6%) patients and real time HEV RNA was inconclusive in 9/181 (4.9%) patients. When comparing patients with and without HEV coinfection, We observed that HEV-positive cases had a higher severity of liver disease, determined by the following parameters: liver fibrosis ≥3 vs ≤2 ($p<0.001$), transient hepatic elastography> 9.5 kPa ($p = 0.020$) and ascites ($p = 0.025$). Additionally, HEV positive patients had an odds ratio of 2.84 (95% CI 1.22 - 6.64) times for diabetes mellitus than in HEV negative patients ($p = 0.0158$). We used the Kaplan-Meier technique to compare survival curves of positive and negative HEV patients, starting with the date of collection of the HEV and as an outcome, i) only death or ii) death or transplantation. In both cases, HEV-positive patients perform significantly worse than HEV-negative patients ($p=0.002$ for death and $p=0.008$ for death or transplant). A control group of 2 monoinfected patients for each 1 coinfected was performed, matching age, gender, HCV genotype and degree of liver fibrosis on liver biopsy. However, we did not observe any histological characteristic of hepatitis E virus, without any statistical difference. **Conclusions:** Prevalence of anti-HEV IgG (12.0%) in chronic HCV infection was not higher than in the general population. HEV infection had an important impact on severity of liver disease in our chronic HCV patients. When paring liver biopsies with same amount of fibrosis we could not observed any particular characteristic of HEV coinfection. Although HCV infection may increase an individual's chance of developing T2DM, HEV co-infection factor appears to be an increased risk factor for T2DM.

Descriptors: Hepatitis E; Chronic hepatitis C; Diabetes mellitus type 2; Liver cirrhrosis; Survival rate; Histopathology.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Hepatite E

Foi primeiramente descrita a infecção pelo vírus da hepatite E (HEV) em 1980, através da análise de uma amostra sanguínea de um paciente infectado por uma hepatite aguda endêmica durante o ano de 1955 e 1956 na India, Nova Deli, por consumo de água contaminada. Foi assim denominada “E” por ter características de causar epidemias e ser transmitida de forma entérica, sendo assim identificada em 1983 por Balayan *et al*, como “Hepatite não-A, não-B de transmissão entérica”. (1, 2)

O HEV pertence à família *Hepeviridae*, e é um vírus RNA de cadeia simples de prevalência variável. O seu genoma viral possui cerca de 7,2 mil bases nitrogenadas, capsuladas pela extremidade 5’ e 3’ da fita de RNA, sendo dividido em 3 *Open reading frames* (ORFs) ou fase de leitura aberta, ORF1, ORF2 e ORF3 e cercado por regiões não-codificadas.(3-6)

ORF1 codifica as atividades não-estruturais, enzimáticas, necessárias para o processo de replicação viral e a ORF2 codifica as proteínas estruturais, ou seja, o capsídeo viral, que é essencial para fixação e entrada na célula hepática e, assim, estimular a resposta imunológica do hospedeiro. A função do ORF3, a qual é a menor região codificante do genoma, é a de produção de uma pequena fosfoproteína que se associa ao citoesqueleto e é responsável pela liberação do vírus, além de interagir com fatores celulares do hospedeiro, sendo, portanto, essencial à infectividade do vírus. (1, 4)

São descritos oito genótipos principais do HEV, sendo que 4 são os de maior importância para a infecção viral em humanos, conforme descrito na Tabela 1. (7) Os genótipos 1 e 2 são vírus que causam epidemia aguda em países em desenvolvimento, onde há uma precariedade das condições sanitárias, pois sua transmissão é via fecal-oral, de água ou alimentos contaminados. A taxa de mortalidade é descrita em mulheres grávidas em torno de 15% - 25% com relatos de casos mencionando o desenvolvimento de

insuficiência hepática fulminante, principalmente, no último trimestre de gravidez. (8)

Já o consumo de carne suína ou de animais selvagens (exemplo: veado, coelho, búfalo, etc.), crua ou malcozida é um dos mecanismos de transmissão deste vírus, sendo correlacionado as cepas virais dos genótipos 3 e 4, caracterizando-se como zoonose. Inicialmente, em países desenvolvidos, foram descritos como transmissão através de viajantes em regiões endêmicas, tais como Ásia, África e Oriente Médio. A cronificação desta cepa viral geralmente ocorre em pessoas com o sistema imunológico comprometido. Para tanto, a importância de ressaltar a investigação do HEV nesta população.

Tabela 1 - Características genotípicas da infecção pelo HEV

	Genótipos 1 e 2 Epidemia	**Genótipos 3 e 4 Autóctone**
Distribuição geográfica	Países em desenvolvimento	Países desenvolvidos e em desenvolvimento
Padrão de propagação	Epidemia e esporádica	Esporádica
Espécies	Humana	Suína, humana
Modo de propagação	Fecal-oral, aquaviário	Alimento
Icterícia	Comum	Incomum
Distribuição de idade	Adolescentes e adultos jovens	Idosos
Distribuição de sexo	Similar em homens e mulheres	Superior em homens
Mortalidade	Superior em mulheres grávidas	Superior em idosos
Características extrahepáticas	Poucas	Complicações neurológicas
Infecção crônica	Nenhum	Comum em pessoas imunocomprometidas
Terapia	Nenhum conhecido	Ribavirina, peginterferon
Prevenção	Vacina	Vacina

1.2 Epidemiologia mundial

A soroprevalência do HEV é maior em países em desenvolvimento, tais regiões como no sul, central e sudeste da Ásia (25%), África (50%) e Oriente Médio (15% - 20%), onde esta infecção é responsável pelas hepatites agudas. (9)

Estudos realizados em países do Oriente Médio e Norte da África, observou-se uma taxa de Anti-HEV de 84,0% em adultos no Egito, por exemplo, já em populações gerais do Irã e Arábia Saudita, a prevalência varia entre 4% e 8%, não excedendo 14%. A carga viral do HEV foi detectada em pacientes pediátricos com hepatite aguda no Egito (23%), em pacientes com

hepatite C crônica na Turquia (55%) e em gestantes nos Emirados Árabes Unidos (30%). (9)

Em um estudo de revisão sistemática em países africanos foi encontrada uma taxa de mortalidade que variou de 17,8% no Sudão a 1,5% em Uganda, considerando população em geral. Entre as gestantes, esta taxa de mortalidade foi consideravelmente alta com o percentual de 42,1% durante o ano de 1988 na Etiopia e de 12,5% em um campo de refugiados em Dadaab, no Quênia, em 2012. (10)

Os surtos de HEV foram relatados em 12 países asiáticos com cerca de 29.000 casos suspeitos notificados: Indonésia, Myanmar, Vietnã, Japão, China, Bangladesh, Paquistão, Nepal, Iraque, Uzbequistão, Turquemenistão e Índia. (11)

Muitos casos de infecção aguda pelo HEV ocorrem em países desenvolvidos por estarem relacionados com viagens às áreas endêmicas, ou com indivíduos que receberam transfusão sanguínea e em alguns países europeus onde há o hábito de consumir carne suína crua. (12) A Tabela 2 lista a soroprevalência do anticorpo anti-HEV IgG e do HEV RNA em doadores de sangue de diversos países.

Tabela 2 – Positividade de Hepatite E em doadores de sangue

País	**Prevalência de HEV RNA positivo**	**Soroprevalência de HEV IgG (%)**
Australia	1 por 14.799	6
Austria	1 por 8.416	13,5
China	1 por 1.493	32,6
Dinamarca	1 por 2.330	NA
Inglaterra	1 por 2.848	12,0
França	1 por 2.218	NA
Alemanha	1 por 1.200	29,5
Irlanda	1 por 5.000	5,3
Japão	1 por 1.781	NA
Escócia	1 por 14.520	4,7
Espanha	1 por 3.333	19,9
Suécia	1 por 7.986	NA
Holanda	1 por 2.671	27,0
Estados Unidos da América	1 por 9.500	9,5

A alta taxa de prevalência nos países desenvolvidos, principalmente em países europeus, pode estar associada à cultura e aos hábitos alimentares da região, onde há um consumo maior de alimentos crus ou embutidos de carnes suínas e selvagens. Assim como o fato da exposição ocupacional dos indivíduos à porcos (matadouros, inspetores de carne, veterinários e produtores de suínos) justifica a alta soroprevalência, por exemplo, na Alemanha (29,5%). (12, 13)

Em um estudo de meta-análise em países desenvolvidos, realizado em doadores de sangue, foi demonstrada a soroprevalência dos anticorpos IgG anti-HEV utilizando-se o *kit Wantai* HEV IgG ELISA, apresentando porcentagens de 52,5%, 39,1%, 34% e 22,4% em diferentes regiões da França, seguida de 49,6% na Polônia, 49% na Itália e 31% na Holanda. Com esta meta-análise, através da prevalência levantada em doadores de sangue e população geral, conseguiram classificar os países em 3 categorias: alto risco (França, Holanda e Polônina), médio risco (Áustria, Dinamarca, Noruega, Espanha, Reino Unido e Estados Unidos da América) e baixo risco (Canadá, Escócia, Irlanda, Austrália e Nova Zelândia). Foram descritas como as principais características associadas a alta soroprevalência a idade avançada, o sexo masculino, contato com animais (trabalhadores de fazenda de porcos ou pessoas com exposição ocupacional com suínos), o consumo de carne suína crua ou malcozida, o consumo frequente de carne bovina, carnes defumadas e ostras. Assim como, a associação da baixa prevalência com o consumo de água engarrafada. (14)

E, mais recentemente, um número crescente de casos de HEV autóctones foi relatado em países desenvolvidos. (15, 16) Em um estudo na Escócia, foi descrita uma proporção de 43% de infecção autóctone pelo vírus da hepatite E com genótipo 3. (17)

1.3 Epidemiologia no Brasil

A infecção pelo vírus E (HEV) no Brasil é rara, com variação de 1% a 12,9% em indivíduos saudáveis, conforme apresentada na Tabela 3. (18)

Os primeiros estudos de HEV no Brasil foram relatados por Pang *et al.* em 1995 que identificaram soroprevalência para HEV em 6% em trabalhadores de mina de ouro no Estado do Amazonas e de 4,9% de 61 sujeitos adultos em São Paulo. (19, 20) Em 1997, Paraná *et al*. identificaram 3% de anti-HEV IgG em doadores de sangue e casos de hepatites agudas em Salvador.(21)

Estudos mais recentes apresentaram resultados semelhantes em doadores de sangue com 9,8% e 4,3% de positividade Anti-HEV IgG no Rio de Janeiro e em São Paulo, respectivamente.(22, 23)

Pandolfi *et al*. apresentaram uma alta prevalência de Anti-HEV IgG em indivíduos do banco de sangue de 40,25% (n=314 de uma amostral total de 780) (Tabela 3), sendo justificada por utilizar um método novo indireto *in house* iELISA que possui uma sensibilidade de 91,4% e especificidade de 95,9% quando correlacionado com um ensaio comercial RecomWell, Mikrogen®.

No Brasil, também há um relato do primeiro caso de HEV autóctone. O paciente não possuía nenhum fator de risco e nenhuma história prévia direta ou indireta para a infecção pelo vírus da hepatite E. No entanto, por se tratar de um paciente imunocompetente houve a soroconversão do Anti-HEV IgM e IgG, o HEV-RNA foi amplificado, analisada a sequência genética no ORF1 com detecção do genótipo 3. A cepa descrita neste indivíduo foi igual à detectada em suínos em um estudo brasileiro e em ser humano no Japão associada ao consumo de carne malcozida de veado ou javali. (24, 25)

Tabela 3 – Prevalência do anti-HEV IgG em população geral em diferentes regiões do Brasil

População	Região	Nº de casos	Anti-HEV IgG positivo (%)	Estudo
Mineradores	Bacia amazônica	97	6,1	Pang et al (19)
População geral	Bacia amazônica, Sul, Cotriguaçu (MT)	299	3,3	Souto e Fontes (26)
População geral	Bacia amazônica, Acre (AC)	388	12,9	Vitral et al (27)
Doador de sangue	Nordeste, Salvador (BA)	200	2,0	Parana et al (21)
Doador de sangue	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	93	4,3	Trinta et al (22)
Doador de sangue	Sudeste, São Paulo (SP)	500	9,8	Passos-Castilho et al (23)
Doador de sangue (*ALT<2 UNL)	Sudeste, Campinas (SP)	165	3,0	Gonçales et a l(28)
Doador de sangue (*ALT>2 UNL)	Sudeste, Campinas (SP)	40	7,5	Gonçales et al (28)
Doador de sangue	Londrina, Paraná (PR)	996	2,3	Bortoliero et al (29)
Doador de sangue	Passo Fundo, Rio Grande do Sul (RS)	780	40,25	Pandolfi et al (30)
Gestante	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	304	1,0	Trinta et al(22)
Indivíduos de área rural	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	145	2,1	Trinta et al (22)
Indivíduos de área urbana	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	260	0	Trinta et al (22)
Indivíduos que habitam em comunidade com socioeconômico baixo	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	699	2,4	Santos et al (31)
Crianças (2-9 anos de idade)	Bacia amazônica, Peixoto de Azevedo (MT)	487	4,5	Assis et al (32)

*ALT: alanina aminotransferase

Além disso, a prevalência de anti-HEV Ig G em população de risco, tais como Hepatite aguda Não Hepatite A, B ou C variou de 2,1% a 29% conforme as regiões estudadas no Brasil (Tabela 4). Sendo que, em populações imunocompetentes, tais como em Hepatite C aguda e esquistossomose, apresentaram soroprevalência de 0 e 18%, respectivamente, com uma alta prevalência no segundo grupo. Apesar de estes estudos demonstrarem uma alta taxa de prevalência são poucos os estudos citados sobre a sua coinfecção com o HCV (Tabela 3)(18)

Tabela 4 – Prevalência do anti-HEV IgG em população de risco em diferentes regiões do Brasil

População	Região	Nº de casos	Anti-HEV IgG positivo (%)	Estudo
Hepatite aguda NãoA-Não B-Não C	Nordeste, Salvador (BA)	17	12	Parana et al (33)
	Nordeste, Salvador (BA)	12	17	Lyra (34)
	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	1,057	2,1	Trinta et al (22)
	Bacia amazônica, Sul, Cotriguaçu (MT)	16	12,5	Souto et al (35)
	Goiânia, Goiás (GO)	379	5,3	Freitas, et al (36)
Hepatite aguda Não A-Não B-Não C relativos	Bacia amazônica, Sul, Cotriguaçu (MT)	66	10,6	Souto et al (35)
Hepatite aguda esporádica Não A, Não B	Nordeste, Salvador (BA)	43	12	Parana et al (21)
Hepatite aguda A	Nordeste, Salvador (BA)	24	25	Parana et al (21)
	Nordeste, Salvador (BA)	50	38	Lyra (34)
Hepatite aguda B	Nordeste, Salvador (BA)	26	11	Parana et al (21)
	Nordeste, Salvador (BA)	42	10	Lyra (34)
Hepatite aguda C	Nordeste, Salvador (BA)	12	0	Parana et al (21)
Portadores de Esquistossomose	Nordeste, Salvador (BA)	30	10	Parana et al (21)
Portadores de Esquistossomose	Recife, Pernambuco (PE)	80	18,8	Castilho et al (37)
Paciente em hemodiálise	Nordeste, Salvador (BA)	392	0	Parana et al (21)
Prostitutas	Sudeste, Campinas (SP)	21	14,2	Gonçales et al (28)
Mulheres consideradas risco para HIV	Sudeste, Campinas (SP)	193	18,1	Gonçales et al (28)
Profissionais de saúde	Sudeste, Campinas (SP)	117	2,6	Gonçales et al (28)
Trabalhadores de limpeza	Sudeste, Campinas (SP)	53	13,2	Gonçales et al (28)
Usuários de drogas injetáveis	Sudeste, Rio de Janeiro (RJ)	102	11,8	Trinta et al (22)

1.4 Marcadores do vírus da hepatite E

A avaliação da prevalência do HEV tem sido determinada pela detecção do anti-HEV IgG. No entanto, variações acentuadas na sensibilidade e especificidade dos *kits* de análise comerciais disponíveis dificultam a interpretação dos estudos soroepidemiológicos e faz com que resultados devam ser avaliados com atenção. Dessa forma, a avaliação molecular através da pesquisa do HEV-RNA pela técnica PCR (Reação de polimerase em cadeia) é fundamental para o diagnóstico da HEV.

No guia prático para o vírus da hepatite E da Associação europeia para estudo do fígado (*European Association for the Study of the Liver*) está descrito como realizar o diagnóstico da hepatite pelo vírus E (Figura 1)

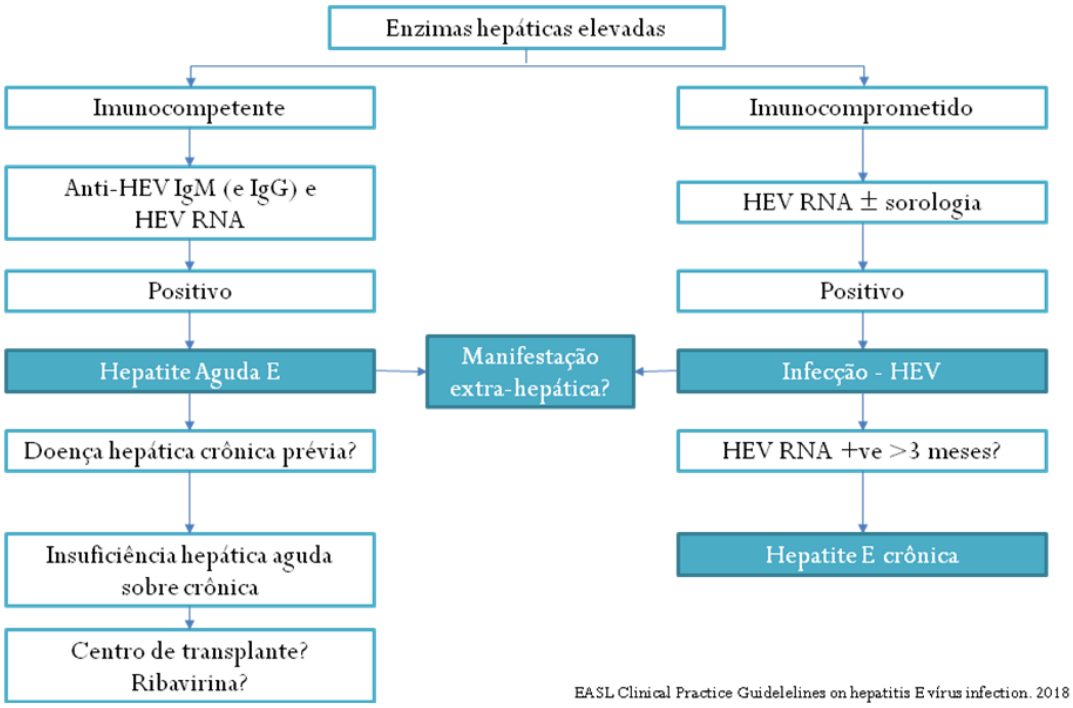


Figura 1. Diagnóstico do HEV

1.5 Sintomatologia

Na maioria dos doentes, a infecção pelo vírus da hepatite E resulta em uma hepatite aguda e autolimitada, que dura algumas semanas. Um período de incubação inicial de 2 a 6 semanas geralmente precede a resposta de IgM de curta duração que é detectado aproximadamente no mesmo momento em que os níveis das enzimas hepáticas, tais como a alanina aminotransferase (marcador de inflamação ou injúria), estarão elevadas e que podem persistir por até 6 a 9 meses. (1, 7) Neste período, o paciente desenvolve sintomas de hepatite, com febre e náuseas seguidas por dor abdominal, vômitos, anorexia, mal-estar e hepatomegalia. Icterícia ocorre em cerca de 40% dos pacientes. O nível sérico da bilirrubina total também é aumentado durante a fase da icterícia. A resposta do IgG pode ser prolongada, podendo persistir por vários anos,

sendo que esta duração exata de positividade é incerta. Os parâmetros da função hepática devem ser monitorados durante a infecção aguda.(7)

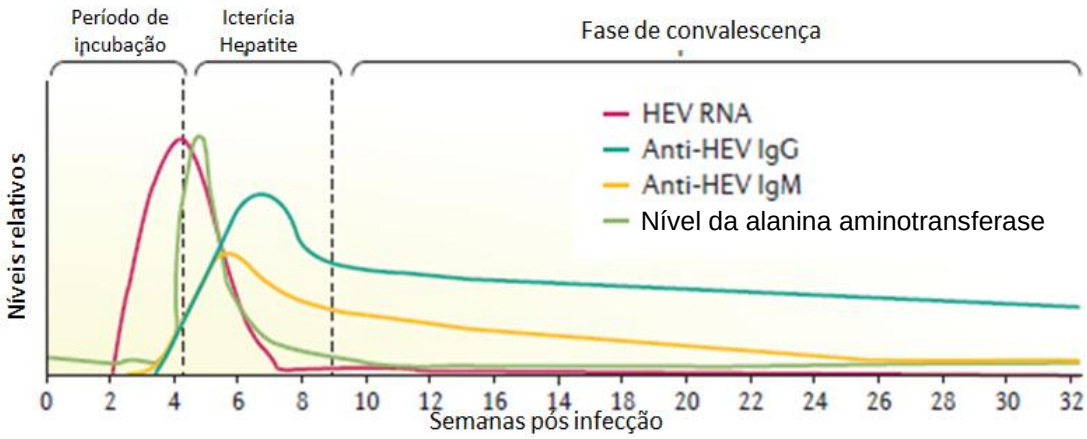


Figura 2. Infecção HEV. Aparecimento do RNA do vírus da hepatite E, período de incubação e anticorpos durante a infecção por HEV. IgG. imunoglobulina G; IgM. imunoglobulina M

É importante ressaltar que em pacientes imunocompetentes, a hepatite E aguda, normalmente, resolve-se espontaneamente sem necessidade de se utilizar medicamentos antivirais. (38)

No entanto, em pessoas com o sistema imunológico comprometido, tais como aqueles em imunossupressão, transplante de órgão sólido, infecção por HIV, hemodiálise, malignidades hematológicas e grávidas, os sintomas da infecção pelo HEV e a viremia podem ser prolongados, com anti-HEV IgG e RNA detectáveis. (39) Desta forma, pode se tornar a causa de 30% de mortalidade em mulheres grávidas infectadas no terceiro trimestre ou transformar-se em uma doença crônica.

Nosso grupo realizou um estudo com pacientes transplantados de fígado que apresentaram positividade para algum marcador sorológico anti-HEV IgG em 24 (8,2%) casos, anti-HEV IgM em 6 (2%) casos, ou virológico, HEV RNA em 17 (5,8%) casos, dos quais em apenas um foi detectado marcador sorológico (anti-HEV IgG), concomitante. (40) Outro grupo investigou em portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana) e demonstrou uma soroprevalência de anti-HEV IgG e IgM de 10,7% (38/354) e 1,4% (5/354), respectivamente. (41)

Corroborando com dados acima mencionados, outros estudos, avaliaram uma prevalência de anti-HEV IgG de 3,7% em transplantados renais, 7,4% em transplantados hepáticos sem cirrose e 32,1% em pacientes que evoluíram com cirrose pós transplante de fígado ($p<0.01$). E em pacientes portadores de HIV demonstrou-se que a taxa de anti-HEV IgG foi de 9,2%, portanto, mais alta quando comparada com pacientes não portadores de HIV ($p<0.03$). (42)

1.6 Tratamento para HEV

Relatos de casos isolados têm demonstrado que o tratamento com ribavirina ou interferon-α pode resultar na erradicação viral do HEV. Uma revisão sistemática com 24 estudos demonstrou que 64% dos 105 pacientes tratados com ribavirina e 2 dos 8 pacientes tratados com Interferon peguilado obtiveram resposta virológica sustentada (RVS) em 6 meses. No entanto, por ser um estudo que avaliou pacientes transplantados, ou seja, imunocomprometidos, o interferon peguilado levou a rejeição aguda do transplante em 2 dos 8 pacientes. (43, 44)

Pischke *et al*. observaram em uma série prospectiva de casos que a cura espontânea à infecção HEV sintomática aguda em indivíduos imunocompetentes foi de 10/11. Sendo, então, realizada a terapia com ribavirina em um paciente com infecção aguda grave, tendo uma recuperação imediata da função hepática com eliminação do HEV. Já em 15 receptores de transplante de órgãos com viremia HEV prolongada, a redução da imunossupressão levou a depuração de HEV em três pacientes. E em outros 11 indivíduos foi iniciado o tratamento com ribavirina. Uma resposta rápida com HEV RNA indetectável ocorreu em nove deles. Um paciente morreu por um avanço virológico associado à redução da dose de ribavirina devido a anemia grave.(45) Desta forma, ficou demonstrado que o tratamento antiviral com ribavirina seria o tratamento de escolha para hepatite E crônica nesta população.

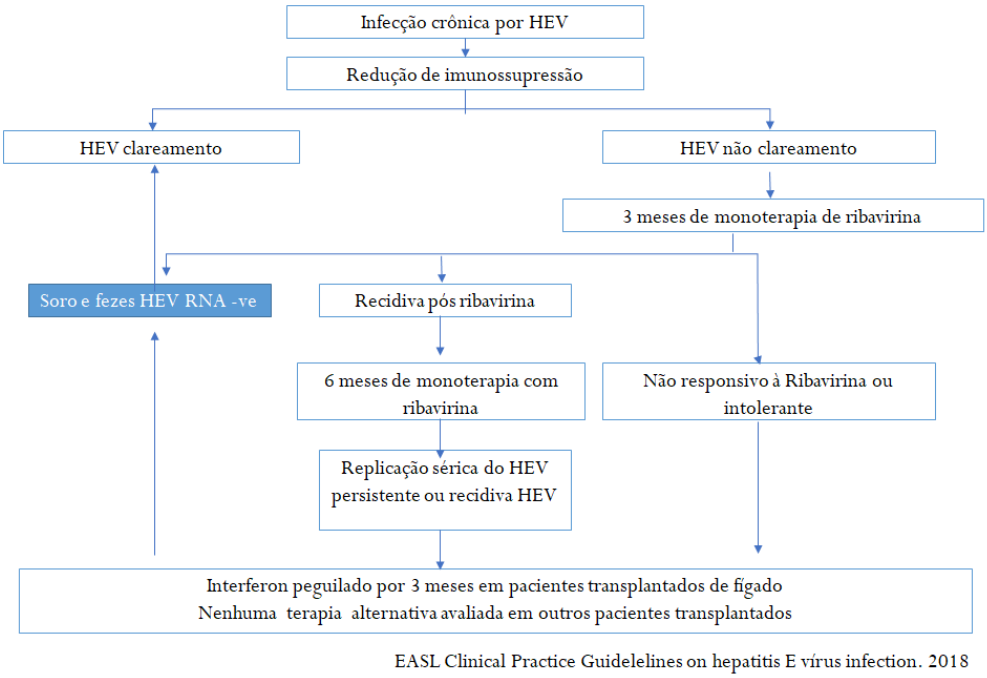


Figura 3. Tratamento do HEV em pacientes transplantados de fígado

1.7 Hepatite C crônica e coinfecções virais

No mundo, atualmente, estima-se que 80 a 150 milhões de pessoas possuem a hepatite crônica C (HCV), sendo que no Brasil são aproximadamente 1,4 e 1,7 milhão de pacientes infectados. Por não apresentar nenhum sintoma específico durante vários anos, a maioria desta população se torna crônico, evoluindo para uma cirrose hepática ou carcinoma hepatocelular, apresentando uma acentuada morbi-mortalidade devido as suas descompensações. Em concomitância, o surgimento de novas terapias antivirais faz com que haja a diminuição da progressão da fibrose e do risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma em indivíduos que atingem resposta virológica sustentada (RVS).(46)

Em pacientes com hepatite crônica C, pode haver a exacerbação da manifestação hepática pela coinfecção com o vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), HBV mais o vírus da hepatite D (HDV), vírus da hepatite E (HEV) ou até mesmo pela superinfecção pelo citomegalovírus. (47)

Um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou que dos 1.000 pacientes com Hepatite C crônica em seguimento ambulatorial, 7,7% apresentaram anti-HAV IgG negativo, ou seja, são susceptíveis a infecção pelo

vírus da Hepatite A. E que também 24% da população estudada tinha sorologia anti-HBc total positivo, demonstrando o contato prévio para a Hepatite B.(48)

Em um estudo de revisão, foi demonstrado que a coinfecção pelo HAV e pelo HBV em pacientes com HCV está associada a altas taxas de mortalidade e também está associada a uma acelerada progressão da doença crônica do fígado para cirrose, descompensação hepática e carcinoma hepatocelular (CHC). Pacientes com hepatite A aguda em associação com hepatite C crônica têm um maior risco de evoluir para hepatite fulminante e morte. (49, 50)

Há estudos também que sugerem que o HCV e o HEV podem partilhar de uma via comum de transmissão, sendo um deles por transfusão sanguínea. Um estudo da Áustria demonstrou que a cada 1 de 8.416 doadores de sangue tem o HEV RNA positivo.(51) Por este motivo, recomendou-se que fosse feita uma prevenção contra o vírus E entre pacientes portadores de hepatite C crônica, uma vez que a superinfecção com o HCV poderia ocasionar um quadro mais grave na progressão da doença.

Um estudo realizado na Turquia, em 2007, avaliou a coinfecção do HEV com HBV e HCV, demonstrando que, entre os 190 pacientes portadores do HBV, 174 pacientes com HCV e 178 indivíduos sadios, 26 pacientes (13,7%) tiveram o anticorpo Anti-HEV IgG positivo com HBV, 94 pacientes (54%) com HCV e 28 indivíduos sadios (15,7%), respectivamente. Sendo que a associação entre a HEV e HCV sugere a presença de meios comuns de transmissão e infecção, por isso que, em regiões endêmicas, é altamente importante tomar medidas preventivas contra a infecção pelo HEV em pacientes com HCV. (52)

Em outro estudo realizado na Inglaterra, foi analisada a presença do anticorpo Anti-HEV IgG e IgM em 164 pacientes, dos quais 15 (9,1%) eram positivos. Destes pacientes, 6 já tinham uma doença crônica do fígado, sendo que 3 eram cirróticos (1 por álcool e vírus da hepatite C e 2 por cirrose alcoólica), 2 com esteatohepatite não alcoólica e 1 paciente com colangite autoimune. Nestes 6 pacientes, a sorologia positiva para o HEV foi apontada como causa de agudização e/ou descompensação da doença adjacente. (53)

Portanto, o papel da coinfecção do vírus E em indivíduos com doença hepática crônica de outras etiologias ainda não está muito claro e, dessa forma,

nós propomos a investigação da coinfecção do vírus E em uma população de indivíduos portadores de hepatite crônica pelo vírus C, tendo como pre-requisito nunca terem sido submetidos ao tratamento com Peginterferon e Ribavirina e, também, que não sejam imunocomprometidos. Desta forma, é muito importante avaliarmos o impacto dessa coinfecção na doença adjacente pelo HCV.

2. JUSTIFICATIVA

É muito importante avaliarmos o impacto da coinfecção do HEV na progressão da doença em pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus C, para que, se comprovado um agravamento no quadro da doença, possam ser tomadas medidas preventivas e/ou curativas em relação ao vírus E.

3. OBJETIVOS

3.1 Primário

Determinar a prevalência da infecção pelo HEV entre os pacientes portadores crônicos do vírus da hepatite C, avaliando o impacto da coinfecção na doença do fígado.

3.2 Secundários

- Determinar as características clínico-laboratoriais dos pacientes co-infectados pelo HCV-HEV em comparação aos monoinfectados pelo HCV;
- Correlacionar co-infecção HCV-HEV com a gravidade da doença.
- Avaliar características e parâmetros histológicos associados à infecção pelo HEV.

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo retrospectivo, transversal, prospectivo e observacional avaliando infecção pelo HEV entre os pacientes portadores crônicos do HCV, virgens de tratamento da hepatite C crônica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ambulatório de Hepatologia da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica**.** O estudo se baseou nas declarações de STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) que é um guia para estudos observacionais e transversais.

4.2 Caracterização da amostra

Critérios de Inclusão:

a) Idade acima de 18 anos.

b) Portador da infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

c) Virgem de tratamento antiviral da hepatite crônica C.

d) Concordância do paciente em participar do estudo.

Critérios de Exclusão:

a) Portadores da Hepatite B e/ou HIV

b) Pacientes hepatopatas com etiologia não HCV

c) Pacientes que tenham submetido a algum tipo de tratamento antiviral para o HCV.

Os participantes da pesquisa foram recrutados de forma sequencial conforme o seguimento ambulatorial.

4.3 Procedimentos realizados no estudo

a) Convidar os pacientes com critérios de inclusão para a participação e assinatura do termo de consentimento, caso haja concordância.
b) Consulta de enfermagem para obtenção de dados demográficos e clínicos.
c) Consulta ao prontuário do paciente para análise dos dados clínicos quanto à gravidade de sua doença e outros fatores de riscos, assim como para a investigação de tratamentos prévios para a Hepatite C. Foram analisados também todos os exames solicitados rotineiramente pelo médico do paciente e que não são específicos deste estudo. Tais como: a) exames laboratoriais de sangue: anticorpos contra Hepatite A, Hepatite B e HIV, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama glutamil transferase, bilirrubina total, INR, proteínas totais, albumina, alfafetoproteína e creatinina.
d) A carga viral com PCR-HCV RNA e genotipagem do vírus da Hepatite C foram analisadas no Laboratório Central da Instituição rotineiramente conforme solicitação do assistente médico do paciente, utilizando-se o PCR em Tempo Real da *Abbott Real Time HCV*, assim como a genotipagem do HCV com PCR em Tempo Real (*Abbott Real Time HCV Genotype II*), sendo que o ensaio *Abbott RealTime HCV Genotype II* utiliza sondas especificas para os genótipos 1, 1a, 1b, 2, 3, 4, 5 e 6, sendo necessário que a amostra clínica apresente carga viral mínima do RNA do HCV de 500 UI/mL para a realização do teste. Este teste pode detectar infecções mistas, com mais de um genótipo de HCV, ainda que estas sejam infreqüentes.

4.3.1 Coleta e análise para o vírus da Hepatite E

Foi realizada a coleta de sangue periférico no ambulatório de Hepatologia. Foram coletados 3 tubos de sangue (1 seco e 2 com EDTA) contendo cerca de 4 mL de sangue de cada um.

As amostras foram analisadas conforme descrito a seguir, Laboratório Investigação Médica (LIM7) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a pesquisadora realizou juntamente com a bióloga Michele Correa Gomes.

4.3.1.1 Pesquisa dos marcadores sorológicos

Todas as amostras de soro foram submetidas à pesquisa quantitativa de anticorpos anti-HEV das classes IgM e IgG utilizando-se os *kits* comerciais *in vitro RecomWell* HEV IgM/IgG (MIKROGEN , Neuried , Alemanha), que são baseados no princípio de ELISA sanduíche indireto com antígenos recombinantes das regiões ORF2 e ORF3 do genoma do HEV expressos em células de *E. coli*. Os *kits RecomWell* para detecção e quantificação de anticorpos IgM e IgG são distintos, entretanto, as orientações para os procedimentos dos ensaios são idênticas, diferindo apenas na adição de conjugado IgM ou IgG. Os ensaios foram realizados e validados segundo orientações específicas do fabricante.

4.3.1.2 Diagnóstico por técnicas de biologia molecular

Todas as amostras foram também submetidas ao diagnóstico molecular independentemente do resultado obtido na sorologia.

As boas práticas para evitar resultados falso-positivos utilizando técnicas de biologia molecular adotadas para a realização das reações, assim como a introdução de controles negativos entre as amostras para monitoramento da qualidade dos resultados, foram aplicadas (54).

4.3.1.3 Extração de RNA

Para extração do RNA viral, foi utilizado o *kit* de extração QIAamp® MinElute® Virus Spin (Qiagen, Estados Unidos da América), conforme orientações do fabricante.

4.3.1.4 Detecção do HEV RNA

Após o procedimento de extração, o material extraído foi, então, submetido à reação de amplificação utilizando-se a técnica de Hemi - *Nested* RT-PCR, através da qual se torna possível realizar a transcrição reversa (RT) juntamente à primeira etapa do processo de amplificação, seguida, posteriormente, por uma segunda etapa de amplificação, conferindo à reação maior eficiência e sensibilidade. Foi amplificado um fragmento de 337 pares de bases da região ORF1 do genoma do HEV.

Para a realização da primeira etapa deste procedimento, após a reação de RT, a amplificação foi realizada utilizando-se um protocolo de ciclagem denominado *touchdown,* o qual favorece a otimização da PCR através de decréscimos progressivos da temperatura a partir da temperatura inicial de anelamento dos *primers* utilizados. Foram utilizados os *primers* descritos anteriormente e o *kit SuperScript* III (SSIII) *one-step* RT-PCR (*Invitrogen* ®) .

4.3.1.5 PCR quantitativo em tempo real

Para a amplificação do HEV RNA por PCR em tempo real foi empregado o *Kit QuantiFast Pathogen* RT-PCR + IC® (QIAGEN) com um par de *primers* e uma sonda MGB, os quais foram selecionados para a amplificação específica do ácido nucleico do HEV. Este *kit* possui um controle interno exógeno (RNA) acompanhado de *primers* e sonda, o qual deve ser amplificado no mesmo tubo da amostra teste para se confirmar a ausência de inibidores na reação e evitar dessa forma resultados falsos-negativos. Para a quantificação absoluta da carga viral, foi montada uma curva padrão a partir da clonagem e transcrição do fragmento de interesse do genoma do HEV.

4.3.1.6 Sequenciamento

Os *amplicons* gerados no segundo ciclo de PCR foram inicialmente purificados com o *Kit ChargeSwitch* PCR *Clean Up (Invitrogen)*, quantificados e então sequenciados. Foi empregada a técnica de sequenciamento utilizando-se didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o "*kit*" *ABI Prism*^{R} *BigDye*^{TM} *Terminator (Applied Biosystems)* e os *primers*

utilizados no segundo ciclo de PCR. A eletroforese dos fragmentos de DNA marcados foi realizada em Sequenciador Automático *ABI Prism*^{R} 3500 (*Applied Biosystems*). Foram geradas sequências a partir das duas fitas de DNA para garantir maior confiabilidade dos resultados obtidos.

4.3.1.7 Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas quanto a sua qualidade utilizando o programa *Phed Phap* disponível no site http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/. As sequências *sense* e *antisense* de cada região genômica sequenciada foram unidas para a partir das informações contidas em ambas, montar uma sequência, consenso e para isso ser utilizado com o programa CAP3 também disponível *online* no *site* citado anteriormente.

4.3.1.8 PCR quantitativo com o kit Eurobio®

Para analisar as amostras com resultados inconclusivos obtidos com a amplificação do HEV RNA por PCR em tempo real com o *Kit QuantiFast Pathogen* RT-PCR + IC® (QIAGEN), utilizamos o teste HEV RNA RT-PCR em tempo real do *kit* Eurobio®. Este controle permite avaliar possíveis variações que possam ocorrer durante as etapas de extração de RNA de amostras biológicas e de amplificação por PCR em tempo real e permite garantir que um resultado negativo não pode ser devido a uma má extração de RNA e/ou à presença de inibidores de PCR em grande quantidade. Este teste é realizado a partir do RNA extraído da amostra por meio de uma reação única em um só tanque/tubo. O vírus é detectado com a ajuda de uma sonda marcada HEX para as amostras humanas. O controle de extração e de inibição de PCR é detectado com a ajuda de uma sonda marcada Cy5. Todos emitem uma fluorescência específica devido à hidrólise durante o alongamento do produto de amplificação. A medida das intensidades de fluorescência em tempo real relata a acumulação dos produtos de amplificação específicos.

Este sistema de amplificação foi validado em um plasmídeo que contém uma sequência de inserção específica consenso em HEV (Controle

positivo: plasmídeo CP-HEV) e de um bacteriófago de RNA encapsidado (CI-RNA).

4.3.2 Avaliação Histológica

Foram realizadas análise de lâminas de biópsias hepáticas para avaliar histologicamente o grau de fibrose do fígado, sendo classificado conforme o *score* METAVIR e, correlacionar os aspectos histológicos da infecção pelo HCV com indivíduos com coinfecção HEV-HCV. Foi realizado um grupo controle de 2 sujeitos de pesquisa monoinfectado para cada 1 coinfectado, pareando quanto a idade, gênero, genótipo do HCV e grau de fibrose hepática na biópsia hepática.

As lâminas de biópsia hepática foram avaliadas pelo Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para evitar variabilidade entre observadores, outra limitação dos estudos baseados em avaliação histológica, todas as amostras foram revisadas por um patologista experiente (Dr. Ryan Yukimatsu Tanigawa), sem conhecimento da condição clínica e dos exames laboratoriais dos pacientes.

Pela necessidade de fornecer relatos anatomopatológicos com uma terminologia sistematizada, visando substituir ou complementar os relatos subjetivos e fornecer dados numericamente representáveis, os Índices de Atividade Histológica (IAH) foram classificados de acordo com o Escore da SBH/SBP (55) por ser este amplamente utilizado em nosso país, tanto em pesquisa, quanto na prática diagnóstica diária de patologistas e hepatologistas (Tabela 5).

Para analisar minuciosamente os aspectos histopatológicos das biópsias hepáticas, além da fibrose hepática, foram analisadas outras características como sistema de *score* histológico para esteatohepatite hepática não alcoólica (EHNA) na Tabela 6, as alterações colestáticas com avaliação de reação ductular e estase biliar, a presença de células inflamatórias lobulares e grau de siderose em hepatócitos e células de Kuppfer.

Tabela 5 - Classificação Histológica das Hepatites Virais de acordo com a SBH/SBP.

1 Alterações Estruturais/Fibrose
0 Arquitetura Lobular Normal
1 Expansão Fibrosa de espaços-porta
2 Expansão Fibrosa portal com septos porta-porta
3 Preservação apenas parcial da arquitetura lobular, com septos porta- porta e porta-centro, podendo ser vistos esboços de nódulos
4 Cirrose plenamente identificada à biopsia ou predomínio de áreas nodulares em relação a lóbulos remanescentes

2 Infiltrado Inflamatório Portal/Septal
(Semiquantificação de 0 a 4, independente da formação de folículos linfoides)
0 Raros linfócitos portais
1 Aumento discreto do número de linfócitos portais
2 Aumento moderado do número de linfócitos portais
3 Aumento acentuado do número de linfócitos portais
4 Aumento muito acentuado do número de linfócitos portais

3 Atividade Peri-Portal/Peri-Septal
0 Ausência de lesões de interface espaço-porta/parênquima
1 Extravasamento de linfócitos para interface (spill-over), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados
2 Necrose em saca-bocados discreta (pequenas áreas em poucos espaços-porta)
3 Necrose em saca-bocados moderada (extensas áreas em poucos espaços-porta ou pequenos focos em muitos espaços-porta.
4 Necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços-porta.

4 Atividade Parenquimatosa
0 Hepatócitos normais, isomorfos
1Alterações discretas de hepatócitos, incluindo tumefação acidófila, eventualmente acompanhada de infiltrado linfo-histiocitário e raros focos de necrose.
2 Necrose focal de hepatócitos, circundado por agregados linfo-histiocitário em numerosos sítios.
3 Necrose focal de hepatócitos circundados, por agregados linfo-histiocitário em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluente.
4 Necrose focal de hepatócitos, circundadas por agregados linfo-histiocitário em numerosos sítios, associados a necrose confluente extensa/ múltipla.

Fonte: Gayotto, 2000.(55)

Tabela 6 - Sistema de score histológico para a classificação de EHNA (Esteatohepatite hepática não alcoólica)

Item	Definição	*Score/Code*
Grau de Esteatose	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3
Inflamação lobular	Não	0
	<2	1
	2-4	2
	>4	3
Balonização hepatocítica	Não	0
	Poucas células balonadas	1
	Muitas células balonadas	2
Mallory	Nenhum para raro	0
	Muitas	1
Esteatohepatite	Presente	0
	Ausente	1

Fonte: adaptado do Kleiner, 2005

Devido ao número reduzido de pacientes com anti-HEV IgG e HEV RNA positivos e a fim de possibilitar uma avaliação estatística, os índices histológicos da classificação SBH/SBI, a classificação de EHNA e outras alterações foram agrupados nas seguintes categorias:

- **Hepatite crônica**

Fibrose/arquitetura	1 "Estadios 0, 1, 2" 2 "Estadios 3 e 4"
Infiltrado inflamatório portal	1 "Estadios 0, 1 e 2" 2 "Estadios 3 e 4"
Atividade de interface	1 "Estadios 0, 1, 2" 2 "Estadios 3 e 4"
Atividade parenquimatosa	1 "Estadios 0, 1, 2" 2 "Estadios 3 e 4"

- **Esteatose**

Esteatose	0: <5%; 1: 5%-33%; 2: >33%-66%; 3: >66%
Edema	1: 0 ou 1; 2:2
Atrofia biliar	1: 0 ou 1; 2:2
Inflamação ductal	1: 0 ou 1; 2:2

- **Alterações colestáticas**

Reação ductular	1: 0 ou 1; 2:2 ou 3

- **Células inflamatórias lobulares**

Monolike	1: 0 ou 1; 2:2 ou 3

- **Siderose**

Kuppfer	1: 0,1 ou 2; 2: 3 ou 4

4.3.4 Métodos não invasivos para análise de fibrose hepática

A Elastografia hepática foi realizada conforme solicitação do médico assistente que realiza o seguimento do paciente ambulatorial e de rotina da conduta médica. Elastografia hepática visa estratificar o comprometimento hepático (grau de endurecimento ou *stiffness*), sendo realizada preferencialmente de forma ambulatorial. Foi realizada com jejum de quatro horas. O exame foi realizado com o paciente em decúbito dorsal e teve duração aproximada de 5 a 10 minutos. A técnica habitual consiste em apoiar o transdutor sobre a pele entre as costelas do paciente e realizar 10 medições válidas no mesmo local. Foi utilizado o seguinte equipamento:

- FibroScan®, fabricado pela companhia Echosens, França

O equipamento tem como princípio físico a utilização de ondas sonoras para avaliar a fibrose de forma não invasiva, sem requerer sedação ou punções. Não apresenta riscos à saúde (riscos considerados mínimos), podendo ser realizado em pacientes de qualquer idade, por não utilizar radiação eletromagnética. Conforme demonstrado na Figura 2 coluna A, utilizamos os parâmetros, segundo a qual cinco faixas de valores, expressos em unidades quilo pascais (kPa), caracterizam o grau de fibrose hepática, correlacionando-se ao estadiamento histológico de fibrose Metavir em portadores do vírus da Hepatite C (56).

Interpretação da elastografia

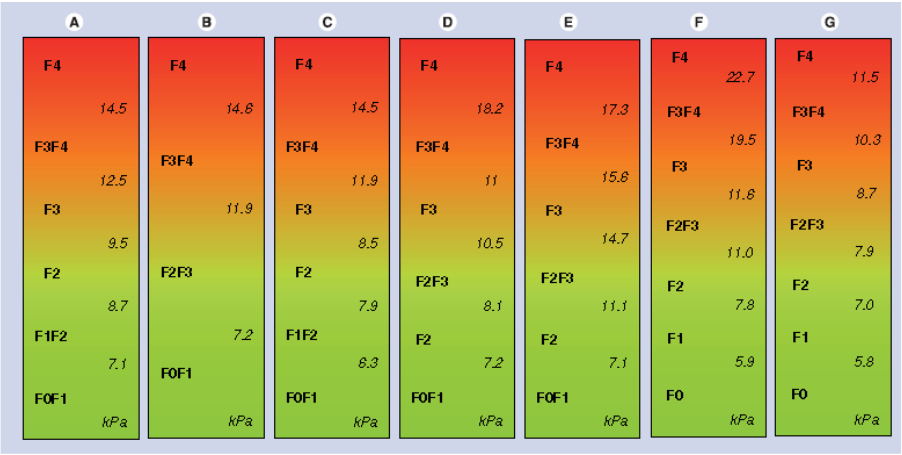


Figura 4. Concordância entre medidas de elastografia em unidades kPa e graus de fibrose hepática. (A) Vírus C; (B) Co-infecção virus C e HIV; (C) Vírus C pós transplante; (D) Vírus B; (E) Doença hepática colestática; (F) Cirrose alcoólica; (G) Doença gordurosa não-alcoólica. Fonte: de Lédinghen et. al, 2010.

- O **APRI** (*AST to Platelet Ratio Index*) é um *score* que calcula o grau de fibrose hepática através de valores de aspartato aminotransferase sobre número de plaquetas, conforme o cálculo abaixo:

$$\text{APRI} = \frac{\text{nível de AST/ nível de AST (dentro da normalidade)}}{\text{Plaquetas } (10^9/\text{L})} \times 100$$

Para a detecção de cirrose, a pontuação de corte do APRI de 2,0 foi mais específica (91%), mas menos sensível (46%). Quanto menor o *score* APRI (menor que 0,5), maior o valor preditivo negativo (e a capacidade de descartar cirrose) e quanto maior o valor (maior que 1,5), maior o valor preditivo positivo (e capacidade de sugerir fibrose avançada – F3/F4); valores médios são menos úteis. Algumas evidências sugerem que o uso de vários índices em combinação (como o APRI mais o FibroTest) ou uma abordagem algorítmica pode resultar em maior precisão diagnóstica do que usar somente o APRI.(57)

4.4 Análise estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva resultando em tabelas de frequência para variáveis qualitativas.

Para estudar a relação entre as variáveis categorizadas, foram empregados os testes de homogeneidade baseados na estatística de Pearson (qui-quadrado) com correção de continuidade e, para as médias das variáveis contínuas, foi realizado o teste t. Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0,05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos *softwares* IBM SPSS 23 (Statistical Package for the Social Sciences) e Excel 2010® (Microsoft Office).

Woolf teste de homogeneidade de razões de chances entre estratos (caso mais 2 controles) foi utilizado para analisar os dados histológicos dos

pacientes coinfectados por HEV e HCV pareados por 2 controles de pacientes monoinfectados por HCV. (58)

Utilizamos a técnica de Kaplan-Meier para comparar as curvas de sobrevivência de pacientes HEV positivos e negativos tendo como instante inicial a data de coleta do HEV e como desfecho, i) só óbito ou ii) óbito ou transplante.

4.5 Aspectos Éticos

O estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Declaração de Helsinki e com a aprovação do protocolo pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia e pela Comissão de Normas Éticas do HCFMUSP (CAPPesq) (número CAAE: 04721712.4.0000.0068 e número do Parecer: 138.009).

Todos os pacientes ou seus responsáveis legais receberam informações claras, em linguagem acessível, acerca dos objetivos do estudo, procedimentos necessários, riscos e benefícios esperados, assinaram o termo de consentimento pós-informado. Os autores do projeto declaram que não possuem qualquer vinculação com os fabricantes dos equipamentos, não havendo qualquer relacionamento que possa ser considerado conflito de interesses.

Todos os tratamentos necessários do ponto de vista clínico foram permitidos, segundo o julgamento do médico assistente responsável pelo paciente.

Localidade e duração do estudo

Os pacientes foram recrutados no ambulatório de Hepatite C da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica. A coleta do HEV foi realizada no período de Janeiro de 2013 a Janeiro de 2016. E o seguimento dos pacientes para avaliação de tratamento para hepatite C crônica, evolução de hepatocarcinoma celular e os levantamentos de desfechos foram realizadas da data de coleta do HEV até Maio de 2019.

5 RESULTADOS

5.1 Casuística da população geral

Entre o período de janeiro 2013 a janeiro 2016, foram avaliados para a inclusão deste estudo 727 pacientes cadastrados ambulatorialmente. Destes, 106 receberam alta do ambulatório após resposta virológica sustentada para serviço secundário de saúde, 406 já eram experimentados com Interferon peguilado e Ribavirina e que estavam em seguimento aguardando os novos tratamentos antivirais de ação direta (DAA) e 1 paciente era coinfectado pelo vírus da hepatite B e vírus da hepatite C. Contudo, 214 eram pacientes que não haviam realizado tratamento para HCV (virgens de tratamento) previamente. Dos pacientes virgens de tratamento, 33 realizaram transplante renal e excluímos do estudo, considerando que são pacientes imunodeprimidos. Sendo assim, o nosso estudo baseou-se na casuística de n total = 181 pacientes (Figura 5).

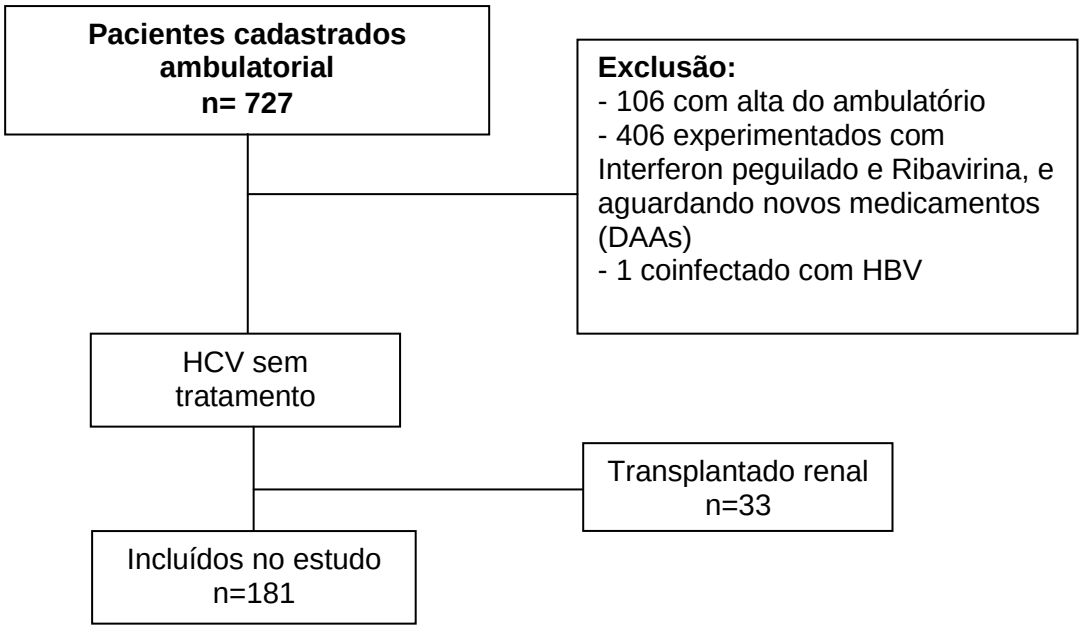


Figura 5 . Diagrama de fluxo de inclusão dos pacientes

Na Tabela 7 encontram-se as características demográficas gerais da amostra estudada com idade média de 53,7, IMC médio de 26,7, proporção de

homens foi de 54,2% e mulheres de 45,8%. Dos 81 pacientes, 46,5% tinham diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e 25,6% diabetes mellitus tipo 2 (DM). Nestes pacientes prevaleceu o genótipo 1 com 81%, seguida do genótipo 3 com 17% e por último o genótipo 2 com 2%. O grau de fibrose hepática está distribuído entre fibrose grau 1 com 36,3%, fibrose grau 2 com 9,5%, fibrose grau 3 com 6,7% e fibrose grau 4 com 34,6%.

Tabela7. Frequência relativa dos participantes do estudo portadores do vírus da Hepatite C.

Variável	n	% ou Média
Idade	181	53,7
IMC	179	26,7
Sexo		
Masculino	97	54,2%
Feminino	82	45,8%
HAS		
não	92	53,5%
sim	80	46,5%
DM		
não	128	74,4%
sim	44	25,6%
Genótipo		
1	136	81%
2	3	2%
3	29	17%
Fibrose		
F0	23	12,9%
F1	65	36,3%
F2	17	9,5%
F3	12	6,7%
F4	64	34,6%

5.2 Perfil sorológico do vírus da Hepatite E

Foram considerados a positividade para a hepatite E para aqueles que possuíam marcadores sorológicos para anti-HEV IgG, anti-HEV IgM e PCR quantitativo R*eal Time in house.*

O Anti-HEV IgG foi positivo em 22 (12,0%) e Anti-HEV IgM positivo em 3 (1,6%) pacientes. O PCR quantitativo HEV *Real Time* apresentou fraca evidência de amplificação em 9 (4,9%) pacientes, tendo sido o resultado considerado como inconclusivo (Figura 6). Desta forma, para confirmarmos este resultado realizamos à amplificação com PCR quantitativo do kit comercial Eurobio® que demonstrou resultados negativos para os 9 casos inconclusivos de HEV RNA *Real Time in house*.

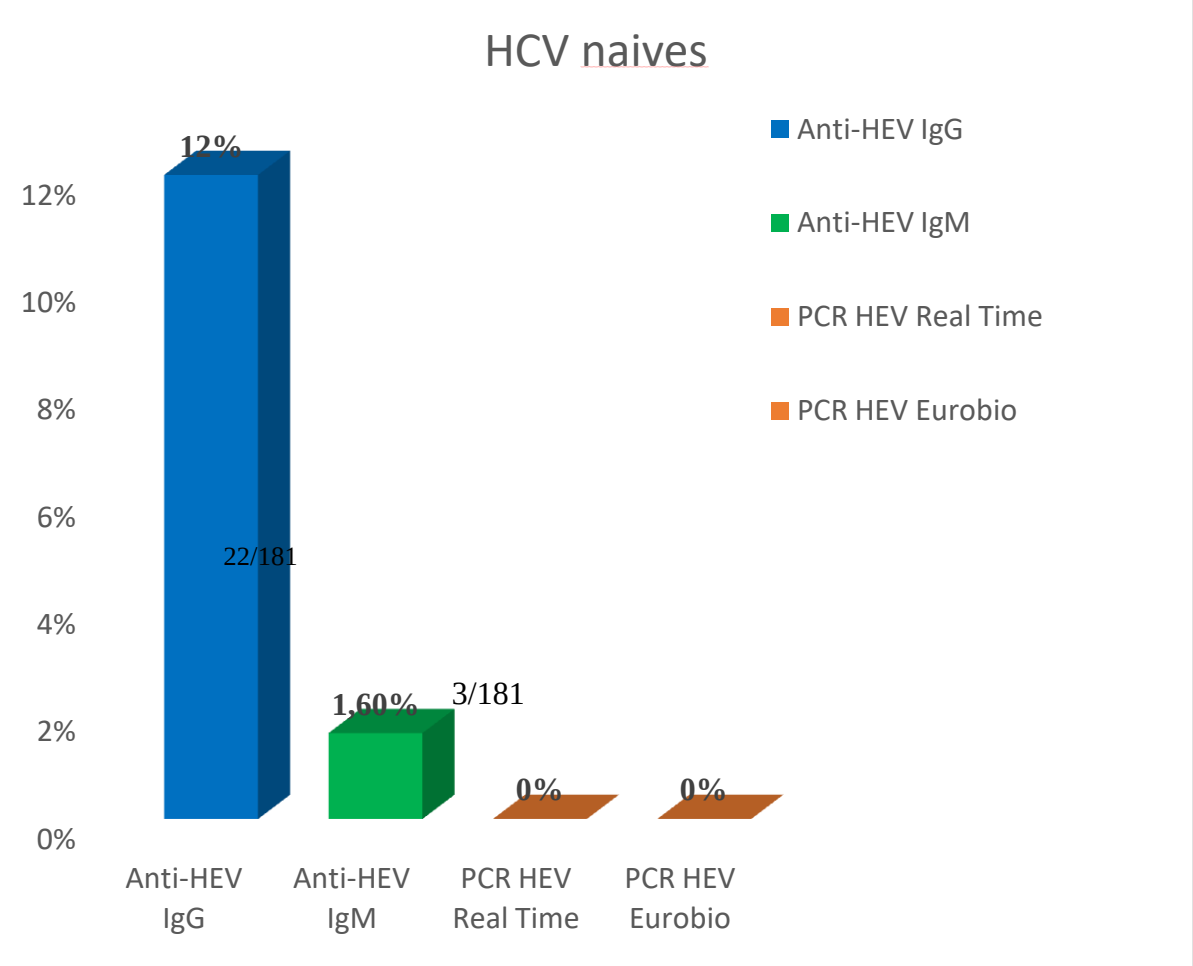


Figura 6. Gráfico com a distribuição da frequência pelos marcadores para o vírus da Hepatite E em pacientes HCV virgens de tratamento.

A distribuição da frequência de pacientes com as possíveis combinações de resultados está apresentada na Tabela 8. Entre os resultados, apenas 01 caso apresentou resultado positivo concomitante para Anti-HEV IgG e Anti-HEV IgM.

Tabela 8 - Frequência de pacientes com diferentes combinações dos resultados de testes para HEV

REAL TIME	Anti-VHE IgM	Anti-VHE IgG	Frequência
negativo	negativo	negativo	155
negativo	negativo	positivo	21
negativo	positivo	negativo	2
negativo	positivo	positivo	1

5.2 Perfil demográfico

Os dados demográficos dos grupos monoinfectados por HCV e os coinfectados HEV-HCV apresentaram resultados homogêneos com média de idade de 53,1 *versus* 57,8 (p=0,058), com proporção de 46,8% *versus* 37,5% para o sexo masculino (p=0,531). O IMC do grupo HCV foi de 26,5, enquanto que o IMC do grupo HEV-HCV foi de 27,8 (p=0,367), demonstrando médias IMC >25 em ambos os grupos.

Em relação à presença de comorbidades, observamos que 43,5% dos pacientes monoinfectados apresentaram hipertensão arterial sistêmica (HAS) *versus* 54,2% dos coinfectados (p=0,602), assim como para dislipidemia com 13,6% *versus* 8,0% (p=0,771), respectivamente. O grupo coinfectado HEV-HCV apresentou uma porcentagem maior de diabetes mellitus tipo 2 (DM) com 50,0% em comparação a 20,8% dos monoinfectados (p=0,008) (Tabelas 9). E para os outros parâmetros os resultados foram homogêneos sem diferença estatística.

Tabela 9. Características demográficas e clínicas da comparação dos pacientes HEV negativos com os pacientes HEV positivos.

	HEV negativo		HEV positivo		
Variável	**n**	**média± ou %**	**n**	**média± ou %**	**valor p**
Idade (anos)	155	53,1±13,0	24	57,8±10,4	0,058
Sexo masculino	72/154	46,8%	13/24	54,2%	0,602
Peso (kg)	148	71,8±15,4	23	72,6±22,1	0,870
Altura (m)	146	1,7±0,1	23	1,6±0,1	0,185
*IMC (kg/m²)	146	26,5±5,2	23	27,8±6,6	0,367
*HAS	67/154	43,5%	13/24	54,2%	0,602
*DM	32/154	20,8%	12/24	50,0%	0,008
*DLP	21/154	13,6%	2/24	8,0%	0,771
Anti-HBc total positivo	33/154	21,4%	7/24	29,2%	0,613
Anti-HBs positivo	65/154	42,2%	10/24	41,7%	0,603
Anti-HAV positivo	121/154	78,6%	19/21	79,2%	0,521

*IMC: Índice de Massa Corporal; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; DLP: Dislipidemia

Para avaliar a associação entre algumas variáveis e a ocorrência de Diabetes Mellitus, foram considerados modelos de regressão logística linear tendo Diabetes Mellitus e HEV, controlando além de idade, glicemia, IMC >30, insulina e score HOMA-IR, consideradas uma por vez. Os resultados estão indicados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores p para o efeito de diferentes variáveis em modelos de regressão logística

Variável controle	**Valor p HEV positivo**	**Valor p variável controle**
-	0.949	-
Idade	0.769	0.131
Glicemia	0.511	0.296
Insulina	0.996	0.481
HOMA-IR	0.997	0.569
IMC > 30	0.998	0.997

Os resultados não mostram evidências de que as chances de DM sejam diferentes para pacientes HEV positivos e negativos, mesmo controlando pelas variáveis indicadas. Um modelo com todas as variáveis incorporadas em conjunto indica resultado similar, com exceção de um efeito de idade (p=0,036).

Para avaliar a associação entre infecção por HEV e DM controlando pela idade, utilizou-se um modelo de regressão logística. O resultado indica que a chance de diabetes para pacientes HEV positivos é 2,84 (IC95% 1,22-6,64) vezes a chance de diabetes para pacientes HEV negativos (p=0,0158).

As sorologias para as outras hepatites virais também foram avaliadas e em ambos os grupos, obtivemos uma casuística de 21,4% e 29,2% de Anti-HBc total positivo (p=0,613), 42,2% e 41,7% de Anti-HBs positivo (p=0,603) e 78,6% e 79,2% de anti-HAV positivo (p=0,521).

Tabela 11. Perfil do vírus da hepatite C entre os grupos monoinfectados e coinfectados pelo HEV.

	HEV negativo				**HEV positivo**			
			IC 95%				**IC 95%**	
Variável	**n**	**%**	**Inf**	**Sup**	**n**	**%**	**Inf**	**Sup**
Carga viral HCV								
>850 mil copias	72	52,6%	44,2%	60,8%	11	40,7%	23,9%	59,4%
Genótipo HCV								
1	112	80,0%	72,8%	86,0%	25	83,3%	67,3%	93,3%
2	3	2,1%	0,6%	5,6%	0	0,0%		
3	25	17,9%	12,2%	24,8%	5	16,7%	6,7%	32,7%

Foram analisados os aspectos da infecção pelo HCV quanto à carga viral com PCR quantitativo HCV >850.000 cópias com 52,6% no grupo monoinfectado pelo HCV e 40,7% no grupo coinfectado HEV-HCV. Houve predomínio do genótipo 1 na população do nosso estudo sendo de 80% em monoinfectados e 83,3% entre os coinfectados, seguida do genótipo 3 com porcentagem de 17,9% e 16,7%, respectivamente (Tabela 11).

5.3 Dados clínicos e laboratoriais

Os dados laboratoriais estão representados na Tabela 12 com a comparação entre os grupos monoinfectado e coinfectado. A média da alanina aminotransferase (ALT) para os pacientes HEV-HCV foi de 59,6 e para o grupo HCV foi de 65,3 (p=0,444). A média de aspartato aminotransferase (AST) nos pacientes coinfectados HEV-HCV foi de 61,8 e nos pacientes monoinfectados HCV foi de 60,2 (p=0,872). E ambos os grupos apresentaram resultados acima dos valores de referência (ALT <31U/L para mulheres e <41 U/L para homens; AST <31U/L para mulheres e <37 U/L para homens). Para o grupo coinfectado HEV-HCV a média de plaquetas foi de 121,1 mil/mm³ e para o grupo monoinfectado HCV a média foi de 185,7 mil/mm³ (p<0,001).

Tabela 12. Características laboratoriais de pacientes HEV positivos com os pacientes HEV negativos relativamente às médias das variáveis contínuas.

	HEV negativo			**HEV positivo**			
Variável	**n**	**média**	**dp**	**n**	**média**	**dp**	**Valor P**
Albumina (g/dL)	153	4,2	0,5	24	4,0	0,6	0,173
Alfafetoproteína (ng/mL)	147	53.5	323.0	23	14,2	29,8	0,153
ALT (U/L)	154	65,3	48,0	24	59,6	49,8	0,444
AST (U/L)	154	60,2	48,4	24	61,8	46,3	0,872
Bilirrubina Total (mg/dL)	154	0,8	0,6	24	0,9	0,4	0.434
Creatinina (mg/dL)	153	1,3	1,8	24	1,2	2,0	0,856
Plaquetas (mil/mm³)	154	185,7	88,1	24	121,1	58,7	<0.001
Hemoglobina (g/dL)	153	14,0	1,9	24	13,0	2,4	0,061
INR	153	1,1	0,3	24	1,1	0,2	0,723

*ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirrubina total; Cr: Creatinina; Hb: hemoglobina; INR: Razão normalizada internacional;

O grau de fibrose foi estratificado em fibrose grau 2 ou inferior e fibrose grau 3 ou superior, e quando comparada entre os grupos monoinfectado HCV e coinfectado HEV-HCV em F3 e F4 sua proporção foi de 36,1% *versus* 75,0% (p<0,001), respectivamente.

Ao avaliar os métodos não invasivos para fibrose hepática, consideramos os valores de fibrose equivalente a fibrose grau 3 o valor acima

de de 9,5 quilo-pascais pela elastografia transitória por FibroScan® entre os grupos com proporção de 69,2% para os coinfectados HEV-HCV e 35,9% para os monoinfectados HCV (p=0,020). Para o score APRI, o grupo monoinfectado HCV demonstrou uma média de 1,7±2,4 e para os coinfectados HEV-HCV foi de 2,4±2,6 (p=0,080).

Os dados sobre a cirrose hepática e suas complicações está resumida na Tabela 13. Os casos positivos para HEV, ao mensurar se haviam mais hipertensão portal com presença de varizes de esôfago, apresentaram 41,7% *versus* 22,1% para o grupo monoinfectado HCV (p=0,107). Quanto as complicações da cirrose o grupo monoinfectado HCV apresentou 10,4% de ascite e no grupo coinfectado HEV-HCV 29,2% (p=0,025), assim como a presença de encefalopatia foi de 3,2% no grupo monoinfectado HCV e 4,2% no grupo coinfectado HEV-HCV (p=0,953). A média do MELD foi de 10,1±3,4 para os pacientes HCV isolado e 8,9±1,6 para os pacientes coinfectados HEV-HCV (p=0,060).

Tabela 13. Comparação de pacientes HEV positivos com os pacientes HEV negativos relativamente as complicações da doença do fígado.

	HEV negativo		**HEV positivo**		
Variável	**n/total**	**média± ou %**	**n/total**	**média± ou %**	**Valor p**
Fibrose F3/F4	56/154	36,4%	18/24	75,0%	<0,001
Fibroscan > 9,5 kPa	42/117	35,9%	9/13	69,2%	0,020
*APRI	153	1,7±2,4	24	2,4±2,6	0,216
Varizes esofágicas	34/154	22,1%	10/24	41,7%	0,112
Ascite	16/154	10,4%	7/24	29,2%	0,026
Encefalopatia	5/154	3,2%	1/24	4,2%	0,953
MELD	48	10,1±3,4	14	8,9±1,6	0,060

*APRI: ***A****ST to* ***P****latelet* ***R****atio* ***I****ndex*

Apesar das complicações demonstradas anteriormente, a análise do score MELD e das três categorias do score CHILD-PUGH entre os dois grupos não houve diferença estatística com p=0,060 e p=0,415, respectivamente.

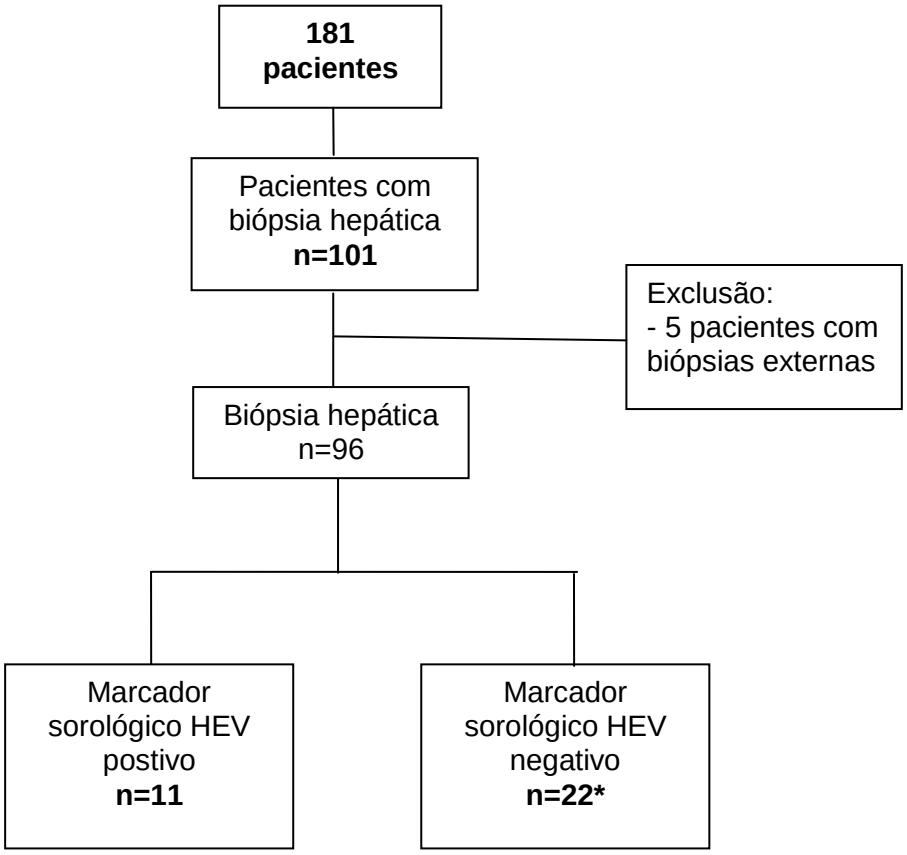
Tabela 14. Comparação de CHILD-PUGH para os cirróticos.

	CHILD			
	A	**B**	**C**	**Total**
HEV negativo	34 (72,3%)	12 (25,5%)	1 (2,2%)	47 (100%)
HEV positivo	8 (57,1%)	6 (42,9%)	0 (0%)	14 (100%)

Valor P = 0,415

5.4 Análise da histologia hepática

Apesar de 96 pacientes possuírem biópsias hepáticas, somente 11 destes possuíram marcador sorológico positivo para HEV. Portanto, com base nestes pacientes, realizamos o pareamento na proporção de 2:1 quanto à idade, gênero, genótipo do HCV e grau de fibrose hepática na biópsia hepática.



*pareamento com os casos de HEV e HCV com proporção de 1:2

Figura 7. Diagrama de fluxo da análise histológica

Tabela 15 – Análise histológica entre grupos caso-controles de coinfectado HCV e HEV e monoinfectados.

	Valor-p			Intervalo de confiança (95%)	
Variável	**Woolf**	**C-M-H**	**OR**	**limite inferior**	**limite superior**
Hepatite crônica					
Fibrose/arquitetura	0,998	0,944	0	0	infinito
Infiltrado inflamatório portal	0,831	0,682	0,5	0,124	infinito
Atividade de interface	0,937	0,623	0,5	0,107	infinito
Atividade parenquimatosa	0,982	0,699	0,571	0,104	infinito
Esteatose					
Esteatose	NA	0,467	NA	NA	NA
Esteato-hepatite	0,999	0,659	0,5	0,042	infinito
Balonização	0,999	0,773	0	0	infinito
Hialina de mallory	0,999	0,599	0	0	infinito
Alterações portais					
Plasmócitos	0,966	0,377	2,25	0,378	infinito
Eosinófilos	0,877	0,553	0,9	0,242	infinito
Neutrófilos	0,906	0,666	0,7	0,174	infinito
Edema	0,998	0,692	0,5	0,049	infinito
Atrofia biliar	0,999	0,24	infinito	0	infinito
Inflamação ductal	0,999	0,24	infinito	0	infinito
Alterações colestáticas					
Reação ductular	0,996	0,923	0	0	infinito
Células inflamatórias lobulares					
Monolike	0,999	0,638	0	0	infinito
Plasmócitos	0,982	0,699	0,57	0,104	infinito
Eosinófilos	0,928	0,785	0,333	0,074	infinito
Neutrófilos	0,939	0,885	0,25	0,058	infinito
Siderose					
Kuppfer	0,999	0,24	infinito	0	infinito

Woolf: teste de homogeneidade de razões de chances entre estratos; **C-M-H (***Cochran-Mantel-Haenszel*): teste de que a razão de chances comum é maior do que 1; **OR:** estimativa de Cochran-Mantel-Haenszel para a razão de chances comum a todos os estratos.

Conforme descrito na Tabela 15, em todas as variáveis analisadas e aplicadas o teste Woolf de homogeneidade de razões de chances entre estratos (caso *versus* controle) e o teste *Cochran-Mantel-Haenszel* (C-M-H) que a razão de chances comum é maior do que 1, não houve significância estatística.

5.4 Análise do seguimento dos pacientes

O início das coletas de dados e laboratoriais foi em 2013. Portanto, realizamos o seguimento destes pacientes e conseguimos caracterizar a evolução destes durante este período de seis anos.

5.4.1 Seguimento dos pacientes com anti-HEV IgM

Os 3 pacientes que apresentaram resultados positivos para anti-HEV IgM estão caracterizados na tabela abaixo. Sendo que o paciente nº 35 foi o único da casuística com os dois marcadores sorológicos positivos (anti-HEV IgG e IgM).

Tabela 16. Caracterização dos pacientes com anti-HEV IgM positivo

ID	Genero	Idade	Fibrose	VE	Ascite	EH	CHILD	MELD	Desfecho
35	M	47	Grau 4	Sim	Sim	Grau ½	B8	12	Óbito
142	F	39	Grau 4	Sim	Sim	Não	B7	11	Seguimento
176	F	68	Grau 4	Sim	Não	Não	A5	8	Seguimento

*VE= varizes de esôfago; EH= encefalopatia hepática

5.4.2 Tratamento da hepatite C crônica

A partir da data da coleta do HEV analisamos se o paciente realizou ou não o tratamento para HCV. Dos 181 pacientes 113 (62,4%) realizaram o tratamento para a hepatite C crônica conforme demonstrado na Tabela. Destes, 48 (41%) fizeram o uso de Ribavirina.

Dos 24 pacientes com marcador sorológico positivo para HEV, 14 realizaram o tratamento para o HCV e 4 destes utilizaram a Ribavirina.

Tabela 17. Distribuição de frequências de uso de Ribavirina

	Uso de Ribavirina		
Tratamento	**Não**	**Sim**	**Total**
Interferon	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)
Telaprevir + Interferon	0 (0%)	4 (100%)	4 (100%)
Sofosbuvir	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Sofosbuvir + Daclatasvir	18 (45%)	22 (55%)	41 (100%)
Sofosbuvir + Simeprevir	36 (84%)	7 (16%)	44 (100%)
3D	10 (63%)	6 (37%)	16 (100%)

Quando analisamos o desfecho mortalidade daqueles que fizeram o tratamento com ribavirina, somente um paciente coinfectado morreu e dois pacientes monoinfectados realizaram o transplante de fígado. O tratamento para a Hepatite C destes foi realizada no período pós transplante hepático.

Tabela 18: Frequência de óbitos para pacientes que tomaram Ribavirina

	Óbito	
HEVV	**não**	**sim**
Negativo	42	0
Positivo	4	1

Tabela 19. Frequência de óbitos ou transplante de fígado para pacientes que tomaram Ribavirina

	Óbito ou transplante	
HEVV	**não**	**sim**
Negativo	40	2
Positivo	4	1

Foram utilizados também através de modelos de regressão logística com desfecho óbito e transplante para avaliar o efeito do tempo entre a coleta do HEV e o início do tratamento para HCV em pacientes HEV positivos e negativos. Em ambos os casos não houve evidências de que o tempo entre a coleta do HEV e o início do tratamento para HEV esteja associado com as

chances (*odds*) de óbito ou óbito e transplante de fígado para pacientes HEV positivos ou negativos (p=0,324 e p=0,213, respectivamente)

5.4.3 Fibrose e curva de sobrevida

Ao avaliarmos se houve progressão da fibrose hepática através do método não invasivo FibroScan, notamos que não houve evidências de diferença média entre a variação das medidas do Fibroscan (inicial - atual) para pacientes HEV positivos e negativos (p=0,377).

Tabela 20. Medidas resumo para a variação das medidas do Fibroscan (inicial - atual)

	Variação das medidas do Fibroscan (inicial - atual)				
HEV	**n**	**Mínimo**	**Médio**	**Desvio padrão**	**Máximo**
Negativo	94	-33,9	0,9	4,9	14,7
Positivo	11	-6,6	2,3	4,8	10,9

Também levantamos os números de pacientes que evoluíram para hepatocarcinoma celular (HCC). Foram 7 (4,4%) de 157 dos pacientes monoinfectados e 2 (8,3%) de 24 pacientes coinfectados HEV-HCV.

Em tempo, a média para os pacientes negativos para HEV foi de 17,3 meses e para os positivos foi de 0,7 meses para a ocorrência de HCC. No entanto, a diferença entre o tempo médio de progressão para HCC para pacientes HEV positivos e negativos não foi significativa (p=0,334). As medidas resumo para o tempo (meses) entre a coleta do HEV e a ocorrência de HCC estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21: Medidas resumo para o tempo (meses) entre a coleta do HEV e a ocorrência de HCC

	Tempo entre coleta do VHE e ocorrência de HCC				
HEVV	**n**	**Mínimo**	**Médio**	**Desvio padrão**	**Máximo**
Negativo	7	6,0	17,3	8,5	30,6
Positivo	2	0,0	0,7	1,0	1,4

Utilizamos a técnica de Kaplan-Meier para comparar as curvas de sobrevivência de pacientes HEV positivos e negativos tendo como instante inicial a data de coleta do VHE e como desfecho, i) só óbito ou ii) óbito ou transplante. As curvas correspondentes estão apresentadas nas Figuras 1 e 2. Em ambos os casos, pacientes positivos para HEV têm um desempenho significativamente pior que pacientes HEV negativos (p=0,002 para óbito e p=0,008 para óbito e transplante).

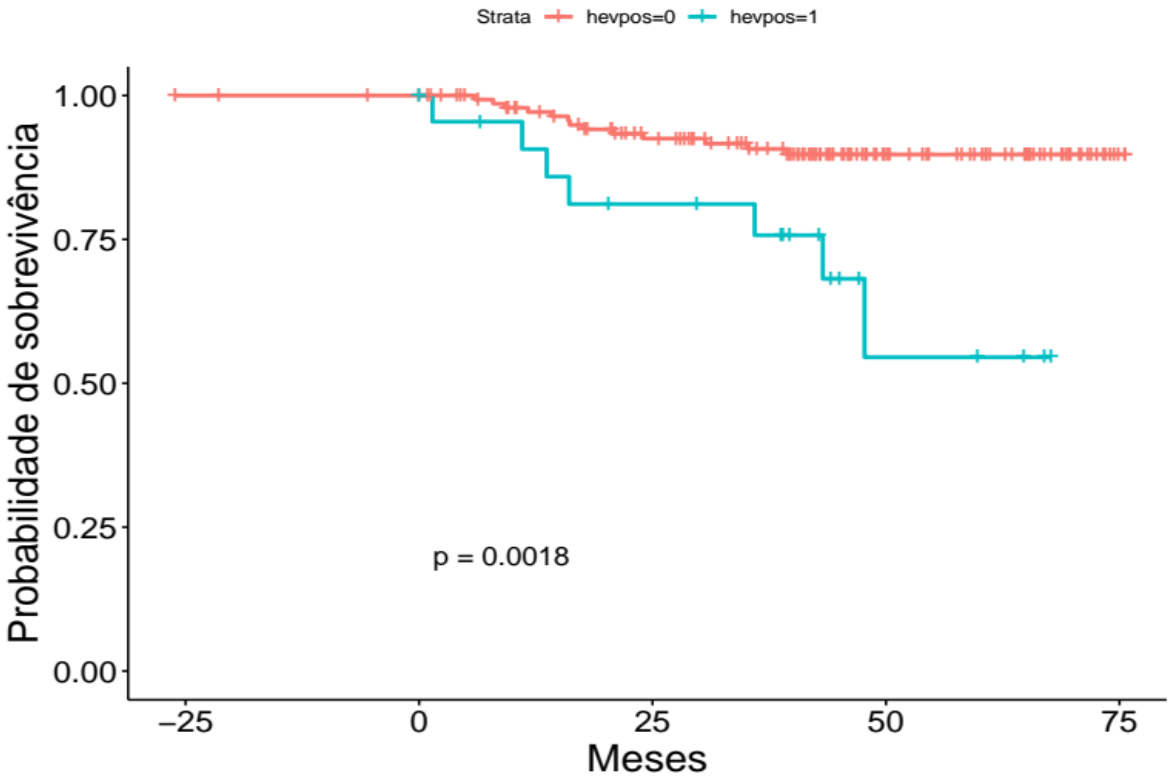


Figura 8. Curva de sobrevivência de pacientes HEV positivos e negativos com desfecho óbito

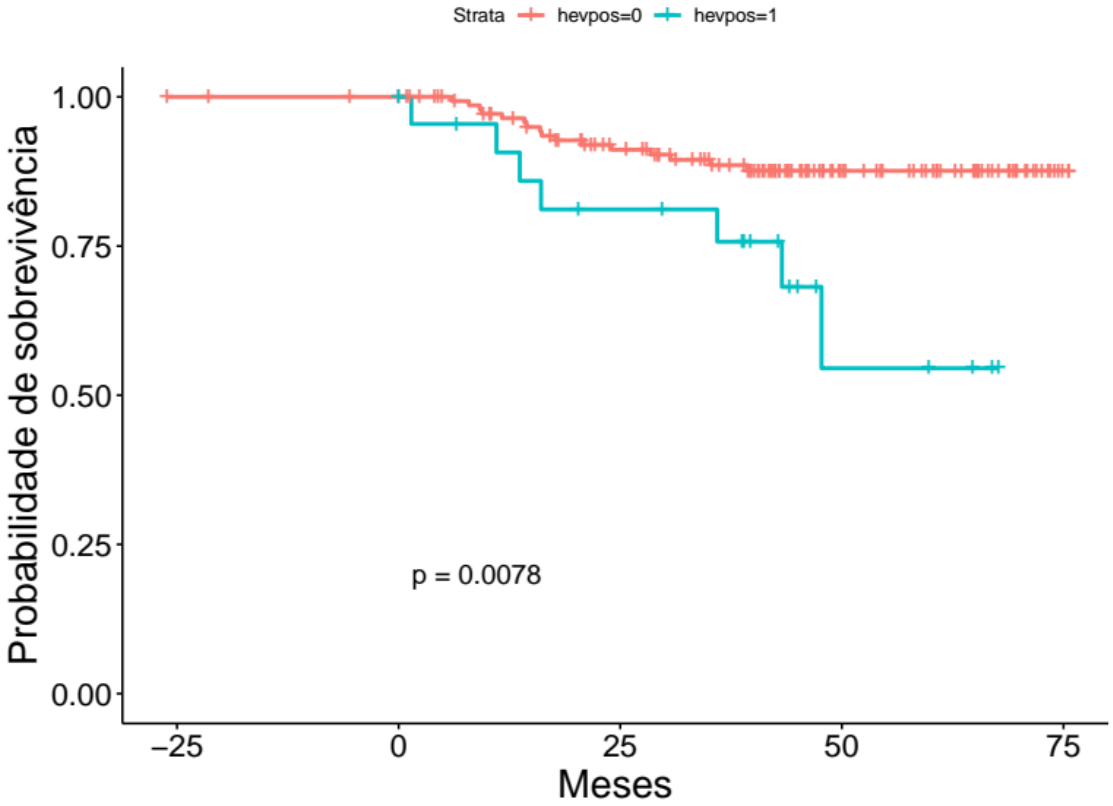


Figura 9. Curva de sobrevivência de pacientes HEV positivos e negativos com desfecho óbito e transplante

6. DISCUSSÕES

6.1 Aspectos gerais

O vírus da hepatite E se tornou um problema de saúde pública com o aumento significante de casos de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Inicialmente, foram evidenciadas algumas epidemias da doença em países subdesenvolvidos, em regiões onde não há uma condição sanitária adequada, sendo transmitida através do consumo de água ou alimentos contaminados. No entanto, a alta prevalência do vírus em países desenvolvidos foi o que tornou necessária a investigação sobre quais seriam suas formas de disseminação. (14, 59)

No Brasil, a prevalência do vírus da hepatite E em doadores de sangue e na população geral está em torno de 3% a 7%. (60) Neste presente estudo a soroprevalência de HEV é de 12% em pacientes com infecção crônica pelo HCV e sem tratamentos prévios para HCV. Resultando em uma prevalência significantemente maior que na população geral. Utilizando uma população semelhante à nossa em pacientes infectados pelo HCV, Bricks et al., em São Paulo, demonstraram uma soroprevalência do anti-HEV IgG semelhante à nossa, de 10,2%, no entanto, os autores informaram que 37,4% dos pacientes realizaram tratamento antiviral para o HCV, podendo dessa forma ter apresentado um resultado subestimado da presença do anti-HEV, uma vez que os tratamentos com Ribavirina, Interferon peguilado e antivirais podem eliminar o HEV. (61) Não foi avaliado neste último estudo, a prevalência do anti-HEV IGM ou o HEV RNA.

Conseguimos a amplificação do HEV RNA com PCR *Real Time* com resultados inconclusivos em 9 pacientes, não nos possibilitando afirmar a positividade para a infecção. Sendo assim, reanalisamos nos pacientes com estes resultados utilizando o kit comercial Eurobio® e obtivemos resultados negativos nos 9 pacientes inconclusivos. É descrito que há uma diferença de sensibilidade e especificidade entre os vários kits comerciais sorológicos, assim como para os ensaios de PCR HEV RNA. O fato de não possuirmos um método padrão ouro adequado para diagnosticar a infecção pelo vírus da

Hepatite E, torna difícil a distinção do verdadeiro positivo com o falso positivo e ou falso negativo. Além disso, já foi estabelecido que os anticorpos IgG anti-HEV não são neutralizantes, sendo possível que as reinfecções aconteçam tanto em pacientes imunodeprimidos quanto em pacientes imunocompetentes. (67) Ao mesmo tempo em que o HEV RNA pode ser detectado por PCR tanto na análise no sangue como nas fezes do paciente, o tempo de permanência de vírus detectável é por vezes curto e o resultado de PCR negativo não deve excluir imediatamente o diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite E. (68) No nosso estudo, a presença de marcadores sorológicos para o HEV foi associado a uma maior gravidade clínica da infecção pelo HCV, bem como a presença de diabetes, mas não conseguimos determinar a presença do HEV RNA. Desta maneira, como não conseguimos quantificar o HEV RNA em nossas amostras, também não foi possível determinar o genótipo na nossa casuística. (62-65) Segundo Echevarría JM *et al.* o genótipo prevalente no Brasil é o genótipo 3, porém são dados de casos isolados como de um paciente autóctone HEV e em animais infectados pelo vírus da Hepatite E, podendo demonstrar que um alto padrão socioeconômico e de saneamento básico não é suficientemente protetor contra o HEV, uma vez que a infecção causada pelo genótipo 3 do HEV é transmitido pelo consumo de alimento e não pelo consumo de água contaminada. (66)

Vários estudos compararam a detecção sorológica do HEV com os diferentes *kits* comerciais. Norder *et al*. comparou 5 ensaios sorológicos para detecção de anti-HEV utilizando kits comerciais Mikrogen, DSI, Euroimmun, Axiom e DiaPro. Foi observado que, apesar da alta sensibilidade para a detecção do anti-HEV, havia amostras de soro de pacientes imunocompetentes com o HEV RNA positivo na ausência de marcadores sorológicos para HEV. Hartl et al. comparou também entre os estudos europeus 5 ensaios para anti-HEV: Wantai, Mikrogen, MP-diagnostics, DiaPro e Abbott, demostrando que há uma diferença de soroprevalência entre os ensaios na população geral com 17%, 10%, 7%, 4% e 2%, respectivamente. Ao comparar com todos os outros ensaios, o ensaio anti-HEV IgG da Wantai, em geral, produz estimativas maiores de soroprevalência e tem sido considerado por muitos como o “padrão ouro”. (67)

6.2 Diabetes Mellitus e HEV

A infecção crônica pelo vírus da Hepatite C induz diversas complicações e algumas manifestações extra-hepáticas que estão fortemente associadas, tais como, *lichen planus,* crioglobulinemia mista, síndrome de Sjögren, doenças linfoproliferativas, porfiriria cutânea tarda, neuropatia, glomerulonefrite membranoproliferativa e vasculite crioglobulinemica (leucocitoclástica). E também estudos citam algumas possivelmente associadas, como a úlcera corneal, doença de tireoide, fibrose pulmonar, doença renal crônica, artralgias, mialgias, trombocitopenia autoimune, disfunção neurocognitiva e Diabetes tipo 2.(68-70)

Diabetes Mellitus 2 é um distúrbio endócrino comum que engloba mecanismos patogênicos multifatoriais, incluindo a resistência insulínica, aumento da produção de glicose hepática e um defeito na secreção de insulina, que contribuem para o desenvolvimento de hiperglicemia.

A infecção pelo vírus da hepatite C pode ocasionar alterações da sinalização da insulina, acarretando um bloqueio na liberação e na atuação da insulina, impedindo a sua regulação do metabolismo da glicose no organismo, ou seja, promovendo a resistência à insulina diretamente.

Tanto a resistência insulínica quanto a DM2 podem desempenhar um papel na alteração do curso natural da infecção pelo HCV, contribuindo para a evolução de maior esteatose hepática, esteato-hepatite e podendo acelerar a progressão da fibrose hepática. (71) .

Neste presente estudo, encontrou-se a associação entre infecção por HEV e DM controlando pela idade, com uma razão de chance para diabetes em pacientes HEV positivos de 2,84 (IC95% 1,22 - 6,64) vezes maior do que pacientes HEV negativos (p = 0.0158). Bricks G. *et al.* apresentou resultados semelhantes para resistência insulínica e a presença de anticorpos HEV, ajustados para idade, índice de massa corporal e presença de cirrose. Presença de resistência insulínica mostrou-se independentemente associada à presença do anti_HEV IgG (OR: 4,39; p = 0,045). (72) Apesar da infecção pelo HCV por si só aumentar a chance de um indivíduo desenvolver DM2, a

presença de coinfecção pelo HEV parece ser um fator de risco adicional para DM2.

Um estudo realizado na Índia em pacientes com infecção viral aguda pelo vírus da hepatite B demonstrou que a frequência de hepatite grave foi significativamente maior em diabéticos do que em não-diabéticos (5/12; 41,67% vs. 9/83; 10,64%, P <0,005), evidenciando que entre a presença de DM2 (OR 4,0 (IC 95% 0,96-16,47)) em pacientes com infecção viral aguda pelo vírus da hepatite B (OR 4,7 (IC 95% 1,34-16,47)) foi um dos fatores associados para a evolução para hepatite grave. (73)

Wallace, S *et al.* analisou em um estudo multicêntrico, em andamento, uma casuística escocesa de 371 pacientes com infecção pelo HEV demonstrando que 11,1% (n=41) tinham cirrose e 23,2% (n=86) eram portadores de DM2. Destes, 242 (65%) pacientes necessitaram de internação, totalizando 2255 pacientes internados-leitos-dia (mediana de permanência de 3 dias). Treze (3,5%) óbitos foram relacionados à presença do HEV, 10 com doença hepática crônica e 3 transplantados de fígado em imunossupressão. Dos quais 21 (5,7%) pacientes necessitaram de internação em cuidados intensivos. 27 (7,3%) pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda, aguda-crônica ou descompensada, com 2 necessitando de transplante. Os autores concluíram que a presença de cirrose, diabetes e imunossupressão estiveram associadas à evolução mais grave nesses pacientes. (74)

6.3 HEV e complicações da doença hepática

Ao mesmo tempo em que o mecanismo de cronicidade da doença pelo HEV ainda não está bem esclarecido, sendo mencionadas somente em estudos em pacientes imunossupriprimidos, principalmente em pacientes transplantados, pacientes portadores de HIV e aqueles com doenças hematológias ou reumatológicas. (75)

Em nossa série, não obtivemos resultados significantes para a elevação de alanina aminotransferase, assim como para outros parâmetros de exames laboratoriais que sugerissem uma hepatite aguda. Porém, 3 pacientes foram positivos para anti-HEV IgM que sinaliza uma infecção aguda e/ou agudizada.

Ao analisarmos este resultado e inclusive com evolução a óbito em 1 dos 3 pacientes, apresentavam uma cirrose com hipertensão portal e complicações hepáticas como ascite e encefalopatia hepática. Como já descrito na literatura, levantamos a hipótese da coinfecção pelo HEV ocasionar uma agudização da insuficiência hepática crônica funcionando como um fator de ACLF (acute on chronic liver failure). Demonstrando assim que o contato com o HEV ocasiona uma evolução mais grave e com desfechos piores.

Em regiões endêmicas, tais como no Oriente Médio e na Ásia, além dos casos de hepatites agudas, também foram relatados casos da infecção pelo vírus da Hepatite E ocasionando uma agudização da insuficiência hepática crônica (ACLF) e, que a sua mortalidade pode atingir taxas de 0% até 67%. De acordo com a Associação Americana para o Estudo do Fígado, AASLD (*American Association for the Study of Liver Disease*) e a Associação Europeia (*European Association for the Study of Liver Disease)* a definição de ACLF é "Deterioração aguda da doença hepática crônica preexistente, geralmente relacionada a um evento precipitante e associada ao aumento da mortalidade em 3 meses devido à falência de múltiplos órgãos do sistema".

Na nossa amostra, a presença de fibrose hepática grau 3 e 4 (Metavir), tanto através da histologia hepática por biópsia bem como por elastografia hepática por FibroScan® (método não invasivo para avaliação de rigidez hepática) nos pacientes com HEV positivo foi significativamente maior que nos pacientes HEV negativos ($p<0,001$ e $p=0,020$, respectivamente). A presença de ascite também foi maior nos pacientes HCV-HEV (29,2%) quando comparados aos pacientes HCV isolados (10,4%), demonstrando uma maior gravidade da doença pelo HCV ($p=0,026$). Outros estudos observaram resultados semelhantes, demonstrando que naqueles pacientes que possuem uma doença hepática adjacente, apresentam um prognóstico pior quando infectados pelo HEV. Um estudo realizado na Inglaterra, onde 164 pacientes foram testados com os marcadores sorológicos e 9,1% (n=15) tiveram resultados positivos e, dois destes tiveram resultados positivos também para PCR HEV RNA. 6 pacientes (42,8%) tinham doença hepática crônica subjacente e apresentavam descompensação hepática. (53) Lembrando que a detecção de Anti-HEV IgG e IgM pode persistir mesmo após meses de contato com o vírus.

Apesar de não termos demonstrado uma frequência maior de HCC nos pacientes com coinfecção pelo HEV em relação aos monoinfectados com HCV, a média de tempo entre a detecção do HEV para o aparecimento de HCC nos pacientes positivos para o HEV foi de 0,7 meses, enquanto a média de tempo para os pacientes negativos para HEV foi de 17,3, não atingindo diferença estatística significativa (p=0,334). O número pequeno de pacientes analisados em nossa amostra, bem como a impossibilidade de determinarmos o momento da infecção inicial pelo HEV, não nos permite tecer comentários mais conclusivos.

6.4 HEV e histologia hepática

Como foi impossível determinar o tempo inicial da infecção pelo HEV em nossa amostra, decidimos analisar as biópsias hepáticas à partir do desfecho fibrose, pareando os 11 pacientes HEV positivos que realizaram biópsia, com o dobro de pacientes HEV negativos, pareados também por idade, sexo, e genótipo do HCV, além da fibrose hepática com a finalidade de caracterizar os aspectos histopatológicos da infecção pelo vírus da hepatite E. (pareamento dos casos com controle na proporção de 1:2). Entretanto, apesar da análise minuciosa realizada por um único patologista (RYT), não observamos alterações peculiares à presença de infecção por HEV, diferentes das respectivas à infecção pelo vírus da hepatite C.

As principais características histológicas da hepatite E aguda são semelhantes ao da infecção pelo vírus da hepatite A, à vezes com maior inflamação com padrões de hepatite ou maiscom características mais colestáticas. Em indivíduos imunocompetentes a histologia pode apresentar desarranjo lobular, inflamação lobular e portal, bem como extensa necrose de hepatócitos e regeneração variada. Já nos achados histológicos em pacientes com doenças hepáticas adjacentes as carcterísticas são determinados pela patologia subjacente, mas podem ser mais graves. (76)

De acordo com Lenggenhager D. et al., os achados histológicos diferenciais mais importantes da infecção pelo vírus da Hepatite E demonstram que em pacientes com doença hepática subjacente ou naqueles que evoluem

para uma agudização da doença hepática crônica possuem características histológicas com padrões de cirrose, apresentando balonização e/ou infiltrados necroinflamatórios, hialinos de Mallory-Denk, agregados de células do Kupffer, com Siderose, além de um grau variável de necrose dos hepatócitos.

6.5 Tratamento

Assim como na diretriz europeia e alguns relatos de casos são mencionados tratamentos para HEV com o uso de Ribavirina e Interferon peguilado com taxa de 80% de resposta virológica sustentada (RVS), tanto em pacientes imunodeprimidos como em pacientes com agudização da insuficiência hepática crônica. (59) Sendo assim, todos os pacientes incluídos neste presente estudo foram selecionados por nunca terem realizado o tratamento contra o vírus da Hepatite C crônica, uma vez que na terapia antiviral para HCV na época do recrutamento de nosso estudo eram utilizados a Ribavirina e o Interferon peguilado.

Após a coleta da sorologia para HEV, dos 181 pacientes 113 (62,4%) realizaram o tratamento para a hepatite C crônica, 85% destes utilizaram os antivirais de ação direta (DAA) e 48 (41%) fizeram o uso associado de Ribavirina (RBV) no esquema terapêutico. Além disso, somente 15 (62,5%) pacientes com HEV positivo realizaram o tratamento para HCV e apenas 4 usaram a Ribavirina. A taxa de RVS foi de 87,7% e 80%, (foi analizado???) para os pacientes HEV negativos e positivos, respectivamente, não havendo diferença significativa entre o tempo da coleta de HEV e o início de tratamento para o HCV entre os dois grupos. Infelizmente, não foi realizado uma nova coleta de HEV após tratamentodo HCV para analisarmos se houve uma resposta virológica para o HEV ou mesmo para testarmos se houve ou não uma possível eliminação da supressão da replicação do HCV sobre o HEV, uma vez eliminado o HCV, já que sabemos existir uma predominância de poder replicativo de um vírus sobre o outro, como é descrito entre o HBV e o HCV.

Alguns estudos sugerem que o HCV suprime a replicação do HBV indiretamente por meio do mecanismo imune inato. Foram descritos na literatura casos de reativação da infecção pelo HBV após terapia antiviral anti-

HCV baseadas em DAA, inclusive com desfecho fatal. (77) Sendo assim, os *guidelines* da AASLD e do EASL recomendam realizar os testes para o HBV antes de iniciarem o tratamento para o HCV com os DAA.

Houve dois casos de infecção pelo HEV reportados por Rivero et. al. em pacientes coinfectados por HIV/HCV após o clareamento do HCV e, em ambos os casos apresentaram anti-HEV IgG negativos antes do tratamento com DAAs. Sugerindo, então, uma possível reativação ou reinfecção de HEV após RVS do HCV. (78) Levantando-se a hipótese de que após o tratamento do HCV com os DAA, as complicações da cirrose hepática poderiam estar associadas a reativação do HEV suprimido.

Recentemente, Del Bello et. al. mencionaram que não há evidências de infecção oculta pelo vírus HCV ou HEV em pacientes transplantados de fígado com RVS após tratamento com DAA, não havendo detecção do HCV RNA e HEV RNA sérico e em tecido hepático. (79)

Limitações do estudo

Uma das limitações deste estudo foi o fato de não podermos determinar o tempo de infecção tanto pelo vírus da Hepatite C quanto do vírus da hepatite E, na maior parte dos pacientes serem assintomáticos e nem todos relatarem um fator de risco de infecção aos vírus.

7 CONCLUSÕES

1. A prevalência do anti-HEV IgG (12,0%) nos indivíduos com infecção crônica pelo vírus C não foi superior aos estudos da literatura em nosso país.
2. Nos pacientes coinfectados pelos vírus da hepatite C e E, observamos presença de maiores complicações clínico/laboratoriais de doença hepática.
3. No subgrupo biopsiado, não observamos características histológicas particulares da coinfecção pelo HEV.
4. Estudos prospectivos são necessários para melhor avaliação do impacto da coinfecção pelo vírus E na progressão da hepatite crônica pelo vírus C.

REFERÊNCIAS

1. Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. Hepatology. 2011;54(6):2218-26.
2. Riveiro-Barciela M, Rodríguez-Frías F, Buti M. Hepatitis E virus: new faces of an old infection. Ann Hepatol. 2013;12(6):861-70.
3. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. J Virol. 2012;86(17):9134-47.
4. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013;10(1):24-33.
5. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. Viruses. 2016;8(8).
6. Aggarwal R, Goel A. Advances in hepatitis E - I: virology, pathogenesis and diagnosis. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;10(9):1053-63.
7. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, et al. Hepatitis E virus infection. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17086.
8. Teo CG. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. Epidemiol Infect. 2012;140(5):767-87.
9. Yazbek S, Kreidieh K, Ramia S. Hepatitis E virus in the countries of the Middle East and North Africa region: an awareness of an infectious threat to blood safety. Infection. 2016;44(1):11-22.
10. Kim JH, Nelson KE, Panzner U, Kasture Y, Labrique AB, Wierzba TF. A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. BMC Infect Dis. 2014;14:308.
11. Hakim MS, Wang W, Bramer WM, Geng J, Huang F, de Man RA, et al. The global burden of hepatitis E outbreaks: a systematic review. Liver Int. 2017;37(1):19-31.
12. Lapa D, Capobianchi MR, Garbuglia AR. Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries. Int J Mol Sci. 2015;16(10):25711-43.
13. Faber M, Willrich N, Schemmerer M, Rauh C, Kuhnert R, Stark K, et al. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. J Viral Hepat. 2018.
14. Capai L, Falchi A, Charrel R. Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature. Viruses. 2019;11(1).
15. Dalton HR, Stableforth W, Thurairajah P, Hazeldine S, Remnarace R, Usama W, et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2008;20(8):784-90.
16. Péron JM, Dalton H, Izopet J, Kamar N. Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? J Hepatol. 2011;54(6):1323-4; author reply 4-5.
17. Ramalingam S, Smith D, Wellington L, Vanek J, Simmonds P, MacGilchrist A, et al. Autochthonous hepatitis E in Scotland. J Clin Virol. 2013;58(4):619-23.

18. Carrilho FJ, Mendes Clemente C, Silva LC. Epidemiology of hepatitis A and E virus infection in Brazil. Gastroenterol Hepatol. 2005;28(3):118-25.
19. Pang L, Alencar FE, Cerutti C, Milhous WK, Andrade AL, Oliveira R, et al. Short report: hepatitis E infection in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1995;52(4):347-8.
20. Focaccìa R, Sette Júnior H, Conceição OJ. Hepatitis E in Brazil. Lancet. 1995;346(8983):1165.
21. Parana R, Cotrim HP, Cortey-Boennec ML, Trepo C, Lyra L. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibodies in patients from a referral unit of liver diseases in Salvador, Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(1):60-1.
22. Trinta KS, Liberto MI, de Paula VS, Yoshida CF, Gaspar AM. Hepatitis E virus infection in selected Brazilian populations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(1):25-9.
23. Passos-Castilho AM, de Sena A, Geraldo A, Spada C, Granato CF. High prevalence of hepatitis E virus antibodies among blood donors in Southern Brazil. J Med Virol. 2016;88(2):361-4.
24. Lopes Dos Santos DR, Lewis-Ximenez LL, da Silva MF, de Sousa PS, Gaspar AM, Pinto MA. First report of a human autochthonous hepatitis E virus infection in Brazil. J Clin Virol. 2010;47(3):276-9.
25. Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(2):117-22.
26. Souto FJ, Fontes CJ. Prevalence of IgG-class antibodies against hepatitis E virus in a community of the southern Amazon: a randomized survey. Ann Trop Med Parasitol. 1998;92(5):623-5.
27. Vitral CL, da Silva-Nunes M, Pinto MA, de Oliveira JM, Gaspar AM, Pereira RC, et al. Hepatitis A and E seroprevalence and associated risk factors: a community-based cross-sectional survey in rural Amazonia. BMC Infect Dis. 2014;14:458.
28. Gonçales NS, Pinho JR, Moreira RC, Saraceni CP, Spina AM, Stucchi RB, et al. Hepatitis E virus immunoglobulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. Clin Diagn Lab Immunol. 2000;7(5):813-6.
29. Bortoliero AL, Bonametti AM, Morimoto HK, Matsuo T, Reiche EM. Seroprevalence for hepatitis E virus (HEV) infection among volunteer blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, State of Paraná , Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006;48(2):87-92.
30. Pandolfi R, Ramos de Almeida D, Alves Pinto M, Kreutz LC, Frandoloso R. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. PLoS One. 2017;12(5):e0176409.
31. Santos DC, Souto FJ, Santos DR, Vitral CL, Gaspar AM. Seroepidemiological markers of enterically transmitted viral hepatitis A and E in individuals living in a community located in the North Area of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(5):637-40.
32. Assis SB, Souto FJ, Fontes CJ, Gaspar AM. [Prevalence of hepatitis A and E virus infection in school children of an Amazonian municipality in Mato Grosso State]. Rev Soc Bras Med Trop. 2002;35(2):155-8.

33. Paraná R, Vitvitski L, Andrade Z, Trepo C, Cotrim H, Bertillon P, et al. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in Northeastern Brazil: etiology and natural history. Hepatology. 1999;30(1):289-93.
34. Lyra A. Aspectos virológicos associados a pacientes com hepatite aguda viral: Universidade de São Paulo; 2003.
35. Souto FJ, Fontes CJ, Parana R, Lyra LG. Short report: further evidence for hepatitis E in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(2):149-50.
36. Freitas NR, Santana EB, Silva Á, Silva SM, Teles SA, Gardinali NR, et al. Hepatitis E virus infection in patients with acute non-A, non-B, non-C hepatitis in Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(11):692-6.
37. Passos-Castilho AM, de Sena A, Domingues AL, Lopes-Neto EP, Medeiros TB, Granato CF, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among schistosomiasis patients in Northeastern Brazil. Braz J Infect Dis. 2016;20(3):262-6.
38. Behrendt P, Bremer B, Todt D, Brown RJ, Heim A, Manns MP, et al. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. J Infect Dis. 2016;214(3):361-8.
39. Aggarwal A, Perumpail RB, Tummala S, Ahmed A. Hepatitis E virus infection in the liver transplant recipients: Clinical presentation and management. World J Hepatol. 2016;8(2):117-22.
40. Moraes AC. Avaliação da infecção pelo Vírus da Hepatite E em pacientes transplantados de fígado por infecção pelo Vírus da Hepatite C. : Universidade de São Paulo; 2017.
41. Ferreira AC, Gomes-Gouvêa MS, Lisboa-Neto G, Mendes-Correa MCJ, Picone CM, Salles NA, et al. Serological and molecular markers of hepatitis E virus infection in HIV-infected patients in Brazil. Arch Virol. 2018;163(1):43-9.
42. Riveiro-Barciela M, Buti M, Homs M, Campos-Varela I, Cantarell C, Crespo M, et al. Cirrhosis, liver transplantation and HIV infection are risk factors associated with hepatitis E virus infection. PLoS One. 2014;9(7):e103028.
43. Peters van Ton AM, Gevers TJ, Drenth JP. Antiviral therapy in chronic hepatitis E: a systematic review. J Viral Hepat. 2015;22(12):965-73.
44. Kamar N, Mallet V, Izopet J. Ribavirin for chronic hepatitis E virus infection. N Engl J Med. 2014;370(25):2447-8.
45. Pischke S, Hardtke S, Bode U, Birkner S, Chatzikyrkou C, Kauffmann W, et al. Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience. Liver Int. 2013;33(5):722-6.
46. da SM. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções. Brazil2017.
47. Sagnelli E, Sagnelli C, Pisaturo M, Coppola N. Hepatic flares in chronic hepatitis C: spontaneous exacerbation vs hepatotropic viruses superinfection. World J Gastroenterol. 2014;20(22):6707-15.
48. da Silva EF, Mazo DF, Oliveira CP, Medeiros RP, Carrilho FJ, Pessôa MG. HAV and HBV seroprevalence in 1,000 patients with chronic HCV infection in a Tertiary Care Center in São Paulo, Brazil. Ann Hepatol. 2016;15(5):691-5.
49. Rowe IA, Parker R, Armstrong MJ, Houlihan DD, Mutimer DJ. Hepatitis A virus vaccination in persons with hepatitis C virus infection: consequences of quality measure implementation. Hepatology. 2012;56(2):501-6.
50. Sagnelli E, Coppola N, Pisaturo M, Masiello A, Tonziello G, Sagnelli C, et al. HBV superinfection in HCV chronic carriers: a disease that is frequently

severe but associated with the eradication of HCV. Hepatology. 2009;49(4):1090-7.
51. Fischer C, Hofmann M, Danzer M, Hofer K, Kaar J, Gabriel C. Seroprevalence and Incidence of hepatitis E in blood donors in Upper Austria. PLoS One. 2015;10(3):e0119576.
52. Bayram A, Eksi F, Mehli M, Sözen E. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in patients with chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. Intervirology. 2007;50(4):281-6.
53. De Silva S, Hassan-Ibrahim MO, Austin M, Newport M, Verma S. Hepatitis E infection is an under recognized cause of acute decompensation in patients with chronic liver disease. Dig Liver Dis. 2012;44(11):930-4.
54. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature. 1989;339(6221):237-8.
55. Gayotto L. Visão histórica e consenso
nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. In: SBP/SBH C, editor. Brazil: Gastroenterologia Endoscopia Digestiva; 2010.
56. de Lédinghen V, Vergniol J. Transient elastography for the diagnosis of liver fibrosis. Expert Rev Med Devices. 2010;7(6):811-23.
57. Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, Wang Q, Jiang XJ, Zhan SH, et al. Performance of the aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index for the staging of hepatitis C-related fibrosis: an updated meta-analysis. Hepatology. 2011;53(3):726-36.
58. WOOLF B. The log likelihood ratio test (the G-test); methods and tables for tests of heterogeneity in contingency tables. Ann Hum Genet. 1957;21(4):397-409.
59. easloffice@easloffice.eu EAftSotLEa, Liver EAftSot. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. J Hepatol. 2018;68(6):1256-71.
60. Tengan FM, Figueiredo GM, Nunes AKS, Manchiero C, Dantas BP, Magri MC, et al. Seroprevalence of hepatitis E in adults in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Infect Dis Poverty. 2019;8(1):3.
61. Bricks G, Senise JF, Pott Junior H, Grandi G, Passarini A, Caldeira DB, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus in chronic hepatitis C in Brazil. Braz J Infect Dis. 2018;22(2):85-91.
62. Cattoir L, Van Hoecke F, Van Maerken T, Nys E, Ryckaert I, De Boulle M, et al. Hepatitis E virus serology and PCR: does the methodology matter? Arch Virol. 2017;162(9):2625-32.
63. Norder H, Karlsson M, Mellgren Å, Konar J, Sandberg E, Lasson A, et al. Diagnostic Performance of Five Assays for Anti-Hepatitis E Virus IgG and IgM in a Large Cohort Study. J Clin Microbiol. 2016;54(3):549-55.
64. Hartl J, Otto B, Madden RG, Webb G, Woolson KL, Kriston L, et al. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. Viruses. 2016;8(8).
65. Vollmer T, Diekmann J, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Monitoring of Anti-Hepatitis E Virus Antibody Seroconversion in Asymptomatically Infected Blood Donors: Systematic Comparison of Nine Commercial Anti-HEV IgM and IgG Assays. Viruses. 2016;8(8).
66. Echevarría JM, González JE, Lewis-Ximenez LL, Dos Santos DR, Munné MS, Pinto MA, et al. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. J Med Virol. 2013;85(6):1037-45.

67. Kmush BL, Labrique AB, Dalton HR, Ahmed ZB, Ticehurst JR, Heaney CD, et al. Two Generations of "Gold Standards": The Impact of a Decade in Hepatitis E Virus Testing Innovation on Population Seroprevalence. Am J Trop Med Hyg. 2015;93(4):714-7.
68. Gill K, Ghazinian H, Manch R, Gish R. Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. Hepatol Int. 2016;10(3):415-23.
69. Zignego AL, Craxì A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. Clin Liver Dis. 2008;12(3):611-36, ix.
70. Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB, infection IAotSoLCoEMoH. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. Dig Liver Dis. 2007;39(1):2-17.
71. Guo X, Jin M, Yang M, Liu K, Li JW. Type 2 diabetes mellitus and the risk of hepatitis C virus infection: a systematic review. Sci Rep. 2013;3:2981.
72. Bricks G, Senise JF, Pott-Jr H, Grandi G, Carnaúba-Jr D, de Moraes HAB, et al. Previous hepatitis E virus infection, cirrhosis and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. Braz J Infect Dis. 2019;23(1):45-52.
73. Singh KK, Panda SK, Shalimar, Acharya SK. Patients with Diabetes Mellitus are Prone to Develop Severe Hepatitis and Liver Failure due to Hepatitis Virus Infection. J Clin Exp Hepatol. 2013;3(4):275-80.
74. Wallace S, Swann R, Kemp L, Stratton L, Donnelly M, Murray A, et al. **Mortality and morbidity of hepatitis E in Scotland: A multicentre study**. The International Liver Congress; Vienna, Austria2019.
75. Kamar N, Del Bello A, Izopet J. Should Persistent Hepatitis E Virus Replication in Transplant Patients Be Tolerated? Transplantation. 2018;102(2):e84-e5.
76. Lenggenhager D, Weber A. An Update on the Clinicopathologic Features and Pathologic Diagnosis of Hepatitis E in Liver Specimens. Adv Anat Pathol. 2018;25(4):273-81.
77. Chen G, Wang C, Chen J, Ji D, Wang Y, Wu V, et al. Hepatitis B reactivation in hepatitis B and C coinfected patients treated with antiviral agents: A systematic review and meta-analysis. Hepatology. 2017;66(1):13-26.
78. Rivero-Juarez A, Frias M, Lopez-Lopez P, de Los Angeles Risalde M, Brieva T, Machuca I, et al. Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Anti-HEV Immunoglobulin G-Carrying Patients After Successful Hepatitis C Virus Treatment: Reactivation or Reinfection? Clin Infect Dis. 2017;64(7):964-6.
79. Del Bello A, Abravanel F, Alric L, Lavayssiere L, Lhomme S, Bellière J, et al. No evidence of occult hepatitis C or E virus infections in liver-transplant patients with sustained virological response after therapy with direct acting agents. Transpl Infect Dis. 2019;21(4):e13093.

ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em diferentes grupos populacionais em São Paulo

PESQUISADOR : João Renato Rebello Pinho

CARGO/FUNÇÃO: Coordenador do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical/ Pesquisador

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 51496

UNIDADE DO HCFMUSP: Gastroenterologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	x	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar a frequência de infecção presente e passada pelo vírus da Hepatite E (HEV) entre diferentes grupos de pessoas na cidade de São Paulo. O vírus da hepatite E se replica nas células do fígado e causa uma hepatite, que normalmente é curada espontaneamente após a eliminação do vírus pelo sistema imunológico da pessoa. Porém, as pessoas que estão com a resposta imunológica prejudicada (por exemplo as pessoas submetidas a transplante de órgãos ou pessoas infectadas pelo HIV), podem não conseguir eliminar o vírus, e então este continua se replicando nas células do fígado causando a inflamação crônica desse órgão. O processo crônico de inflamações do fígado pode resultar em cirrose e perda das funções hepáticas. O vírus da hepatite E também pode ser a causa de doença hepática em casos sem diagnóstico definido, além disso, pode provocar a piora da evolução da doença hepática em pessoas já infectadas com os vírus causadores das hepatites B e C. Atualmente, a pesquisa do vírus da hepatite E não é realizada de forma rotineira em nosso serviço, portanto, esse estudo será importante não só para o diagnóstico da infecção, mas também para sabermos se há necessidade de implantação desse teste para uso na rotina laboratorial do nosso serviço.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Para este estudo, além dos exames de rotina, serão coletados 3 tubos de sangue (1 seco e 2 com EDTA) contendo cerca de 4 ml de sangue cada um. Essas amostras de sangue serão submetidas a exames imunológicos para detecção de anticorpos que o organismo produz quando ocorre a infecção pelo HEV e também a exames de biologia molecular para detecção do material genético do vírus circulante na corrente sanguínea. Esses exames não são realizados de forma rotineira na Instituição.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

A coleta de sangue não envolve risco importante para a sua saúde, no entanto, pode ocasionar desconforto em função da picada da agulha, que é levemente dolorosa. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.

5 – Benefícios para o participante

O benefício direto para cada participante individualmente ocorrerá no caso de ser detectada a presença de infecção presente pelo HEV (presença de material genético do vírus no sangue). Nesse caso o participante será avaliado e encaminhado para o tratamento que for mais apropriado ao estado clinico do paciente.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Para este estudo não há procedimentos alternativos mais vantajosos que os propostos anteriormente.

7 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. JOÃO RENATO REBELLO PINHO, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar n° 500 prédio 2, 2° andar Telefone(s) (11) 3061-8218. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas: você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo, assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Solicitamos também a sua autorização para que o material coletado durante o estudo possa, eventualmente, ser utilizado em estudos futuros relacionados ao estudo de vírus causadores de hepatites virais e às mesmas questões que estamos tentando resolver com a presente pesquisa. Todo material coletado será armazenado no laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – FMUSP sob nossa responsabilidade e caso sejam úteis para futuros projetos somente serão utilizados após aprovação do novo projeto ao comitê de ética e de forma anônima. Ressaltamos que o não consentimento para o armazenamento desse material não implica em exclusão do voluntário do estudo.

Autorizo o uso do material armazenado para o desenvolvimento de projetos futuros desde que seja feito de maneira anônima.

( ) SIM

( ) NÃO

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "PESQUISA DE MARCADORES SOROLÓGICOS E MOLECULARES DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE E (HEV) EM DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS EM SÃO PAULO." Eu discuti com o Dr. Mario Guimarães Pessoa sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e estou ciente que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____