ADRIANO CLÁUDIO PEREIRA DE MORAES

**Avaliação da infecção pelo vírus da Hepatite E
em pacientes transplantados de fígado por
infecção pelo vírus da Hepatite C**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. Mário Guimarães Pessoa

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes, Adriano Cláudio Pereira de

Avaliação da infecção pelo vírus da hepatite E em pacientes transplantados de fígado por infecção pelo vírus da hepatite C / Adriano Cláudio Pereira de Moraes -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Mário Guimarães Pessoa.

Descritores: 1.Hepatite E 2.Sorologia 3.Biologia molecular 4.Hepatite C
5.Fibrose 6.Transplante hepático

USP/FM/DBD-293/17

**Dedico esta tese à Luzinete Pereira de Moraes,
minha querida mãe que sempre foi meu esteio e
torcedora incondicional de minhas conquistas, ao
meu amado pai Artur Ferreira de Moraes, eterno
incentivador dos meus sonhos e todos meus
queridos irmãos que estão comigo onde quer que
eu decida voar.**

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

O interesse pela vida acadêmica sempre esteve nos meus planos. Desde criança, ainda muito pequeno e sem saber o que a vida me preparava, sonhava em ser médico. Mas esse sonho ia além dos corredores de um hospital. Vislumbrava ser professor, doutor, poder ensinar o aprendido, correr o mundo fazendo ciências, experimentos e transmitir conhecimentos. Durante muitos anos esse desejo esteve cravado em minha mente e na primeira oportunidade que tive, não hesitei em poder realizá-lo. Agradeço imensamente a oportunidade me dada pelo Dr. Mário Pessoa e Michele Gomes, que hoje tenho como grandes ídolos, orientadores, incentivadores e agora, após essa longa jornada de aconselhamentos, posso dizer que são amigos que levarei por toda a vida. A admiração e gratidão serão eternas.

Não menos importante em minha carreira, agradeço a Dra. Leila Pereira pela confiança desde os primeiros anos sob sua orientação, por fazer parte de minha formação, por ter acreditado em meu potencial, pela oportunidade de ser minha orientadora no mestrado, pelos caminhos que me abriu ao viabilizar minha ida ao Kings College Hospital em Londres a fim de aprimorar meus conhecimentos em transplante de fígado. Agradeço imensamente e não menos ao Dr. Victorino Spinelli por todo conhecimento de vida e pelo ensinamento do amor ao paciente e à medicina. Meu imenso respeito.

Gratidão mais uma vez aos meus pais, Luzinete e Artur, pessoas simples, mas com ensinamentos de vida valiosos, construtores de meu carácter e incentivadores incansáveis em minha trajetória de vida. Agradeço a todos meus queridos irmãos que vibram comigo a cada conquista. Agradecimento especial à minha irmã Maria Teresa fonte inspiradora da carreira médica e às minhas irmãs Suely e Conceição Moraes por serem minhas mães em tantas ocasiões. Aos meus sobrinhos queridos que darão continuidade aos ensinamentos aprendidos por toda família. Gratidão a minha querida afilhada Maria Clara que sempre compreendeu minha ausência em momentos tão importantes de sua vida.

Além da atuação marcante de meu orientador, sem o empenho dos co-autores este estudo não seria possível, grato ao Dr. Flair Carrilho, Dr. Luiz Carneiro D'Albuquerque, Dr. Walter Ramalho, Dr. João Renato Pinho, Dr. Evandro Sobroza, Dr. Edson Abdala, Ariana Carolina e Debora Terrabuio. Devo uma gratidão especial à querida Dorothea pela ajuda em todo o trabalho de coleta de dados, sempre com boa vontade e empenhada em ajudar.

Grato aos meus amigos queridos que tornam meus dias cada dia mais felizes. Em especial à Edileuza Novais e Rodrigo Botelho, apoio de todas as horas e circunstâncias. Não menos Camila, Marília, Vasco e Marcelo irmãos que a vida me presenteou. Meu querido amigo irmão Ítalo Medeiros sempre tão receptivo em sua amizade, companhia e alojamento. Não menos importante irmãos que a vida me deu: Michel Colaço, Martin Reid e Jerrar Xavier. Vocês são presentes de Deus.

A gratidão se estende a todos os funcionários do HC-FMUSP onde fui recebido com todo carinho, respeito e profissionalismo.

Especialmente sou grato a todos os 294 pacientes que decidiram participar da pesquisa sempre acreditando que seu esforço em doação ajudaria na evolução da ciência e auxílio ao próximo.

Por último porém o mais importante de todos, ao senhor Deus que me permitiu realizar todos esses feitos e amar todas as pessoas aqui citadas.

Normatização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação d dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O vírus da hepatite E	2
1.1.1 Taxonomia, morfologia e organização genômica	2
1.1.2 Heterogeneidade genética e genótipos	3
1.2 Epidemiologia	6
1.3 Rotas de transmissão	10
1.4 Soroprevalência	12
1.5 Manifestações clínicas	15
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	37
3.1 Procedimentos de coleta	40
3.2 Pesquisa de marcadores sorológicos	41
3.3 Pesquisa de HEV RNA	41
3.4 Avaliação histológica	45
3.5 Tabulação e análise	50
3.6 Aspectos éticos	50
4 RESULTADOS	52
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO	76
7 ANEXOS	78
8 REFERÊNCIAS	83

Listas

ABREVIATÓES

ALT-	alanino aminotransferase
AST-	aspartato aminotransferase
CBP-	cirrose biliar primária
CEP-	colangite esclerosante primária
CMV-	citomegalovírus
DILI-	dano hepático induzido por droga
EBV-	vírus Epstein Baar
FA-	fosfatase alcalina
FDA-	departamento de administração de drogas e comidas
GGT-	gamaglutamiltransferase
HAI-	hepatite autoimune
HEV-	vírus da hepatite E
HIV-	vírus de imunodeficiência adquirido
IAH-	índice de atividade histológica
MTHFR-	metilenetetrahidrofolato redutase
NHANES III-	pesquisa nacional de saúde e nutrição
OMS-	organização mundial de saúde
ORF-	sistema aberto de leitura
PAF-	polineuropatia amiloidótica familiar
PCR-	reação de polimerase em cadeia
RNA-	ácido ribonucleico
RVS-	resposta virológica sustentada
SBH-	sociedade brasileira de hepatologia
SBP-	sociedade brasileira de patologia

TCLE-	termo de consentimento livre e esclarecido
VHB-	vírus da hepatite B
VHC-	vírus da hepatite C

TABELAS

Tabela 1 -	Classificação histológica das hepatites virais de acordo com a SBH/SBP.....	47
Tabela 2 -	Distribuição das características da atividade histológica de acordo com a classificação METAVIR	48
Tabela 3 -	Características gerais dos pacientes transplantados de fígado submetidos à investigação do HEV.....	55
Tabela 4 -	Avaliação dos marcadores sorológicos Anti-HEV IgG e molecular HEV-RNA de acordo com a etiologia da doença hepática que levou ao transplante.....	56
Tabela 5-	Avaliação dos níveis de AST, ALT e GGT entre os pacientes transplantados de fígado de acordo com a presença de marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV	57
Tabela 6 -	Avaliação demográfica dos pacientes transplantados de fígado de acordo com a presença de marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV	58
Tabela 7 -	Correlação de achados histológicos nos pacientes transplantados por VHC e positividade para marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV de acordo com a classificação da SBH/SBP	59
Tabela 8 -	Correlação de achados histológicos entre os pacientes com VHC e positividade para marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV de acordo com a classificação da METAVIR.....	61

Tabela 9 -	Correlação de achados histológicos dos pacientes submetidos ou não ao tratamento para o VHC de acordo com a classificação da METAVIR.....	62
-------------------	---	----

FIGURAS

- Figura 1 -** Organização genômica do HEV incluindo as 3 ORFs..... 2
- Figura 2 -** (A) Prevalência mundial do HEV e (B) Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HEV 4
- Figura 3 -** Diagnóstico da hepatite E. Evolução típica dos títulos sorológicos de anticorpos HEV- específicos e níveis de Alanino Aminotransferase (ALT) durante (A) infecção aguda auto-limitada e (B) infecção crônica pelo HEV..... 24

Resumo

Moraes ACPM. *Avaliação da infecção pelo vírus da hepatite E em pacientes transplantados de fígado por infecção pelo vírus da hepatite C* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução e Objetivos: A Hepatite pelo Vírus E (HEV) é uma infecção conhecida mundialmente por ter seu curso assintomático e autolimitado na maioria dos casos. Nos últimos anos, casos de evolução para cronicidade têm sido descritos envolvendo população de pacientes imunocomprometidos, particularmente os transplantados de órgãos sólidos. A prevalência da infecção pelo HEV na população de transplantados de fígado é ainda desconhecida em nosso meio. **Pacientes e Métodos:** Nós avaliamos parâmetros de infecção pelo HEV (HEV RNA, anti-HEV IgM e anti-HEV IgG) em uma coorte de 294 adultos transplantados de fígado seguidos no HCFMUSP. Para pesquisa dos anticorpos foi utilizada a metodologia ELISA (RecomWell HEV IgM/ IgG da Mikrogen®), sendo os resultados indeterminados e com IgM isoladamente positivo confirmados por Immunoblotting (RecomLine IgM/ IgG da Mikrogen®). Para pesquisa do HEV RNA utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real One-Step com primers e sondas que amplificam um fragmento da ORF3 do genoma viral. Foram avaliados dados demográficos e laboratoriais de toda população de transplantados. Posteriormente, foram analisadas apenas as biópsias hepáticas de 122 pacientes transplantados devido à Hepatite pelo Vírus C (VHC) possuidores ou não de marcadores sorológicos ou moleculares do HEV de acordo com a classificação METAVIR. **Resultados:** Amostras de 8,2% (24/294) dos pacientes foram positivas para anti-HEV IgG, 2% (6/294%) positivas para anti-HEV IgM e 5,8% (17/274) mostraram positividade para o HEV RNA. Apenas um paciente mostrou positividade tanto para anti-HEV IgM quanto para o anti-HEV IgG. Setenta e sete vírgula oito por cento (95/122) dos pacientes transplantados pelo VHC foram tratados com esquema que incluía ribavirina por um período mínimo de 6 meses antes da coleta do sangue. Dentre os transplantados pela cirrose por VHC que apresentaram positividade para o anti-HEV IgG apenas 37,5% (3/122) mostraram níveis de fibrose maior que 2, enquanto que 41,7% (5/122) dos positivos para o HEV RNA demonstraram níveis de fibrose maior que 2. Em geral, a prevalência do HEV no cenário pós transplante hepático parece ser baixa podendo não trazer um dano histológico significativo no cenário pós transplante. **Conclusão:** Nós concluímos que apesar de alguns estudos demonstrarem riscos de cronificação pelo HEV, esse vírus tem baixa prevalência em nosso meio e os pacientes transplantados de fígado pelo VHC que apresentaram marcadores sorológicos ou moleculares para o HEV não tiveram níveis mais acentuados de fibrose quando comparados com os pacientes que não apresentaram indícios de infecção pelo HEV no momento da análise.

Descritores: hepatite E; sorologia; biologia molecular; hepatite C; fibrose; transplante hepático.

Abstract

Moraes ACP. *Evaluation of hepatitis E virus infection in liver transplant patients due to chronic infection by hepatitis C virus* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Background and Aims: Hepatitis E Virus (HEV) is an infection known worldwide for its asymptomatic and self-limited course in most of the cases. In the last five years, cases evolving to chronicity have been described involving immunosuppressed patients, especially in recipients of solid organs transplants. The HEV infection prevalence in liver transplanted patients has yet to be fully assessed by our community. **Patients and Methods:** We evaluated laboratory parameters for the HEV infection (HEV RNA, anti-HEV IgM and anti-HEV IgG) in a cohort of 294 adult patients who had liver transplants on the HCFMUSP (Clinical Hospital of University of São Paulo School of Medicine). In order to investigate the antibodies, we used Elisa methodology (RecomWell HEV IgM/ IgG by Mikrogen®) and the indeterminate results and isolates positive anti-HEV IgM were confirmed by immunoblotting (RecomLine IgM/ IgG by Mikrogen®). For screening of HEV RNA, One-Step PCR in real time was used with primers and probes that amplify a fragment of the ORF3 from the viral genome. Laboratory and demographic data were collected in the entirety of the transplanted population. Following that, the hepatic biopsies of 122 patients transplanted due to Hepatitis C (HCV) were analysed with or without serological or molecular markers of HEV according to METAVIR score. **Results:** Serological samples of 24 (8.2%) of the patients tested positive for anti-HEV IgG, 06 (2%) were positive for anti-HEV IgM and 17 (5.8%) showed positive results for HEV RNA. Only one patient showed positive results for both anti-HEV IgM and anti-HEV IgG. Also, 95 (77.8%) of the patients transplanted because of the HCV infection received treatment including Ribavirin for at least 6 months before the blood sample collection. Among the transplanted patients due to HCV cirrhosis who presented positive results for anti-HEV IgG, only 3 (37.5%) showed fibrosis beyond stage 2, while 5 (41.7%) of the HEV RNA positive patients had liver fibrosis higher than 2. **Conclusion:** Overall, the prevalence of HEV in the post-hepatic transplant scenario appears to be low, seemingly not harmful histologically in the post-transplant cases. We have concluded that although some studies showed risks of HEV chronification, patients who had their livers transplanted due to HCV who showed serological or molecular markers for HEV did not have higher levels of fibrosis when compared to patients who showed no indications of HEV infection at the time of the analysis.

Descriptors: hepatitis E; serology; molecular biology; hepatitis C; fibrosis; liver transplantation.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da hepatite E

1.1.1 Taxonomia, morfologia e organização genômica

O vírus da Hepatite E (HEV) é um pequeno vírus não envelopado de aproximadamente 27-34 nm de diâmetro, sendo o único membro pertencente à família *Hepeviridae*. Consiste em uma partícula composta por um capsídeo de simetria icosaédrica formado por uma única proteína e um genoma viral, constituído por uma molécula de RNA de fita simples, polaridade positiva com cerca de 7,2 Kb, apresentando uma pequena região não codificadora nas suas extremidades 3' e 5' e três regiões codificantes (Open Reading Frames-ORFs), denominadas ORF1, ORF2 e ORF3¹⁻⁴ (Figura 1).

Fonte: Gastroenterology 2012;142:1388-97.

Figura 1- Organização genômica do HEV incluindo as 3 regiões codificantes

A ORF1 está localizada na região 5' terminal do genoma viral, sendo responsável pela codificação de uma poliproteína que origina importantes produtos proteicos não estruturais (Metiltransferase, RNA-dependente RNA polimerase, RNA helicase, papaína-cisteína protease), envolvidos no processo de replicação viral. A ORF2 e a ORF3, por outro lado, codificam proteínas estruturais, sendo que a ORF2 está localizada na extremidade 3' terminal do genoma e codifica a proteína do capsídeo viral, essencial para a fixação e entrada dentro da célula hepática e a partir daí, estimula a resposta imunológica do hospedeiro ^{1,2}. A ORF3, situada entre as ORF1 e ORF2, se sobrepõe parcialmente à extremidade 5'da ORF2, sendo a menor região codificante do genoma, responsável por produzir uma pequena fosfoproteína que se associa ao citoesqueleto e está responsável pela liberação do vírus, além de interagir com fatores celulares do hospedeiro, sendo portanto, essencial à infectividade do vírus ^{1,2,3}. As regiões não codificantes e as regiões localizadas na junção entre ORF1 e ORF2/ORF3 exercem um papel importante no processo de replicação do genoma viral.

1.1.2 Heterogeneidade genética e genótipos

Até o momento, cinco diferentes genótipos do HEV foram identificados, chamados 1, 2, 3, 4 e 5 e pelo menos 24 subgenótipos (1a-1e, 2a-2b, 3a-3j e 4a-4j), diferindo entre eles por sua sequência de nucleotídeos.

Cada genótipo de HEV apresenta distribuição geográfica específica (Figura 2).

Fonte: Gastroenterology 2012;142:1388-97.

Figura 2 - (A) Prevalência mundial do HEV e (B) Distribuição geográfica dos diferentes genótipos do HEV

Os HEV isolados de aves são geneticamente distintos com um genoma mais curto (6,6 Kb), apresentando semelhança em apenas 50% da sequência genômica com os dos mamíferos ². Acredita-se que apenas os genótipos 1, 2, 3 e 4 são capazes de causar doença aparente em humanos.

Os genótipos 1 e 2 infectam apenas humanos, ao passo que os genótipos 3 e 4 são patógenos zoonóticos tendo os porcos, javalis e veados como maiores reservatórios. Alguns dados sugerem que o genótipo 1 também seja capaz de infectar porcos, porém este dado ainda precisa ser confirmado por estudos adicionais ². O genótipo 1 foi isolado em casos de epidemia humana e em casos esporádicos de hepatite E em partes da Ásia, Índia e África do Norte, onde a doença é altamente endêmica, além de casos de hepatite E entre pessoas que viajaram de regiões de baixa endemicidade para regiões de alta endemicidade. O genótipo 2 foi inicialmente relatado após surtos de hepatite E no México e posteriormente em casos no Oeste da África (Nigéria e Chad) e América Central. Eles apresentam semelhança nucleotídica em 75% com o genótipo 1 ². O genótipo 3 foi inicialmente identificado em poucos casos localmente adquiridos de Hepatite E nos Estados Unidos, sendo posteriormente relatado nos humanos em vários países industrializados da Europa (Reino Unido, França, Holanda, Espanha, Áustria, Grécia, Itália), além do Japão, Austrália, Nova Zelândia, Korea e Argentina ². O genótipo 3 isolado apresenta 74-75% de semelhança nucleotídica com os genótipos 1 e 2. Vários casos foram descritos no Japão, onde indivíduos se tornaram infectados com HEV após comer carne crua infectada de veados. Cepas idênticas do HEV foram detectadas no Sudoeste

da França em salsichas de fígado de porco e em pacientes que apresentaram hepatite viral E aguda (HEV), indicando que carnes cruas ou mal cozidas com o HEV podem ter sido a causa da infecção ³. Por outro lado, o potencial antropozoonótico do genótipo 3 do HEV foi provado ser o causador de infecção em um paciente transplantado de fígado que tinha se alimentado de carne de porco ³. Dessa forma, a transmissão zoonótica representa um importante modo de transmissão do genótipo 3 do HEV e deve ser considerada a principal causa de casos autóctones de hepatite E na América do Norte e Europa ³. O genótipo 4 do HEV foi detectado em humanos e porcos, sendo encontrado em casos isolados de hepatite aguda na China, Taiwan, Japão e Vietnã, bem como em alguns países europeus ^{2,3}. Todos os genótipos compartilham pelo menos um grande epítipo sorológico com potencial de reação cruzada e pertencem a um único sorotipo ^{2,4}.

1.2 Epidemiologia

Distintos padrões epidemiológicos são identificados em regiões onde a doença é altamente endêmica e onde ela não é, diferindo nas rotas de transmissão, grupos populacionais afetados e nas características da doença ⁵.

O HEV é endêmico em países tropicais e subtropicais na Ásia, África e América Central. Nestas áreas, a infecção é mais frequentemente

transmitida através da rota fecal-oral, usualmente pelo consumo de água contaminada com fezes que pode afetar centenas a milhares de pessoas. Uma rota menos frequente de transmissão inclui ingestão de alimentos, transfusão de produtos sanguíneos contaminados e transmissão materno fetal ^{1,5}. Água contaminada é a principal fonte de infecção pelos genótipos 1 e 2 ¹. Os casos de hepatite E em regiões endêmicas são principalmente causados pelos genótipos 1 e 2, sendo os genótipos 3 e 4 isolados de forma muito rara. Grandes surtos de hepatites E têm sido descritos em vários países africanos e asiáticos, incluindo a Índia, China, Somália, Sul do Sudão e Uganda ¹. Dois pequenos surtos ocorreram no México entre os anos de 1986-1987 ^{1,4,5}. Os surtos podem variar de forma unimodal, que duram algumas poucas semanas, até múltiplos picos de surtos epidêmicos que podem durar vários anos ¹. A contaminação da água está frequentemente relacionada às chuvas e inundações, diminuição do escoamento de água nos rios e ao aumento da concentração de produtos contaminados, além dos vazamentos nas tubulações de água que passam por esgotos, contaminando o solo ⁵. Durante os surtos, 1-15% da população pode ser afetada ⁵. A disseminação de pessoa para pessoa não tem sido considerada uma forma incomum ⁴. Adultos jovens são os mais frequentemente afetados. A infecção em crianças ocorre em baixa frequência e geralmente é assintomática ^{1,5}. A infecção nos homens usualmente supera às mulheres possivelmente devido à maior exposição à água contaminada ^{1,4,5}.

Durante os surtos, as mulheres gestantes apresentam maior índice de mortalidade, especialmente por desenvolverem formas fulminantes ^{1,5,6}. Em

1978-1979, em um surto em Kashmir, 8,8%, 19,4% e 18,6% das gestantes no primeiro, segundo e terceiro trimestre respectivamente, tiveram doença icterica, comparadas com 2,1% das mulheres não gestantes e 2,8% dos homens ^{1,5,6}. Além disso, os casos de gestantes que desenvolveram insuficiência hepática fulminante (22%) são mais frequentes do que as não gestantes (0%) e do que nos homens (3%) ^{1,5}. Fatores imunológicos e hormonais podem estar envolvidos nesse grupo específico.

Nos últimos 15 anos, tem se tornado evidente que a HEV não é uma doença confinada apenas a países em desenvolvimento ou trazida pelos viajantes provenientes de regiões de alta endemicidade ⁴. Nos Estados Unidos, Europa (incluindo o Reino Unido, França, Holanda, Áustria, Espanha e Grécia) e países desenvolvidos da Ásia (Japão, Taiwan, Hong Kong e Austrália), a hepatite E é responsável apenas por casos ocasionais com hepatite viral aguda. Inicialmente, a maior parte desses casos estava relacionados a pessoas que viajavam para áreas de alta endemicidade. No entanto, recentemente, um crescente número de casos esporádicos de Hepatite E aguda localmente adquiridos têm sido relatados, possivelmente relacionados a ingestão de alimentos contaminados com o HEV ^{1,4,5}. Várias observações sugerem que os casos autóctones nessas áreas sejam causados por disseminação zoonótica proveniente de animais domésticos e selvagens ^{1,5}, uma vez que foram identificadas cepas do HEV em humano geneticamente relacionadas àsquelas isoladas dos suínos. Os HEV isolados nesses casos pertencem ao genótipo 3 ou 4, que também afetam animais ^{1,5}. Recentemente, foi descrito Hepatite E aguda em um grupo de

japoneses que teve consumo inadequado de carne de veado mal cozida ^{1,5}. A sequência genômica do HEV isolado desses casos foi idêntica àsquelas encontradas em carnes congeladas, estabelecendo assim a transmissão através de alimentos infectados com este vírus ⁵. Fígados de porcos comercialmente disponíveis nestas áreas podem conter os genótipos 3 e 4 do HEV. Estes achados juntamente com a associação de casos esporádicos de Hepatite E e consumo de fígado de porco cru ou mal cozido, sugerem que o consumo destes tipos de carne é responsável por pelo menos alguns desses casos ⁵. Mariscos contaminados também podem ser uma outra fonte potencial de contaminação.

Em regiões não endêmicas, acreditava-se que a doença localmente adquirida era incomum. No entanto, em anos recentes, o aumento no número de casos, especialmente devido aos genótipos 3 ou 4 do HEV nessas regiões têm sido reconhecido. Esses, encontram-se presentes especialmente em pacientes imunossuprimidos, homens com idade mais avançada, portadores de doenças co-existentes, hepatopatas crônicos, infectados pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), pacientes em uso de quimioterapia, além dos transplantados de órgãos sólidos, estariam mais susceptíveis à evolução para formas crônicas.

1.3 Rotas de transmissão

Os distintos genótipos diferem em suas rotas de transmissão ¹. Os surtos epidêmicos causados pelos genótipos 1 e 2 ocorrem especialmente nos países subdesenvolvidos através do consumo de água contaminada, ao passo que as infecções esporádicas causadas pelos genótipos 3 e 4 em países desenvolvidos, usualmente ocorrem devido ao consumo de alimentos contaminados ¹. O HEV tem sido detectado em uma grande variedade de produtos alimentícios, em particular, salsichas de porco, javalis selvagens, veados e coelhos, na França, Estados Unidos, Holanda e Alemanha ¹, além de também ser encontrado em mariscos, mexilhões, vegetais verdes e morangos. O consumo desses alimentos crus ou mal cozidos aumenta a possibilidade de aquisição da infecção desse vírus ¹. Dessa forma, tem-se observado que pessoas em contato com suínos e veados, como fazendeiros, veterinários e trabalhadores de abatedouros, apresentam maior prevalência de infecção pelo HEV quando comparadas à população em geral ¹.

Apenas poucos casos de infecção pelo HEV foram supostamente adquiridos através de transfusão sanguínea ⁸. Entre 34 pacientes transplantados de órgão sólido que apresentaram infecção pelo HEV, 2 pacientes tinham recebido transfusão sanguínea no período de 3 meses, antes da infecção ser detectada. Ainda neste estudo, sangue de 10 doadores foi testado para o HEV utilizando testes sorológicos e moleculares.

Anti-HEV IgM foi detectado em apenas um doador. Todos os pacientes tiveram anti-HEV IgG e HEV RNA negativos no soro ⁹.

Em áreas endêmicas, o HEV é frequente causa de Hepatite Viral aguda na gestação. Contudo, a causa da gravidade da infecção neste grupo ainda não é completamente conhecida. A alta mortalidade em gestantes está associada apenas à infecção pelo genótipo 1, não havendo até o momento, nenhum relato de infecção causada pelos genótipos 3 e 4 ^{1,5}. No entanto, o genótipo 2 já foi detectado em casos de insuficiência hepática aguda em gestantes durante um surto em Namíbia ^{1,5}. A infecção pelo HEV quando transmitida verticalmente, ocorre por via intrauterina e perinatal, podendo causar, no feto e nos neonatos, doença hepática grave, com altos índices de mortalidade ^{1,5}. Felizmente, na maioria dos casos, o curso clínico na transmissão vertical do HEV é autolimitado, com curto período de viremia.

Em países subdesenvolvidos, o HEV pode ser responsável por cerca de 2.400 a 3.000 natimortos por ano, além de também estar relacionado à mortalidade materna antes do nascimento do feto. Outros estudos sugerem ainda que a gravidade da infecção na mãe e no bebê possa estar inter-relacionada, influenciando no curso da infecção materna ^{1,5}.

Até o momento, não há dados disponíveis na literatura se o HEV pode ser transmitido através do aleitamento materno ou se a infecção assintomática poderia influenciar o curso da gravidez. Dessa forma, estudos adicionais sobre a patogênese do HEV ainda são necessários para o entendimento do papel da transmissão transplacentária do HEV na mortalidade fetal.

A forma de transmissão de pessoa para pessoa do vírus ainda é controversa, sendo considerada incomum e possivelmente não contribui de forma significativa com a mortalidade durante as epidemias. No entanto, em países subdesenvolvidos, a má higienização das mãos e o compartilhamento de copos e outros utensílios domésticos podem ser responsáveis por aumentar a chance de disseminação de indivíduo para indivíduo durante os períodos de surtos.

1.4 Soroprevalência

A avaliação da soroprevalência do HEV é determinada pela detecção do anti-HEV IgG, marcador de exposição prévia à infecção ^{1,5}. No entanto, a grande variação na sensibilidade e especificidade dos diversos kits de análise disponíveis, torna difícil a interpretação soro-epidemiológica ⁵. Além do mais, a duração da persistência desses anticorpos ainda não é completamente esclarecida ⁵. A comparação de diferentes kits comerciais usualmente utilizados revelou uma variação de 3,6% a 16,2% de positividade do anti-HEV IgG entre doadores de sangue no Reino Unido ¹⁰. Em outro estudo, cerca de metade dos pacientes que foram afetados durante surtos de hepatites E tiveram anti-HEV IgG detectado até 14 anos após a infecção ¹¹. Contudo, existem relatos de que níveis de anti-HEV IgG declinam significativamente dentro de 14 meses após a infecção ¹². Já nos Estados Unidos, a prevalência de anti-HEV IgG é de aproximadamente

25%¹³. A sensibilidade dos kits mais comumente utilizados varia entre 56 a 98%¹³.

Índices de prevalência do anti-HEV IgG são geralmente maiores em países subdesenvolvidos onde casos clínicos de hepatite E são mais comuns. Variações de prevalência podem ser vistas em áreas endêmicas, podendo estar presente em 30 a 80% dos casos¹³. Em países desenvolvidos, a prevalência do anti-HVE IgG varia de 1 a 20%⁵. Isso pode parecer elevado já que a Hepatite E é infrequente nestas áreas, podendo refletir exposição a animais infectados, infecção prévia subclínica, reação sorológica cruzada com outros agentes e/ou resultados sorológicos falso positivos⁵. Em um estudo realizado em aproximadamente 18.000 soros de pacientes coletados durante a terceira Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES III), nos Estados Unidos, os índices de soropositividade para o anti-HVE IgG foi de 21%, contrastando com a raridade da doença sintomática¹⁴. A positividade do anti-HEV IgG foi associada com a história de ingestão de fígados ou carnes, fortalecendo o papel da transmissão zoonótica por alimentos contaminados⁵. Outros fatores de risco incluem o sexo masculino, idade adulto jovem, etnia branca não hispânica, residência em áreas geográficas específicas, além do contato com animais de estimação.

Os dados de soroprevalência do HEV no Brasil ainda são limitados. Embora esta região seja classificada como moderadamente endêmica, a maior parte dos estudos não é atual e não deve ser comparada por serem amostras pequenas e com metodologias diferentes¹⁵. No Brasil, o HEV não

é rotineiramente investigado, mesmo nos casos onde as enzimas hepáticas estão inexplicavelmente elevadas ou nos casos de hepatite aguda. Além disso, há poucos laboratórios que realizam testes para detecção deste vírus. Dessa forma, a ocorrência e características específicas da hepatite E no Brasil continuam pobremente entendidas. Em estudo recente realizado em São Paulo, foram analisados testes anti-HEV realizados entre os anos de 1998 e 2013 no Estado e em sua área de abrangência que se estende do Sudeste ao Nordeste do Brasil, tendo como resultado a positividade para o anti-HEV IgG de 2,1%, porém variando de 0 a 8,6% anualmente. O anti-HEV IgM, disponível a partir de janeiro de 2006, se mostrou presente em 4,9% dos casos, variando de 0 a 8,8% ¹⁵. Um outro estudo realizado com 431 catadores de lixo recicláveis na cidade de Goiânia, região central do Brasil, demonstrou prevalência do anti-HEV IgG em 5,1% enquanto que o anti-HVE IgM foi de 0,7%, após confirmação pelo *immunoblot* ¹⁶.

No entanto, em vários países, um novo aspecto da infecção pelo HEV vem sendo observado com certa frequência nos últimos anos. Uma maior prevalência do HEV vem sendo relatada em grupos de pacientes imunossuprimidos, como receptores de órgãos sólidos, pacientes HIV positivos, portadores de doenças hematológicas malignas submetidos à quimioterapia e nos pacientes portadores de doenças hepáticas crônicas, tendo a possibilidade, inclusive de evolução para formas crônicas e rapidamente progredir até a cirrose ⁴. No primeiro trabalho publicado na *New England Journal of Medicine*, Kamar et al. descreveram 14 casos de hepatite

E entre transplantados de rim e de fígado, sendo que 8 deles evoluíram para cronicidade ¹⁷.

Considerando-se a variabilidade dos testes sorológicos e a acurácia da análise dos PCRs *in house*, torna-se difícil claramente definir a soroprevalência e incidência da infecção pelo HEV nos pacientes transplantados de órgãos sólidos. Dessa forma, os resultados devem ser avaliados com atenção ⁴. A prevalência da infecção do HEV em transplantados de órgãos sólidos pode variar entre 2,3% a 43,9%, dependendo do kit utilizado. De forma geral, a incidência baseada na detecção do HEV-RNA, varia de 0,9 a 3,5% ⁴. Porém quando observamos HEV RNA entre os pacientes transplantados com aumento do nível de enzimas hepáticas, a incidência é um pouco maior, atingindo índices entre 4,3 a 6,5% ⁴.

1.5 Manifestações clínicas

A maioria dos pacientes com infecção pelo HEV apresenta curso silencioso e autolimitado ^{1,3,5}, indistinguível de outras hepatites causadas por vírus hepatotrópicos ¹. Os sintomas clínicos ocorrem em apenas 2-5% dos pacientes com HEV aguda, como sugeriu um grande estudo vacinal duplo-cego placebo controlado que foi realizado na China com mais que 110.000 indivíduos envolvidos ¹⁸. Nos casos de infecção aparente, o índice de

mortalidade foi estimado entre 0,5 a 3%, levando à mais de 70.000 mortes/ano em todo mundo ¹⁹.

A infecção pelo HEV raramente está associada com sintomas clínicos na infância. Em casos sintomáticos, o período de incubação varia de 2 a 8 semanas, com uma média de 40 dias ³. Em áreas hiperendêmicas, a apresentação da infecção pelo HEV é de uma hepatite aguda icterica, usualmente durando poucas semanas com melhora espontânea dentro de 4 a 6 semanas (Figura 3). Os sintomas iniciais da hepatite E aguda são normalmente inespecíficos e incluem sintomas semelhantes ao resfriado, mialgia, artralgia, fraqueza e vômitos. Poucos pacientes desenvolvem icterícia, prurido, acolia fecal, colúria, acompanhado pelo aumento dos níveis de transaminases, AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanino aminotransferase), Bilirrubinas, Fosfatase Alcalina (FA) e Gamaglutamiltransferase (GGT) ³. Alguns pacientes podem apresentar doença grave, evoluindo com quadros de falência hepática aguda fulminante, particularmente em pacientes com alguma doença hepática crônica pré-existente e nas gestantes ^{2,3,17}, sendo necessário a introdução de terapia com antivirais e até a realização do transplante hepático ^{1,17}. A expressão reduzida dos receptores da progesterona foi associada com resultados fatais de hepatite E nas gestantes. Variações ou mutações nos genes codificadores dos receptores de progesterona podem alterar a expressão do MTHFR (Metilenetetrahidrofolato redutase), sendo dessa forma responsável por diversos processos metabólicos. No entanto, até o

momento, o papel preciso do MTHFR na patogênese da hepatite E não foi ainda esclarecido ^{3,17}.

Em áreas onde a hepatite E é comum, a superinfecção pode ocorrer em pessoas com doença hepática pré-existente assintomática de qualquer etiologia seja viral ou não viral, podendo haver descompensação aguda, levando a resultados desfavoráveis ^{2,5}.

Em pacientes imunocompetentes, a hepatite E associada à cirrose ou carcinoma hepatocelular ainda não foi relatada ³.

A Hepatite E é frequentemente apenas reconhecida após realização de testes sorológicos nos casos altamente suspeitos. É bem possível que muitos casos não sejam diagnosticados devido a indisponibilidade de testes ou não serem rotineiramente realizados. Indivíduos com injúria hepática inicialmente relacionada à droga (DILI), posteriormente tiveram o diagnóstico de infecção pelo HEV ⁵. Em um estudo recente, Chijioke O. et al. determinaram a frequência de infecção aguda pelo HEV em casos de DILI, notando que a frequência de infecção, determinada pela presença do HEV RNA no tecido, é substancialmente maior que na população em geral, mostrando que a infecção pelo HEV deve ser um diagnóstico diferencial nos casos sugestivos de hepatotoxicidade por drogas ²⁰.

Pacientes de áreas de baixa prevalência têm, em geral, idade um pouco mais avançada. São predominantemente homens, com histórico de doença hepática pré-existente ou uso abusivo de álcool e não apresentam sintomas específicos. O prognóstico da infecção pelo HEV parece ser pior em pacientes destas áreas do que os de regiões de alta endemicidade ². O

índice de mortalidade é mais elevado em regiões não endêmicas, possivelmente devido ao acometimento de idade mais avançada além da presença de doenças co-existentes ^{2,5}.

Infecção pelo HEV em indivíduos imunocomprometidos

Recentemente, apresentações clínicas não usuais da hepatite E têm sido demonstradas em regiões industrializadas de alta renda. Embora em geral não progrida para cronicidade, a infecção pelo HEV pode estar associada a viremias prolongadas, com períodos superiores a 6 meses, em pacientes imunocomprometidos como mostraram várias coortes de pacientes transplantados ²¹. Estes pacientes apresentam resposta humoral e celular comprometida contra o HEV, não havendo possivelmente um controle imunológico efetivo desta infecção ¹. Neste sentido, os pacientes HIV positivos com baixos níveis de células CD4+ apresentam maior risco de desenvolvimento de hepatopatia crônica pelo HEV ¹, bem como indivíduos com qualquer tipo de comprometimento imunológico, como nas doenças hematológicas que estão recebendo quimioterapia antineoplásica ¹ e nos pacientes dialíticos. Pacientes infectados pelo HIV, com doença hepática sem causa conhecida e sinais de cronificação, parecem apresentar maior prevalência de anticorpos contra hepatite E, quando comparado a grupos controles ²². Usualmente, a infecção viral persistente por cerca de 6 meses ou mais é considerada uma infecção crônica. No entanto, há uma tendência de se classificar como crônica, a persistência da infecção já após 3 meses sem que o clareamento espontâneo tenha ocorrido ¹.

Infecção pelo HEV em indivíduos transplantados de fígado

Casos de hepatite E crônica têm sido identificados em receptores de órgãos sólidos, podendo evoluir rapidamente até a cirrose ^{4,23}. Wedemeyer et al. pesquisaram a presença de anticorpos contra o HEV em 226 pacientes transplantados de fígado, 129 pacientes não transplantados com doença hepática crônica e em 108 pacientes saudáveis de um grupo controle. Os anticorpos foram detectados em apenas um paciente do grupo controle saudável (1%), em quatro pacientes com doença hepática crônica (3%) e em dez pacientes transplantados de fígado (4%). A presença do HEV RNA foi testada no soro de todos os pacientes transplantados, sendo encontrada em três deles. Dois evoluíram com viremia persistente, sendo que um deles desenvolveu fibrose avançada aos 22 meses após o transplante ²³. Dessa forma ele concluiu que embora a prevalência do HEV seja considerada baixa na Europa Central em transplantados de fígado, a hepatite E crônica deve ser considerada no diagnóstico diferencial dos enxertos com hepatite ²³. Em outro estudo, Haagsma et al. demonstraram que alguns casos de hepatite crônica de causa não identificada pós transplante, seriam de casos de hepatite E, tendo um dos casos evoluído para doença crônica, desenvolvimento de cirrose e necessidade de novo transplante sete anos após a hepatite crônica ter sido instalada ²⁴. Em geral, evoluções crônicas da infecção pelo HEV têm sido reportadas em aproximadamente 50-60% dos transplantados ¹. A hepatite crônica está frequentemente associada à elevação das enzimas hepáticas as quais usualmente não ultrapassam valores acima de 100-300 U/L ¹. No entanto, a progressão da fibrose pode

evoluir de forma rápida já nos primeiros anos da infecção, como demonstrado em vários casos que desenvolveram estádios finais de doença hepática crônica. Vale ressaltar que os casos de evolução para cronicidade do HEV estiveram exclusivamente relacionados ao genótipo 3 do vírus ^{1,3,5}. No entanto, um recente estudo chinês mostrou evidência de que o genótipo 4 também pode levar à evolução crônica da infecção, como observou-se em um caso de um garoto que recebeu quimioterapia devido a uma leucemia linfoblástica aguda ²⁵. Nota-se também que mesmo na Índia, onde o genótipo 1 é predominante, não há evidências de hepatite E crônica em coorte de transplantados renais, contribuindo com a informação de que o genótipo 1 não deve realmente ser responsável por formas crônicas da doença ²⁶. Na ausência de viagens a regiões endêmicas, a infecção localmente adquirida transmitida pela ingestão de alimentos contaminados apenas com os genótipos 3 ou 4 têm sido relacionada à evolução para cronicidade ²⁷.

Kamar et al., 2010, identificaram 14 casos de hepatite E aguda, sendo três transplantados de fígado, nove transplantados de rim e dois pacientes que realizaram transplante duplo rim-pâncreas. Todos eram positivos para o HEV RNA. A hepatite crônica se desenvolveu em oito pacientes, sendo confirmados por transaminases persistentemente elevadas, pelos níveis séricos do HEV RNA, além das características histológicas compatíveis com hepatite E crônica ²⁸. Em outro estudo também do mesmo autor em 2011, a evolução da infecção pelo HEV foi avaliada em 85 pacientes transplantados de órgãos sólidos, encontrando em 56 deles (65,9%) sinais de hepatite E

crônica. Em uma análise univariada, demonstrou-se que além do transplante hepático, baixos níveis de enzimas hepáticas, creatinina sérica e contagem de plaquetas no momento do diagnóstico do HEV, bem como o uso de tacrolimus mais do que da ciclosporina, foram fatores independentes que contribuíram para a cronicidade ²⁹.

Um outro estudo investigou a prevalência e o impacto da soropositividade do HEV em 115 pacientes com câncer e doença hepática relacionada ao vírus da hepatite C. Treze (11%) foram positivos para anti-HEV IgG. No geral, 41 (47%) dos pacientes tiveram cirrose, sendo o sexo masculino e a positividade para o HEV os fatores independentes associados com desenvolvimento da cirrose ³⁰.

Recentemente, foi relatada a transmissão do HEV em paciente previamente negativo para o HEV antes do transplante (anti-HEV e HEV RNA negativos), após ter recebido um fígado infectado de um doador com hepatite E oculta. Os testes sorológicos e moleculares se tornaram positivos já nos primeiros 150 dias após o transplante, assim permanecendo durante todo o período de evolução, levando ao desenvolvimento de cirrose 15 meses após o transplante ³¹.

Manifestações extra-hepáticas

Há inúmeras evidências de que a infecção pelo HEV possa estar associada a manifestações extra-hepáticas, sendo suportadas pelo fato de que dados *in vitro*, demonstram que o HEV pode ser capaz de se replicar em células não hepáticas como às do intestino humano e células de rins de

macacos ³². Em humanos, a infecção pelo HEV tem sido relacionada à redução da filtração renal associada a persistentes Crioglobulinemias e/ou Glomerulonefrites ^{1,3}. Manifestação de sintomas neurológicos não são incomuns em pacientes com HEV aguda ou crônica e podem ocorrer em 2-5% dos casos ³. Casos de Polirradiculopatias, Síndrome de Guillain-Barré, Neurite Braquial Bilateral, Encefalite ou Miopatia Proximal podem ser explicados, em parte, pela infecção crônica pelo HEV, porém os mecanismos e relevância ainda precisam ser melhor investigados ^{1,3}. Além disso, o HEV já foi identificado no líquido cérebro-espinhal de pacientes imunocompetentes com testes de função hepática alterados associados a quadros neurológicos compatíveis com Síndrome de Guillain-Barré que melhoraram após administração de imunoglobulina intravenosa ³³.

Pischeke et al. avaliaram a prevalência do HEV entre pacientes com Hepatite Autoimune (HAI) e Artrite Reumatoide (AR), comparando com grupos controle saudáveis através da avaliação do anti-HEV IgG e HEV RNA. O resultado encontrado foi de 7,7% de anti-HEV IgG nos pacientes com HAI, 3,5% em pacientes com AR e em 2% no grupo controle, demonstrando que a infecção pelo HEV deve ser investigada em pacientes com HAI que não respondam a terapia imunossupressora ³⁴.

Diagnóstico

Wedemeyer et al. sugerem que a investigação para o HEV através da pesquisa do HEV RNA deva fazer parte do algoritmo diagnóstico de todos pacientes transplantados ou infectados pelo HIV que apresentem elevação

de transaminases e hepatite aguda ou crônica de causa não identificada^{3,17,35}.

Alterações nos testes laboratoriais presentes nos pacientes com hepatite E aguda normalmente incluem aumento nos níveis séricos das transaminases (AST e ALT), bilirrubinas, especialmente às custas de bilirrubina conjugada e de leve a acentuado aumento nos níveis de FA e GGT³⁶. Pacientes que apresentam injúria hepática grave podem apresentar testes de coagulação anormal, valores reduzidos de síntese proteica, traduzidos por alterações na albumina e no tempo de protrombina. No entanto, essas alterações não são específicas da hepatite E, podendo ocorrer em qualquer outra hepatite de etiologia viral ou não viral.

Existem testes sorológicos e de biologia molecular específicos para o diagnóstico da hepatite E. Nenhum desses procedimentos diagnósticos, no entanto, foi ainda licenciado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso nos Estados Unidos¹⁷. Na Alemanha, tanto os testes sorológicos quanto os moleculares por PCR baseado na detecção direta do HVE RNA estão disponíveis. A técnica de PCR pode ser usada em amostras de sangue ou de fezes¹⁷.

Os métodos diagnósticos são classificados em dois tipos: diretos e indiretos. Os métodos diretos detectam o vírus, proteínas virais ou ácidos nucleicos nas amostras de sangue ou fezes por Eletroimunomicroscopia e RT-PCR. Os métodos indiretos são baseados na pesquisa dos anticorpos anti-HEV IgM e IgG.

O algoritmo diagnóstico em pessoas imunocompetentes com suspeita de hepatite E usualmente é baseado inicialmente em testes sorológicos pela pesquisa dos anticorpos anti-HEV. Se o resultado é positivo, o próximo passo deve ser a determinação do HEV-RNA. Em áreas endêmicas, a detecção do anti-HEV IgM sugere infecção recente pelo HEV, enquanto o anti-HEV IgG indica exposição prévia ao vírus ^{1,5} (Figura 3).

Fonte: Gastroenterology 2012;142:1388-97.

Figura 3- Diagnóstico da Hepatite E. Evolução típica dos títulos sorológicos de anticorpos HEV- específicos e níveis de Alanino Aminotransferase (ALT) durante (A) infecção aguda autolimitada ou (B) infecção crônica pelo HEV

Os títulos de anticorpos anti-HEV IgM aumentam no início dos sintomas clínicos, cerca de 4 dias após o início da icterícia e persistem por 3 a 5 meses. No entanto, a análise da sensibilidade dos ensaios anti-HEV IgM

e IgG não é ótima e em vários cenários, pode diferir enormemente de acordo com os kits comerciais utilizados, sendo isso potencialmente um problema no retardo diagnóstico, especialmente nos pacientes imunossuprimidos ^{1,15}. Existem grandes variações na sensibilidade, especificidade e concordância de resultados entre os ensaios que detectam esses anticorpos.

Vários ensaios são baseados em antígenos expressos por um genótipo único do HEV, podendo ser um fator limitante para detecção de todos os genótipos. A maioria dos kits comerciais se baseiam na detecção do genótipo 3 com alto nível de especificidade, porém os valores de sensibilidade podem ser mais baixos. Dessa forma, essas variações poderiam acarretar alguma discrepância nos índices de soroprevalência como já publicado em alguns estudos ³.

A detecção do anti-HEV IgG indica clareamento bem sucedido de uma infecção prévia e pode estar associada com a proteção contra re-infecção pelo HEV ainda que a presença de anticorpos não seja capaz de fornecer imunidade completa contra o vírus ¹. Indivíduos imunocomprometidos podem frequentemente apresentar resultados falso-negativos.

O anti-HEV IgG aparece logo após o surgimento do anti-HEV IgM e atinge picos em aproximadamente 4 semanas após os sintomas terem se iniciado, persistindo por um período variável entre de 1 a 14 anos após a infecção ³⁷. Além disso, os títulos de anti-HEV IgG podem diminuir ao longo do tempo e a sua negatividade pode não excluir exposição prévia ¹. Reações

cruzadas com outros vírus como Epstein-Barr (EBV) e Citomegalovírus (CMV) também podem ocorrer ^{1,37}.

Nos pacientes que desenvolvem hepatite E crônica após transplante de fígado, os anticorpos podem levar meses ou anos para serem produzidos, ou até mesmo nunca positivarem ¹⁷. Dessa forma, o diagnóstico do HEV através da detecção do HEV-RNA em indivíduos imunocomprometidos e transplantados de órgãos sólidos, é considerado o exame padrão-ouro para confirmação de infecção aguda ou crônica pelo HEV ^{1,3,5,17,37}. O HEV RNA pode ser detectado nas fezes cerca de uma semana antes e até 3-4 semanas após o início dos sintomas da doença ³⁷. No entanto esses testes ainda não foram bem padronizados, mostrando grande variabilidade nos ensaios ³. Há um estudo comparativo recente demonstrado que uma em cada seis amostras de HEV-RNA que inicialmente foram classificados como negativos são, na verdade, positivos, porém foram incorretamente classificados ³⁸. Um fato importante é que a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma amostra padrão do HEV com carga viral conhecida para ser utilizada como controle de quantificação para nas reações de amplificação do HEV RNA que deve ajudar em algumas questões técnicas ¹. A detecção do ácido nucleico utilizando técnicas de amplificação, não só fornece o diagnóstico da infecção pelo HEV, como também permite identificar o genótipo e a sequência genômica da infecção viral isolada.

Tratamento

Em indivíduos imunocompetentes a hepatite E aguda normalmente é autolimitada e não requer terapia antiviral específica ^{2,3}. Alguns pacientes devem necessitar de tratamento sintomático, mas a grande maioria dos doentes é capaz de clarear a infecção pelo HEV espontaneamente ³. Dados sobre tratamento da hepatite E em imunocomprometidos são escassos, e, portanto, a terapia individualizada para cada paciente é a melhor opção. Nos casos em que o HEV RNA persiste por mais de 6 meses, torna-se pouco provável o clareamento viral espontâneo sem intervenção terapêutica ³⁷.

De fato, o mais importante passo que deve ser considerado é o ajuste da imunossupressão ⁵. Um estudo mostrou que 25% do índice de clareamento do HEV pode ocorrer apenas com essa estratégia ³⁸, apesar do aumento do risco de rejeição. Níveis de tacrolimus e corticoides foram significativamente baixos nos pacientes com hepatite crônica sem o vírus quando comparados àqueles que permaneceram virêmicos (3,25 x 7,35 ng/mL; p=0,02) e (0,035 x 0,1 mg/Kg/d; p=0,04), respectivamente ³⁹. Essas observações clínicas estão de acordo com dados recentes que mostram que a resposta proliferativa células T específica do HEV é reduzida em pacientes transplantados, particularmente naqueles com hepatite crônica ⁴⁰. Além do mais, o perfil Th2 foi mais frequentemente observado em pacientes transplantados com hepatite E crônica ⁴⁰.

Interferon Peguilado alpha-2a/alpha 2b ou Ribavirina por 3 a 12 meses têm sido utilizado em pessoas com hepatite crônica pelo HEV, com sucesso moderado em atingir níveis indetectáveis de HEV RNA no soro

após 3 a 6 meses ter sido suspensa a terapia ⁵. Três pacientes transplantados de fígado com infecção pelo HEV crônica que não clarearam o vírus após redução da dose de drogas imunossupressoras, foi administrado um período de 3 meses de Interferon Peguilado (135 µg/semana). A resposta virológica foi observada em dois dos três pacientes após a terapia ter sido completada, porém a recidiva foi vista em apenas um paciente ⁴¹. O principal efeito colateral observado nesses pacientes foi a rejeição aguda mediada por anticorpo.

Uma revisão sistemática com 24 estudos avaliando Resposta Virológica Sustentada (RVS) após tratamento do HEV em 105 pacientes tratados com Ribavirina e oito pacientes tratados com Interferon Peguilado mostrou que 64% dos pacientes tratados com Ribavirina atingiram RVS aos 6 meses após o fim do tratamento, ao passo que todos os pacientes tratados com Interferon Peguilado atingiram RVS ⁴². A Ribavirina foi relativamente bem tolerada tendo a anemia como principal efeito colateral, necessitando de redução de dose em 28% dos pacientes. Nos oito pacientes que fizeram uso de Interferon, dois apresentaram rejeição aguda. Dessa forma, este estudo concluiu que a Ribavirina em monoterapia parece ser um esquema efetivo e seguro em pacientes imunossuprimidos com hepatite E crônica e que o uso de Interferon Peguilado em transplantados pode levar à rejeição celular aguda, não sendo dessa forma recomendado. O uso do Interferon Peguilado em transplantados de rim e cardíaco também não é recomendado ³.

Embora os dados ainda sejam limitados, a Ribavirina em monoterapia (600-1.000 mg/dia) por 3 meses em transplantados duplo rim-pâncreas, parece ser a primeira opção de tratamento para pacientes com hepatite E crônica que não foram capazes de clarear o vírus espontaneamente ⁴³. Um outro estudo com oito transplantados de rim e HEV RNA positivo realizou tratamento com Ribavirina em monoterapia por 3 meses (600-800 mg/dia), de acordo com o *clearance* de creatinina de cada paciente, observando-se que em quatro desses pacientes que foram seguidos por 6 meses após o término da terapia, a RVS foi alcançada ⁴⁴. Mais recentemente, Chailon et al. trataram por 3 meses, com sucesso, um paciente transplantado de coração com hepatite E crônica com Ribavirina em monoterapia (17 mg/kg/dia) ⁴⁵.

Contudo, a maior parte dos estudos publicados são baseados em pequenas séries de casos e nenhum grande estudo randomizado ainda foi concluído. Estudos mais robustos são necessários para confirmar essas análises preliminares.

Sabe-se que drogas imunossupressoras podem interferir na replicação de diferentes vírus. Dados iniciais sugerem que casos de hepatite E crônica ocorrem mais frequentes em transplantados de fígado e rim quando tratados com inibidores da calcineurina, como o tacrolimus quando comparados à ciclosporina ³⁹. Essas drogas, em geral, parecem aumentar os níveis de replicação viral. Por outro lado, pacientes transplantados cardíacos recebendo Micofenolato Mofetila não desenvolvem infecção persistente, apresentando redução significativa de sua replicação *in vitro* ⁴⁶. Diferentes inibidores da mTOR, como a Rapamicina e o Everolimus também

podem levar a um aumento da replicação do HEV *in vitro* ^{40,47}, porém o impacto deste achado ainda não está claro. O uso de corticosteroides não parece impactar na replicação do HEV.

Dados clínicos e experimentais ainda não são suficientes para sugerir que o tacrolimus e os inibidores da mTOR devam ser evitados uma vez que a infecção pelo HEV crônica seja identificada, enquanto que os corticoides, ciclosporina e o Micofenolato Mofetila devam ser priorizados ¹.

A ribavirina, no entanto, é contra-indicada na gravidez e pode ser responsável por casos de teratogenicidade ^{2,37}.

No entanto, falhas do tratamento com a ribavirina têm sido descritas, sendo dessa forma necessárias outras opções de tratamento mais efetivas. Em subtipos replicantes do HEV, o uso do sofosbovir, uma droga recentemente aprovada e utilizada com sucesso para o tratamento da infecção crônica pelo VHC, pode inibir a replicação do HEV *in vitro* e apresentar um efeito adicional quando combinado com a Ribavirina ⁴⁸. A atividade antiviral do sofosbovir é bem menos pronunciada do que a atividade viral contra o VHC. No entanto, as concentrações do sofosbovir atingidas no fígado devem ser suficientes para contribuir, juntamente com a ribavirina, com a inibição da replicação do HEV ⁴⁸.

Prevenção da Infecção pelo HEV

O risco do HEV transmitido por alimentos pode ser significativamente reduzido pelo cozimento de carnes, ingestão de água filtrada ou fervida, bem como melhora das condições de infra-estrutura sanitária em países em

desenvolvimento ¹. Além disso, esse risco também pode ser reduzido pelo simples hábito de lavar as mãos após a exposição aos alimentos potencialmente infectados ¹. A infecção pelo genótipo 3 do HEV pode ser prevenida, evitando-se o consumo de carne mal cozida ou crua, especialmente de produtos de porcos. *In vitro*, sugere-se que o cozimento da carne por 1 minuto a 70°C seja suficiente para reduzir a infectividade viral ⁴.

Produtos sanguíneos ainda não são rotineiramente testados na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos, não estando claro se esse procedimento deve ser instituído como rotina nos bancos de sangue brevemente.

Embora a infecção de humano para humano do HEV seja incomum, os pacientes infectados devem ser aconselhados a limpar regularmente seus utensílios sanitários compartilhados.

Duas vacinas contra o HEV têm sido desenvolvidas e parecem ser seguras além de altamente imunogênicas. A primeira contendo proteína de 56kDa codificada pelo ORF2 da cepa HEV1. Em estudos fase II conduzidos no Nepal em recrutas masculinos possuidores de anti-HEV indetectável foram randomizados para receber três doses de 20 µg da vacina 56kD ou o placebo aos 0, 1 e 5 meses, sendo seguidos por uma média de 804 dias. A vacina foi bem tolerada e altamente imunogênica com 100% de seroconversão e com eficácia de proteção contra a infecção pelo HEV em 95,5% (85,6 a 98,6%) ^{4,5}. A segunda, a HEV 239 é uma proteína de 26kDa codificada pelo ORF2 do HEV1. No estudo fase II, conduzido entre indivíduos adultos soronegativos, a vacina foi segura e imunogênica, além

de conferir proteção contra a infecção pelo HEV, com eficácia de 83% ^{4,5}. Num estudo de fase III no Sudeste da China, mais de 100.000 participantes foram randomizados e receberam a administração de três doses (30 µg/cada) da vacina HEV 239, em 0, 1 e 6 meses, tendo esta mostrado eficácia protetiva de 94-100% durante 13 meses de seguimento ^{4,5}. Essa vacina foi licenciada para uso em pessoas na República da China, porém ainda não foi licenciada para uso em humanos em outros países, possivelmente devido à não comprovação de sua eficácia em proteção contra o genótipo 3, ainda que tenha sido efetiva contra os genótipos 1 e 4 do HEV ^{1,3}. Esta vacina ainda requer melhor avaliação, especialmente em grupos de risco de maior chance de desenvolvimento de infecção aguda fulminante, cirróticos, gestantes, imunocomprometidos e transplantados de órgãos sólidos ¹ em que não se sabe quais os títulos de anti-HEV podem conferir proteção e por quanto tempo ela pode durar após a vacinação ³. Ambas as vacinas também podem ser úteis em viajantes de países desenvolvidos que se deslocam para regiões de alta prevalência de HEV. Se a vacina contra o HEV deve ser utilizada na população em geral nas áreas de alta endemicidade, deverá se levar em consideração o custo, a duração da proteção proporcionada e consequentemente, a necessidade de doses de reforço, além da capacidade da vacina interromper a transmissão da infecção. Até o momento, nenhuma vacina encontra-se disponível no mercado.

Co-infecção VHC e HEV

No Japão, Estados Unidos e Europa Ocidental, a infecção crônica pelo Vírus da Hepatite C é a principal causa de morte por doenças hepáticas e também a principal indicação de transplante hepático no adulto. Estima-se que cerca de 3% da população mundial esteja infectada pelo VHC ⁶⁴. A re-infecção do enxerto com o VHC é inevitável, embora esta possa ser prevenida em pacientes que realizam o tratamento do vírus e que obtiveram RVS no período pré transplante. Em poucos casos, a recorrência histopatológica é mínima e não progressiva. No entanto, a doença pode evoluir para cirrose com alguns casos de perda do enxerto. O desenvolvimento da fibrose em pacientes infectados pelo VHC não é uniforme e está associado com a duração da infecção, com alto risco de progressão nos pacientes cronicamente infectados. Os índices de morbi e mortalidade são maiores em pacientes VHC positivos, sendo a sobrevida dos pacientes e dos enxertos reduzidas nos que recidivam do vírus.

A incidência e as consequências da superinfecção pelo HEV entre os pacientes com infecção crônica pelo VHC ainda não é clara. Porém, a descompensação de cirrose preexistente assim como o aumento da mortalidade e morbidade têm sido descrita nas superinfecções pelo HEV 1 entre os pacientes com hepatite C crônica. Os dados são escassos nas áreas com o HEV 3 para este mesmo grupo de pacientes ⁶⁴.

Estudo recente avaliou a prevalência do anti-HVE IgG e HEV RNA entre pacientes com doença hepática crônica pelo VHC. Os pacientes foram submetidos a avaliação de graus de fibrose através do elastografia hepática

ou biópsia, sendo então divididos entre possuidores ou não superinfecção pelo HEV e VHC. Alguns tiveram o diagnóstico de cirrose por método de imagem como ecografia ou quando apresentavam sinais de descompensação clínica ou ainda após avaliação de exames laboratoriais. A prevalência do anti-HEV IgG entre os transplantados de fígado por doença crônica pelo VHC foi 30%, variando entre 18-54%). Em geral, a prevalência do anti-HEV IgG foi maior nos pacientes com VHC de idade mais elevada. Neste mesmo estudo porém, nenhuma associação foi encontrada entre estádios de fibrose ou cirrose e soropositividade para o anti-HEV IgG quando categorizados por idade dos pacientes. No entanto, esta relação ainda não está completamente esclarecida, necessitando de trabalhos prospectivos mais específicos.

No nosso país existem poucos dados de prevalência da infecção do HEV entre transplantados de órgãos sólidos, inclusive de fígado. Não há até o momento, estudos sobre a avaliação da repercussão histológica do HEV entre transplantados de fígado no Brasil.

Esse estudo tem como objetivo avaliar se há estádios de fibrose mais avançados entre os pacientes cronicamente infectados pelo VHC e marcadores sorológicos/moleculares positivos para o HEV no período pós transplante hepático do que nos pacientes com infecção apenas pelo VHC. A importância da superinfecção pelo HEV nos pacientes transplantados de fígado devido à infecção crônica pelo VHC ainda não está claramente entendida.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da Infecção pelo Vírus da Hepatite E sobre o dano histológico dos pacientes com recidiva da infecção pelo Vírus da Hepatite C no pós Transplante Hepático.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a prevalência de marcadores sorológicos e/ou moleculares do Vírus da Hepatite E entre os pacientes transplantados de fígado pelas mais diversas etiologias de Doença Hepática Terminal;
- 2) Descrever associações de variáveis demográficas e laboratoriais entre os pacientes com presença de marcadores sorológicos e/ou moleculares da infecção pelo HEV;
- 3) Comparar as alterações histológicas relacionadas à atividade inflamatória e fibrose entre os pacientes transplantados de fígado pelo VHC com e sem positividade para os marcadores de infecção pelo HEV.

3 Casuística e Métodos

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Neste trabalho foram incluídas amostras de soro e plasma coletadas de pacientes transplantados de fígado por doenças hepáticas agudas ou crônicas, causadas por diversas etiologias entre o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2013, atendidos regularmente nos ambulatórios de transplante hepático do HCFMUSP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

O delineamento do estudo foi dividido em duas etapas:

Primeira etapa: Foi realizado um estudo transversal descritivo sobre a prevalência de marcadores sorológicos e moleculares em 294 pacientes transplantados de fígado entre janeiro de 2008 a janeiro de 2013 devido às mais variadas etiologias de doença hepática terminal seguidos regularmente no ambulatório de pós transplante do HCFMUSP. Os testes sorológicos e moleculares foram realizados nas amostras coletadas dos pacientes incluídos no estudo durante o período de janeiro a abril de 2013.

Critérios de Inclusão

- 1) Transplante Hepático por doença hepática aguda ou crônica com Doador falecido ou Doador Vivo há mais de 6 meses;
- 2) Seguimento regular no ambulatório de pós transplante.

Segunda etapa: Foi realizado estudo comparativo das biópsias hepáticas dos pacientes transplantados de fígado devido à cirrose pelo vírus da hepatite C, portadores ou não de marcadores sorológicos e/ou moleculares da infecção pelo HEV.

Critério de Inclusão:

- 1) Pacientes que realizaram biópsia hepática protocolares ou por qualquer motivo no período pós transplante hepático;

Critério de Exclusão:

- 1) Não ter realizado biópsia hepática;
- 2) Coinfecção VHC/VHB e/ou VHC/HIV.

As informações acerca da idade, gênero, valores de transaminases, GGT, tempo de transplante e etiologia da doença que levou ao transplante foram obtidas dos prontuários médicos dos pacientes. Os exames bioquímicos foram realizados no laboratório Central do HCFMUSP. A dosagem da ALT foi realizada pelo método cinético automatizado, tendo como valores normais até 41 UI/L no homem e até 30 UI/L para mulheres, enquanto que os níveis de AST foram considerados normais até 37 UI/L nos homens e até 31 UI/L nas mulheres. Os níveis de GGT foram considerados normais até 60 UI/L nos homens e até 36 nas mulheres. Os testes bioquímicos foram realizados no mesmo período em que foram realizados os testes sorológicos e moleculares.

As avaliações das biópsias hepáticas foram realizadas por um único patologista (ESM) do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, após classificação segundo a Escala da SBH/SBP ⁴⁹ e METAVIR ⁵⁰.

Neste trabalho foram incluídas 294 amostras de sangue de pacientes transplantados de fígado devido as mais variadas etiologias, dentre as quais, foram avaliadas as biópsias de 122 pacientes que tinham VHC como causa do transplante.

3.1 Procedimentos de coleta

Foram coletadas amostras de soro e plasma de cada paciente envolvido do estudo, utilizando-se em tubo Gel BD Vacutainer® SST® II Advance® (BD Vacutainer®, NJ, EUA) ideal para a obtenção de soro com maior quantidade, destinado às técnicas sorológicas, e dois tubos BD Vacutainer® PPT™ (BD Vacutainer®, NJ, EUA), o qual possibilita a obtenção de um plasma não diluído, ideal para testes diagnósticos moleculares. Posteriormente, o plasma e o soro das amostras coletadas foram separados, acondicionados em alíquotas e organizados na soroteca, sendo então armazenados à -80°C.

3.2 Pesquisa de marcadores sorológicos

A pesquisa de anticorpos anti-HEV IgG e IgM foi realizada nas amostras de soro utilizando-se os kits comerciais *in vitro* RecomWell HEV IgM/ IgG (MIKROGEN®), 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 ensaios foram realizados e validados segundo as orientações específicas do fabricante.

As amostras que apresentaram resultado anti-HEV IgG ou IgM indeterminado e anti-HEV IgM isolado foram submetidas a teste confirmatório utilizando-se o kit comercial RecomLine IgM/ IgG (MIKROGEN®) (Mikrogen, Floriansbogen, Germany), que é baseado na técnica de Immunoblotting utilizando-se antígenos homólogos, recombinantes e purificados de dois genótipos diferentes (1 e 3) das regiões ORF2 e ORF3 do genoma do HEV, garantindo, assim, elevada sensibilidade e especificidade da técnica.

3.3 Pesquisa de HEV RNA

Para a determinação de casos de infecção corrente pelo HEV foi realizada a pesquisa do HEV RNA. Para isso primeiramente foi realizada a extração do RNA viral das amostras de plasma (200 µL) utilizando-se o kit

QIAamp® MinElute® Virus Spin (Qiagen), conforme orientações do fabricante. O RNA extraído foi eluído em 60 µL de tampão de eluição.

Para a amplificação e quantificação do HEV RNA foi utilizado a metodologia de PCR em tempo real One-Step, combinando a síntese de cDNA (transcrição reversa) e a amplificação na mesma reação. Para isso, empregou-se o kit QuantiFast Pathogen RT-PCR + IC® Qiagen® (Qiagen®, Hilden, Germany), com o par de *primers* (JVHEVF e JVHEVR) e uma sonda TaqMan (JVHEVP) (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Os *primers* e sonda utilizados anelam na região ORF3 do genoma viral produzindo amplicons de 69pb. Os estudos que avaliaram sensibilidade de *primers* e sondas desenhados para anelar em diferentes regiões do genoma viral mostram que a ORF3 é a região mais conservada entre os diferentes genótipos e subtipos do HEV, sendo portanto a mais adequada como sequência alvo para detecção e quantificação do HEV RNA através da PCR em tempo real ⁵¹.

Juntamente com as amostras dos pacientes foi amplificada uma amostra de HEV com carga viral conhecida (250.000 Unidades internacionais - UI), a qual foi estabelecida pela Organização Mundial de Saúde para a padronização das técnicas de PCR em tempo real para detecção e quantificação de HEV RNA (PEI code 6329/10; Paul Ehrlich Institute, Langen, Alemanha) ^{52,53}. Essa amostra foi submetida a diluições seriadas na proporção de 1:10 obtendo-se quatro pontos de diluição com as seguintes concentrações: 25.000 UI, 2.500UI, 250 UI e 25 UI. Os cinco pontos com as diferentes concentrações de HEV RNA (250.000 UI, 25.000

UI, 2.500 UI, 250 UI e 25 UI) foram utilizados como uma curva padrão para a quantificação dos níveis de RNA viral nas amostras positivas e também para estabelecer o limite de detecção e quantificação da PCR em tempo real. O limite de detecção dessa metodologia foi estabelecido em 125 UI/ml⁵⁴. Juntamente com cada amostra foi amplificado um controle interno de RNA disponível no kit utilizado com a finalidade de verificar a presença de inibidores da reação, evitando-se, assim, a ocorrência de resultados falsos negativos. As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 Fast (Life Technologies, Foster City, CA, USA) utilizando-se o seguinte ciclo de variação de temperatura: incubação a 50°C por 20 minutos, 95°C por 5 minutos e 45 ciclos de duas etapas de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

Todas as amostras de pacientes foram testadas em triplicata para favorecer a detecção de um baixo número de moléculas de HEV RNA. A carga viral de cada amostra foi determinada através da plotagem do resultado do Cycle Threshold – Ct (ciclo no qual a fluorescência de amplificação ultrapassa o eixo a partir do qual a amostra é considerada positiva) obtido por amostra contra os Cts obtidos a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em UI (Unidades Internacionais) por ml.

Detecção do HEV por *nested* PCR

As amostras que apresentaram carga viral detectada pela PCR em tempo real foram submetidas à reação de nested PCR para posterior

sequenciamento do fragmento amplificado e caracterização do genótipo viral.

Para amplificação foi realizada uma reação de *nested* PCR *One Step*, combinando a síntese de cDNA (transcrição reversa) e a reação de amplificação no mesmo tubo. Foi utilizado o kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Foster City, CA, USA) e os pares de *primers* HEV 1679/ HEV 1680 e HEV 1681/ HEV 1682 para a primeira e segunda etapa da *nested* PCR, respectivamente. Os *primers* utilizados anelam na região MTase (Metiltransferase) da ORF1, produzindo um produto final de 172 pb, e foram escolhidos por apresentarem melhor sensibilidade para amplificação do HEV RNA por *nested* PCR em estudos que comparam diferentes *primers*^{55,56}.

Para as duas etapas de amplificação foram realizados 40 ciclos de variação de temperatura em termociclador MasterCycler® EPGradiente S Eppendorf® (Eppendorf, Canadá). Primeira etapa: incubação inicial a 50°C por 30 minutos (realização da transcrição reversa), seguido de ciclos de variação de temperatura (94°C por 15 segundos, 51°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos), após uma etapa de incubação inicial a 94°C por 2 minutos. Segunda etapa: nova ciclagem de temperatura a partir da incubação inicial a 94°C por 2 minutos: 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para a segunda etapa de amplificação foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies).

A sensibilidade da reação de *nested* PCR foi estabelecida em 250 UI/mL após testes utilizando as diferentes diluições citadas anteriormente da amostra de HEV padrão estabelecida pela Organização Mundial de Saúde ⁵⁴.

Detecção do DNA amplificado

Para a detecção do DNA amplificado foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 4% (UltraPure™ Low Melting Point, Invitrogen, Life Technologies) corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Juntamente com as amostras foi aplicado ao gel um marcador de tamanho molecular 50 pb DNA Ladder (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para identificação do tamanho dos amplicons gerados.

3.4 Avaliação histológica

Os fragmentos de biópsia hepática foram avaliados pelo Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As biópsias selecionadas para o estudo apresentaram os seguintes critérios: no mínimo, 15 mm de comprimento e pelo menos 10 espaços-porta. Além disso, para evitar variabilidade entre observadores, outra limitação dos estudos baseados em avaliação histológica, todas as amostras

foram revisadas por um patologista experiente (ESM), 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 ⁴⁹, bem como o Escore METAVIR ⁵⁰ por ser este amplamente usado em todo mundo, tanto em pesquisa, quanto na prática diagnóstica diária de patologistas e hepatologistas.

Tabela 1- Classificação histológica das hepatites virais de acordo com a SBH/SBP

1 Alterações Estruturais/Fibrose
<ul style="list-style-type: none"> 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 linfóides)
<ul style="list-style-type: none"> 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
<ul style="list-style-type: none"> 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
<ul style="list-style-type: none"> 0 Hepatócitos normais, isomorfos 1 Alterações 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 confluyente. 4 Necrose focal de hepatócitos, circundadas por agregados linfo-histiocitário em numerosos sítios, associados a necrose confluyente extensa/ múltipla.

FONTE: Gayotto LCC, Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. Gastroenterologia Endoscopia Digestiva, 2000.

Tabela 2- Distribuição das características da atividade histológica de acordo com a classificação METAVIR

A0= Atividade Histológica Ausente
A1= Atividade Histológica Leve
A2= Atividade Histológica Moderada
A3= Atividade Histológica Intensa
F0= Fibrose ausente
F1= Fibrose portal sem septos
F2= Fibrose portal com raros septos
F3= Numerosos septos sem cirrose
F4= Cirrose

FONTE: Algoritmo para graduação da atividade na hepatite crônica pelo vírus da hepatite C; Hepatology; volume 24, Agosto 1996, pag 289-293.

Devido ao reduzido número de amostras positivas tanto para o anti-HEV IgG quanto para o HEV RNA, e a fim de possibilitar uma avaliação estatística, os índices histológicos de fibrose, atividade inflamatória portal, periportal, parenquimatosa da classificação SBH/SBI, bem como a classificação METAVIR de atividade inflamatória e fibrose foram agrupados em nas seguintes categorias:

Classificação SBH/SBI

Inflamação Portal:

1 - Estádios 0, 1

2 - Estádios 2, 3 e 4

Inflamação Peri-portal:

1 - Estádios 0, 1

2 - Estádios 2, 3 e 4

Atividade Parenquimatosa:

1 - Estádios 0, 1

2 - Estádios 2, 3 e 4

Alterações Estruturais:

1 - Estádios 0, 1

2 - Estádios 2, 3 e 4

METAVIR:

Atividade Inflamatória:

1 - Estádios 0, 1

2 - Estádios 2, 3 e 4

Fibrose:

1 - Estádios 0, 1

2 - Estádios 2, 3 e 4

Pacientes sem biópsia hepática não foram incluídos nos cálculos realizados.

3.5 Tabulação e análise

Os dados dos pacientes foram tabulados na planilha eletrônica Microsoft Excel, bem como as tabelas e proporções foram calculadas na mesma planilha eletrônica. Recorreu-se ao teste do Qui-Quadrado com correção de Yates para a comparação entre os grupos, e adotou-se uma significância de 5%.

3.6 Aspectos éticos

Para obtenção das amostras coletadas em 2013, os pacientes com atendimento agendado no ambulatório de transplante de fígado do HCFMUSP foram informados acerca do protocolo de pesquisa referente à infecção pelo vírus E no cenário pós transplante hepático durante a etapa de triagem que precede a consulta médica de rotina. Caso manifestasse o interesse em participar do mesmo, o paciente era conduzido a uma sala apropriada à entrevista e, então, submetido a informações mais detalhadas do estudo e dos procedimentos de coleta. Caso o paciente aceitasse participar do estudo, era então entregue ao mesmo o termo de

consentimento livre esclarecido (TCLE), o qual, preenchido posteriormente com seus dados pessoais e assinado pelos responsáveis do estudo e pelo participante, continha as informações por escrito de todos os procedimentos e possíveis eventualidades e riscos derivados da coleta.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CAPPesq (04721712.4.0000.0068).

4 Resultados

4 RESULTADOS

No ambulatório de Transplante Hepático da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 294 pacientes transplantados de fígado por diversas etiologias durante o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2013 foram submetidos à avaliação sorológica e molecular para o diagnóstico do Vírus da Hepatite E. Dentre estes, 179 (60,9%) eram do sexo masculino e 115(39,1%) do sexo feminino.

A faixa etária mais prevalente foi a compreendida entre 40-59 anos que esteve presente em 39,8%(117) dos casos, seguida pela faixa etária maior ou igual a 60 anos com 33,7% (99%), e por último, a faixa etária mais jovem de até 39 anos com 26,5% (78%) dos casos.

A cirrose devido a causas virais (VHC, VHB e coinfecção VHB/VHC) foi a principal indicação do transplante hepático contando com 162 (55,1%) casos, seguida pelas doenças colestáticas (CBP, CEP, Síndromes Ductopênicas e Atresia de vias biliares) em 30 (10,2%), cirrose por doenças metabólicas (Hemocromatose, Deficiência de Alfa-1 antitripsina, Depósito de Éster de Colesterol, Doença de Byler, Doença de Wilson, Glicogenose, PAF, Síndrome de Alagille) em 19 (6,5%) e pela insuficiência hepática aguda em 16 (5,4%) dos casos. As doenças hepáticas alcoólicas e as doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas foram responsáveis pelo transplante em 14 (4,8%) dos pacientes, seguidos por outras causas de cirrose

(Criptogênica, Hepatite Autoimune e Síndrome de Budd-Chiari) em 53 (18%) dos pacientes transplantados envolvidos.

O marcador sorológico anti-HEV IgG foi positivo em 24 (8.2%) casos, enquanto o anti-HEV IgM foi positivo em 6 (2%) casos, sendo que apenas um desses apresentou positividade simultânea para ambos os marcadores.

A pesquisa do HEV RNA foi positiva em 17 (5,8%) pacientes, desses em apenas um foi detectado marcador sorológico (anti-HEV IgG).

As amostras que apresentaram HEV RNA detectável na PCR em tempo real tiveram baixas cargas virais e possivelmente por este motivo, não se conseguiu a amplificação do RNA viral por nested PCR, o que permitiria o sequenciamento para análise do genótipo envolvido na infecção.

Os níveis de AST estiveram alterados em 25,2% (74/294) dos casos, enquanto que os níveis de ALT alteraram-se em 31,6% (93/294) dos casos. Os níveis de GGT estiveram alterados em 172 (58,5%) pacientes.

Dos 294 pacientes avaliados, 122 tinham diagnóstico de hepatite C crônica, sendo esta a sua indicação do transplante. Dos 122 cirróticos por VHC, 95 (32,3%) foram tratados, 5 (1,7%) não foram tratados, e 22 (7,5%) não houve informação sobre o tratamento ou descontinuaram o seguimento no serviço. Em 172 (58,5%) casos, não foi a hepatite C a causa do transplante hepático.

Tabela 3- Características gerais dos pacientes transplantados de fígado submetidos à investigação do HEV

	N	%
Idade		
Até 39	78	26,5
40-59	117	39,8
60 e mais	99	33,7
Gênero		
Masculino	179	60,9
Feminino	115	39,1
Etiologia da Doença Hepática		
VHB/VHC e coinfeções B e C	162	55,1
Doenças colestáticas/AVB	30	10,2
Doenças metabólicas	19	6,5
Insuficiência hepática aguda	16	5,4
NASH/ASH	14	4,8
Outras (SBC, HAI e Criptogenica)	53	18,0
anti-HEV IgG		
Positivo	24	8,2
Negativo	270	91,8
anti-HEV IgM		
Positivo	6	2
Negativo	288	98
Anti-HEV IgG/IgM		
Sim	1	0,3
Não	293	99,7
HEV RNA (PCR)		
Positivo	17	5,8
Negativo	277	94,2
ALT		
Alterado	93	31,6
Normal	201	68,4
AST		
Alterado	74	25,2
Normal	220	74,8
GGT		
Alterado	172	58,5
Normal	122	41,5
Tratamento para o VHC		
Tratou	95	32,3
Não tratou	5	1,7
Não se aplica	22	7,5
Sem vírus C	172	58,5

Tabela 4- Avaliação dos marcadores sorológicos Anti-HEV IgG e molecular HEV-RNA de acordo com a etiologia da doença hepática que levou ao transplante

	anti-HEV IgG				HEV RNA			
	Neg		Pos		Neg		Pos	
	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop
VHB/VHC e co-infecções B e C	151	55.9	15	62.5	153	55.2	13	76.5
Doenças colestáticas/AVB	28	10.4	2	8.3	28	10.1	2	11.8
Doenças metabólicas	18	6.7	1	4.2	18	6.5	1	5.9
Insuficiência hepática aguda	15	5.6	1	4.2	16	5.8	0	0
NASH/ASH	12	4.4	2	8.3	14	5.1	0	0
Outras (SBC, HAI e Criptogênicas)	46	17.0	3	12.5	48	17.3	1	5.9
Total Geral	270	100.0	24	100.0	277	100.0	17	100.0

Dentre as principais doenças hepáticas que resultaram no transplante hepático, as infecções crônicas virais foram as mais frequentes entre os pacientes que apresentaram a positividade do marcador anti-HEV IgG com 15(62,5%) casos, sendo também a etiologia mais prevalente entre os que apresentaram a positividade para o HEV-RNA, 13(76,5%) dos casos.

Dentre os 294 pacientes transplantados, 122 foram transplantados devido à Cirrose pelo Vírus da Hepatite C. Esses indivíduos foram agrupados entre portadores de marcador sorológico positivo anti-HEV IgG ou molecular HEV RNA detectável. Oito pacientes (6,5%) apresentaram Anti-HEV IgG positivo, 2 (1,63%) anti-HEV IgM isolado, enquanto 12 (9,8%) apresentaram HEV RNA positivo.

Foram também avaliados dados demográficos como gênero e idade, além de alteração de enzimas hepáticas dos 294 pacientes transplantados envolvidos no estudo. Porém apenas nos pacientes com VHC, os achados Histopatológicos de Atividade Inflamatória Portal (SEPTAL), Peri-portal

(PERISSEPTAL), Parenquimatosa, além do grau da Fibrose foram avaliados de acordo com a classificação da SBH/SBP e METAVIR.

Tabela 5- Avaliação dos níveis de AST, ALT e GGT entre os pacientes transplantados de fígado de acordo com a presença de marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV

	anti-HEV IgG				HEV RNA			
	Neg		Pos		Neg		Pos	
	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop
ALT								
Alterado	84	31,1	10	41,7	84	30,3	10	58,8
Normal	186	68,9	14	58,3	193	69,7	7	41,2
AST								
Alterado	66	24,4	9	37,5	67	24,2	8	47,1
Normal	204	75,6	15	62,5	210	75,8	9	52,9
GGT								
Alterado	156	57,8	17	70,8	160	57,8	13	76,5
Normal	114	42,2	7	29,2	117	42,2	4	23,5

Níveis alterados de ALT foram observados em 10 (41,7%) pacientes entre aqueles que apresentaram positividade para o anti-HEV IgG e também entre 10 (58,8%) dos portadores de HEV RNA positivo. Quanto aos níveis de AST, observou-se alteração em 9 (37,5%) dos 24 pacientes com positividade para o anti-HEV IgG e em 8 (47,1%) dos positivos para HEV RNA. Em relação aos níveis de GGT, 17 (70,8%) pacientes com positividade para o anti-HEV IgG e 13 (76,5%) dos positivos para o HEV RNA apresentaram níveis enzimáticos alterados.

Tabela 6- Avaliação demográfica dos pacientes transplantados de fígado de acordo com a presença de marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV

	anti-HEV IgG						HEV RNA					
	Neg		Pos		Total		Neg		Pos		Total	
	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop
Idade												
Até 39	73	26,9	5	21,7	78	26,5	73	26,9	5	21,7	78	26,5
40-59	109	40,2	8	34,8	117	39,8	109	40,2	8	34,8	117	39,8
60 e mais	89	32,8	10	43,5	99	33,7	89	32,8	10	43,5	99	33,7
Sexo												
Masculino	107	39,5	7	30,4	114	38,8	107	39,5	7	30,4	114	38,8
Feminino	164	60,5	16	69,6	180	61,2	164	60,5	16	69,6	180	61,2

Entre os pacientes transplantados que apresentaram positividade para o anti-HEV IgG, 5 (21,7%) encontravam-se na faixa etária de até 39 anos, 8 (34,8%) entre 40-59 anos e 10 (43,5%) estavam compreendidos na faixa etária de 60 anos ou mais. Em relação aos pacientes com HEV RNA positivos, 5 (21,7%) estavam na faixa etária de até 39 anos, 8 (34,8%) estavam na faixa etária entre 40-59 anos e 10 (43,55) estavam na faixa etária 60 anos ou mais. O sexo masculino foi prevalente (16; 69,6%) entre os pacientes anti-HEV IgG positivo, bem como nos pacientes HEV RNA positivos (16; 69,6%).

Tabela 7 - Correlação de achados histológicos nos pacientes transplantados por VHC e positividade para marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV de acordo com a classificação da SBH/SBP

	anti-HEV IgG					HEV RNA					
	Neg		Pos			Neg		Pos			
	Val	Prop	Val	Prop		Val	Prop	Val	Prop		
Inflamação Portal (SEPTAL)					p>0,05*						p>0,05*
< =1	50	45,5	2	25,0		48	45,3	4	33,3		
>=2	60	54,5	6	75,0		58	54,7	8	66,7		
Sem BX	4		0			4		0			
Atividade Peri Portal (PERISSEPTAL)					p>0,05*						p>0,05*
< =1	30	27,3	1	12,5		29	27,4	2	16,7		
>=2	80	72,7	7	87,5		77	72,6	10	83,3		
Sem BX	4		0			4		0			
Atividade Parenquimatosa					p>0,05*						p>0,05*
< =1	51	46,4	4	50,0		49	46,2	6	50,0		
>=2	59	53,6	4	50,0		57	53,8	6	50,0		
Sem BX	4		0			4		0			
Alteração Arquiteturais/Fibrose					p>0,05*						p>0,05*
< =1	71	64,5	5	62,5		69	65,1	7	58,3		
>=2	39	35,5	3	37,5		37	34,9	5	41,7		
SemBX	4		0			4		0			
Tratamento para o HC					p>0,05*						p>0,05*
Tratou	87	76,3	8	100,0		84	76,4	11	91,7		
Não tratou	5	4,4	0	0,0		5	4,5	0	0,0		
Não se aplica	22	19,3	0	0,0		21	19,1	1	8,3		

Em relação à atividade inflamatória portal, dois (25%) dos pacientes anti-HEV IgG positivo apresentaram estadios menores ou iguais a 1, ao passo que seis (75%) apresentaram estadios maiores que 2. Em relação aos pacientes HEV RNA positivos, quatro (33,3%) apresentaram estadios de

inflamação portal menores ou iguais a 1, enquanto que oito (66,7%) apresentaram estadios maiores que 2. Para esses dois marcadores, não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando comparados os resultados positivos e negativos em ambos os estadios.

Em relação à atividade peri-portal, um (12,5%) dos pacientes com anti-HEV IgG positivo apresentou estadio menor ou igual a 1, enquanto sete (87,5%) apresentaram estadios maiores que 2. Em relação aos pacientes HEV RNA positivos, dois (16,7%) apresentaram estadios de inflamação portal menores ou iguais a 1, enquanto que dez (83,3%) apresentaram estadios maiores que 2. Também não houve diferença significativa quando comparados os resultados positivos e negativos dos dois marcadores em ambos os estadios.

Em relação à atividade parenquimatosa, quatro (50%) dos pacientes anti-HEV IgG positivos apresentaram atividade menores ou iguais a 1, e igualmente quatro (50%) apresentaram estadios maiores que 2. Em relação aos pacientes HEV RNA positivos, 06 (50%) apresentaram estadios de inflamação parenquimatosa menores ou iguais a 1, enquanto que seis (50%) apresentaram estadios maiores ou iguais a 2. Também não houve diferença significativa quando comparados os resultados positivos e negativos dos dois marcadores em ambos os estadios.

Por último, em relação à fibrose, cinco (62,5%) dos pacientes anti-HEV IgG positivos apresentaram atividade menores ou iguais a 1, enquanto que três (37,5%) apresentaram estadios maiores ou iguais a 2. Em relação aos pacientes HEV RNA positivos, sete (58,3%) apresentaram estadios de

fibrose menores ou iguais a 1, enquanto que cinco (34,9%) apresentaram estadios maiores que 2. Também não houve diferença significativa quando comparados os resultados positivos e negativos dos dois marcadores em ambos os estadios.

Tabela 8 - Correlação dos achados histológicos entre os pacientes com VHC e positividade para marcador sorológico ou molecular de infecção pelo HEV de acordo com a classificação da METAVIR

	anti-HEV IgG				HEV RNA			
	Neg		Pos		Neg		Pos	
	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop
Inflamação/Metavir	$p>0,05^*$				$p>0,05^*$			
< =1	49	43,0	4	50,0	47	42,7	6	50,0
>= 2	61	53,5	4	50,0	59	53,6	6	50,0
Sem BX	4	3,5	0	0,0	4	3,6	0	0,0
Fibrose/Metavir	$p>0,05^*$				$p>0,05^*$			
< =1	70	63,7	5	62,5	68	64,1	7	58,3
>= 2	40	36,3	3	37,5	38	35,9	5	41,7
Sem BX	4		0		4		0	

Em relação à classificação METAVIR, quatro (50%) dos pacientes anti-HEV IgG positivo apresentaram estadios de inflamação menores ou iguais a 1, tendo também quatro (50%) apresentado estadios inflamatórios maiores que 2. Em relação aos pacientes com HEV RNA positivos, seis (50%) apresentaram estadios de inflamação menores ou iguais a 1, e também seis (50%) apresentaram estadios maiores ou iguais a 2. Para esses dois marcadores, também não houve diferença significativa ($p>0,05$)

quando comparados os resultados positivos e negativos em ambos os estadios.

Em relação à fibrose, 5 (62,5%) dos pacientes anti-HEV IgG positivo apresentaram estadios menores ou iguais a 1, ao passo que 3 (37,5%) apresentaram estadios maiores que 2. Em relação aos pacientes HEV RNA positivos, 07 (58,3%) apresentaram estadios de fibrose menores ou iguais a 1, enquanto que 05 (41,7%) apresentaram estadios maior que 2. Para esses dois marcadores, não houve diferença significativa ($p>0,05$) quando comparados os resultados positivos e negativos em ambos os estadios.

Tabela 9 - Correlação de achados histológicos dos pacientes submetidos ou não ao tratamento para o VHC de acordo com a classificação da METAVIR

	Tratou		Não tratou		Não se aplica	
	Val	Prop	Val	Prop	Val	Prop
Inflamação						
< =1	59	62,1	4	80,0	12	54,5
>= 2	33	34,7	0	0	10	45,4
Sem BX	3	3,2	1	20,0	0	0
Fibrose						
< =1	40	42,1	3	60,0	10	45,5
>= 2	52	54,7	1	20,0	12	54,5
Sem BX	3	3,2	1	20,0	0	0

Dos 95 pacientes tratados para o VHC, 59 (62,1%) apresentaram estadios de inflamação menor ou igual a 1 e 33 (34,7%) tiveram estadios de inflamação maior que 2, de acordo com a re-categorização da classificação

METAVIR. Entre os não tratados para o VHC, 4 (80%) apresentavam graus de inflamação menor ou igual a 1 e nenhum deles apresentou grau de inflamação maior que 2, seguindo a re-categorização da classificação METAVIR.

Em relação a graus de fibrose, 40 (42,1%) dos pacientes tratados apresentaram graus de fibrose menor ou igual a 1, enquanto que 52 (54,7%) apresentaram graus de fibrose maior que 2, segundo a re-categorização da classificação METAVIR. Em três (60%) dos pacientes não tratados os níveis de fibrose foram menor ou igual a 1, enquanto que apenas um (20%) apresentou níveis de fibrose maiores que 2.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

A Hepatite E é uma doença de disseminação mundial, sendo a principal causa de hepatite viral aguda não-A, não-B em todo mundo. No entanto, a taxa de prevalência do HEV varia de acordo com a região geográfica estudada, sendo maior em países em desenvolvimento, além de que, nos países industrializados, ela pode tomar um curso crônico em grupos de indivíduos específicos como nos transplantados de órgãos sólidos. Recentemente, o genótipo 3 do HEV tem sido responsável por casos de hepatite em pacientes submetidos à transplantes sob uso de drogas imunossupressoras com cerca de 60% dos casos podendo evoluir para hepatite crônica.

No Brasil, ainda não existem estudos sobre a infecção do HEV entre a população transplantada de fígado. Em nosso estudo, a prevalência da positividade do anti-HEV IgG nos transplantados hepáticos foi de 8,2%, enquanto o anti-HEV IgM foi de 2%. No entanto, as primeiras séries demonstrando cronificação do HEV em 14 indivíduos transplantados de órgãos sólidos incluiu apenas três transplantados de fígado. Esse estudo mostrou infecção persistente e rápida progressão histológica da doença em oito deles, incluindo os três transplantados de fígado em uma média de tempo de aproximadamente 18 meses ¹. Porém, em vários outros estudos avaliando o papel da cronificação do HEV em transplantados de fígado observou-se uma frequência um pouco mais baixa do que nosso resultado,

cerca de 1 a 3 % de anti-HEV IgG na maioria deles ¹. Ressalta-se a importância de se considerar as diferenças sócio-culturais marcantes entre os países estudados ¹. Um outro estudo holandês avaliou 285 pacientes submetidos ao transplante de fígado, sendo investigado anti-HEV, anti-HEV IgG, HEV RNA. Noventa e seis por cento desses indivíduos foram negativos para esses marcadores e apenas nove (3,1%) apresentaram positividade para o anti-HEV IgG, demonstrando nesse grupo não haver evidência de infecção pelo HEV no pós transplante ⁵⁹. Estudos franceses também investigaram a prevalência do HEV em pacientes transplantados de fígado entre os anos de 2005 a 2012 tendo encontrado anti-HEV IgG em 7,7% dos pacientes após uma média de seguimento de 33 meses, número muito semelhante ao encontrado em nossa casuística ⁶⁴. Um outro estudo espanhol, conduzido por Buti et al. em 2010, investigou se a prevalência do HEV em 82 transplantados de fígado através do anti-HEV IgG quando estes apresentavam elevações das enzimas hepáticas. Nos pacientes positivos para o anti-HEV IgG, foram também testados anti-HEV IgM e HEV RNA. Apenas três (3,65%) pacientes foram positivos para o anti-HEV IgG não havendo também nestes casos evidência de infecção persistente ⁶¹.

Na América do Sul, estudos de soroprevalência mostram larga variação de resultados, atingindo valores menores do que 1% até 20% ⁵⁸.

Pischke et al.²³ demonstraram em uma população de 226 transplantados de fígado, 4,5% de positividade para anti-HEV IgG, tendo 156 pacientes demonstrado nenhuma evidência de hepatite no enxerto. Dessa forma, a prevalência de infecção presente ou passada pelo HEV em

transplantados de fígado parece ser baixa em diversas casuísticas. As variações de resultados, em parte, podem ser justificadas pela diferença na sensibilidade dos kits sorológicos empregados nos diversos estudos.

Estudos americanos realizados por Fontana et al. demonstraram o papel do vírus da hepatite E entre 681 adultos americanos com insuficiência hepática aguda, testando anti-HEV IgM e anti-HEV IgG. Os indivíduos positivos para anti-HEV IgM eram também testados para o HEV RNA. Já na admissão da internação, 294 (35,2%) dos pacientes com insuficiência hepática aguda apresentavam anti-HEV IgG positivo. Apenas três pacientes demonstraram anti-HEV IgM positivo, porém todos eles foram negativos para o HEV RNA ⁶⁵. Dessa forma, ele concluiu que a insuficiência hepática aguda pelo HEV é rara nos adultos americanos e não pode ser relacionada a hepatites agudas de causa indeterminada.

Dados de estudos brasileiros avaliando soroprevalência do HEV em 15 anos (1998-2013) na população geral do maior laboratório de análises clínicas do Estado de São Paulo demonstraram que a prevalência do anti-HEV IgG foi de 2,1%, enquanto a de anti-HEV IgM foi de 4,9%, de acordo com os estudos de Granado et al. ¹⁵. Vale-se ressaltar ainda que resultados falso positivos para o anti-HEV IgM podem ocorrer devido à reação cruzada com outros vírus hepatotrópicos como Citomegalovírus (CMV), Epstein Barr (EBV) ¹⁴.

Na nossa série, a positividade para o HEV RNA foi de 5,4%, valor semelhante ao encontrado na literatura. No entanto, a prevalência da infecção pelo HEV baseado na detecção do HEV RNA pode variar de 0,9% a

3,5%, segundo Kamar et al., 2014. Quando avaliamos o HEV RNA apenas entre pacientes transplantados com aumento dos níveis de enzimas hepáticas, a prevalência pode ser mais elevada, variando entre 4,3% a 6,5%¹⁴. Isso, em parte, poderia ser justificado pelas diferentes sensibilidades desses testes moleculares utilizados que são altamente dependentes de uma apresentação precoce e tempo na coleta de amostras do soro ou fezes¹⁴. Portanto, níveis indetectáveis de HEV RNA não excluem infecção pelo HEV.

O aumento das transaminases séricas é indicador sensível, porém não específico de injúria hepática. Na nossa casuística observou-se alteração nos níveis de AST em 25,2% dos casos, ALT em 31,6% e GGT em 58,5% em todos os transplantados. Nossa série ainda demonstrou que 41,7% dos pacientes com anti-HEV IgG positivo apresentavam níveis de ALT alterados, enquanto que 37,5% apresentavam alteração nos níveis de AST. Em nossa casuística, 10 (58,8%) dos pacientes com níveis de ALT alterada apresentaram HEV RNA positivo.

Um estudo chinês avaliando 5.023 doadores de sangue com níveis de ALT elevados demonstrou a prevalência do Anti-HEV IgG em 33,3% a qual foi significativamente maior que 24,9% dos 4.046 doadores que apresentavam níveis normais de ALT ($p < 0,05$). Já a prevalência do anti-HEV IgM foi semelhante entre os doadores com níveis normais de ALT, 60 de 4.026 (1,48%) e doadores com ALT elevada, 71 de 5.023 (1,41%) sendo $p > 0,05$ ⁶⁵. O HEV RNA esteve presente em seis doadores que apresentavam níveis elevados de ALT. No entanto, diversas outras possíveis

explicações para justificar elevações nas transaminases podem incluir a presença de co-morbidades como: infecção crônica pelo VHC, uso de drogas hepatotóxicas ou até mesmo episódios de rejeição celular, devendo então este dado ser avaliado com bastante cautela ⁶⁶. Assim, a triagem de doadores HEV RNA positivo através dos níveis elevados de AST parece ser pouco específica e poderia excluir grande número de pacientes sem infecção pelo HEV, não devendo ser utilizada na prática clínica.

Em relação à prevalência do HEV quanto ao gênero e idade, nossa série demonstrou que 69,6% dos pacientes transplantados de forma geral que apresentaram positividade para o anti-HEV IgG foram do sexo feminino, bem como 69,6% dos pacientes que apresentaram positividade para o HEV RNA. No entanto, na maioria dos estudos, a maior prevalência encontra-se no sexo masculino, podendo em parte ser explicado pela maior exposição do sexo masculino às condições que favorecem a infecção pelo vírus, como certos tipos de profissões como fazendeiros, veterinários, que expõem à maior risco da infecção ¹⁰. A faixa etária mais acometida tanto para positividade do anti-HEV IgG quanto para o HEV RNA foi a de 60 ou mais anos, faixa essa possivelmente mais exposta à infecção.

Um outro aspecto amplamente discutido é a história natural da progressão para a cronicidade do HEV que ainda não está completamente esclarecido, sendo portanto, difícil avaliar os mecanismos responsáveis por essa possível cronificação do HEV. Acredita-se que parte deles, possa estar relacionada com a intensidade da terapia imunossupressora e resposta imunológica de cada indivíduo. De uma forma geral, cursos crônicos do HEV

têm sido relatados em cerca de 50-60% dos transplantados, podendo em até 10% deles evoluir para cirrose hepática.

Em relação aos dados histológicos causados pela infecção pelo HEV, a sua histopatologia tem sido avaliada especialmente em modelos animais e em poucos casos de biópsias hepáticas de pacientes com infecção aguda, sendo a maioria deles em áreas endêmicas. Além disso, há menos informação sobre os achados histológicos na hepatite E do que quando comparadas com outros tipos de hepatites virais como o B e C, por exemplo.

Nosso estudo realizou avaliação histológica de acordo com as classificações da SBH/SBP e METAVIR, nos pacientes transplantados por cirrose devido à infecção pelo VHC que apresentaram marcadores sorológicos ou moleculares da infecção pelo HEV, tentando agrupar em pacientes com danos inflamatórios e fibrose leve e moderado/acentuado. Quando avaliados fibrose pela classificação da SBH/SBP quanto pela classificação METAVIR, os números foram semelhantes mostrando que 37,5% dos pacientes com anti-HEV IgG positivo tiveram níveis de fibrose maior que 2, enquanto que 41,7% dos pacientes com HEV RNA positivo apresentaram níveis de fibrose maiores que 2 ($p>0,05$) porém sem significância estatística quando comparados aos negativos para este marcador. Além disso, estádios de atividade inflamatória portal, periportal e parenquimatosa de moderados/acentuados também não foram encontrados em nossa série nos pacientes positivos para anti-HEV IgG ou HEV RNA quando comparados aos que não apresentaram positividade para estes marcadores, demonstrando que, aparentemente, o dano histológico não foi

mais acentuado nos portadores de marcadores sorológicos ou moleculares do HEV no momento da avaliação.

Uma das primeiras séries de casos demonstrando infecção crônica pelo HEV em indivíduos transplantados incluíram 14 receptores de órgãos sólidos. No geral, 8 pacientes desenvolveram infecção persistente, incluindo os 3 (21,4%) pacientes submetidos ao transplante hepático ²⁸. Este mesmo estudo demonstrou rápida progressão histológica da doença, tendo uma média de tempo de seguimento de 18 meses. Subsequentemente, vários outros estudos específicos têm sido publicados, relatando o papel da infecção crônica do HEV em receptores de transplante de órgãos, incluindo transplantados de fígado, com resultados semelhantes, tendo frequência absoluta baixa com 1 a 3% na maioria dos estudos, devendo portanto ser considerado as diferenças epidemiológicas, climáticas e de cepas virais entre os diferentes países estudados. Além disso, as casuísticas ainda são relativamente pequenas com pequeno número de casos que evoluíram até estádios finais de doença hepática crônica, cirrose e necessidade de re-transplante de fígado.

Em um outro clássico estudo de avaliação do impacto do HEV na fibrose hepática, 16 pacientes transplantados de fígado foram submetidos a biópsias hepáticas sequenciais (1-5 biópsias por paciente) após diagnóstico de infecção pelo HEV ²⁴. A média de tempo entre a primeira e a última biópsia hepática foi de 22 (10-96) meses. Índice de atividade inflamatória aumentou de 1 (1-2) para 2 (1-3) unidades de METAVIR (P=0,04). Em três pacientes, a biópsia hepática evoluiu para cirrose aos 28,32 e 50 meses

após o diagnóstico do HEV. Dois deles desenvolveram cirrose descompensada e hipertensão portal, tendo evoluído para o óbito por choque hemorrágico e séptico, respectivamente.

Wedemeyer et al. também demonstraram a possibilidade de evolução da infecção crônica do HEV em pacientes com marcadores sorológicos ou moleculares positivos para o HEV até estadios finais de doença hepática crônica. Em clássico estudo com 226 transplantados de fígado, o anti-HEV IgG foi diagnosticado em 10 (4,4%) dos casos, sendo HEV RNA positivo em 3 (1,3%) deles. Desses três pacientes, dois desenvolveram viremia persistente, tendo apenas um deles evoluído para fibrose avançada 22 meses após o transplante hepático ²³. Um dos pacientes teve biópsia normal logo após o transplante de fígado, porém as biópsias sequenciais demonstraram apenas hepatite de interface sem fibrose após 8 meses do transplante e a última biópsia, 2 anos depois, demonstrou infiltrado linfocítico com fibrose em ponte. Em um outro estudo, Haagsma et al. demonstraram um caso de re-transplante por cirrose descompensada, icterícia, ascite e hipertensão portal 7 anos após o transplante inicial por Hepatite E. Não havia indícios de nenhum outro vírus ativo detectado. Dez meses após o novo transplante, as enzimas hepáticas mostraram-se persistentemente elevadas, sendo detectado o HEV RNA positivo, além da biópsia do enxerto não demonstrar sinais de rejeição celular aguda, apenas leve inflamação portal, hepatite lobular moderada e alguma fibrose portal, semelhante à maioria dos achados histológicos encontrados nos pacientes de nossa casuística. Neste mesmo estudo, uma segunda paciente transplantada por

doença de Wilson há 6 anos foi diagnosticada com HEV tanto através do anti-HEV IgG quanto do HEV RNA, tendo biópsia hepática inicial com hepatite leve, porém 5 anos depois desenvolveu cirrose e necessidade de novo transplante ²⁴. Dessa forma, em nossa série não se observaram estadios avançados de fibrose semelhante ao que mostraram vários casos citados acima demonstrando que a HVE não foi um fator que contribuiu com graus mais avançados de atividade inflamatória e fibrose mesmo nos pacientes co-infectados pelo VHC e HEV.

Estudo realizado com avaliação de 221 biópsias hepáticas de pacientes com hepatite aguda de causa desconhecida ou onde havia dúvidas no diagnóstico. HEV RNA foi detectado em sete pacientes, sendo em o genótipo 3 encontrado em quatro deles. A histologia das biópsias revelou uma hepatite aguda clássica com características colestáticas e em alguns casos, necrose confluyente em zona 3 ⁶³.

Por ser considerada uma doença ainda de baixa prevalência, pode-se concluir que cada paciente transplantado com infecção crônica pelo HEV é um potencial reservatório de disseminação da doença, embora numa escala populacional não devam ser considerados como fonte maior para infecção endêmica.

A superinfecção pelo HEV entre os portadores de doença hepática crônica pode causar descompensação hepática levando ao aumento da morbidade e mortalidade. Um estudo recente analisou a prevalência do anti-HEV IgG, IgM e HEV RNA entre portadores de hepatite C crônica em diferentes estadios de fibrose. Noventa de oito (48%) dos pacientes com

VHC tinham estádios de fibrose maiores ou iguais a F2, de acordo com a classificação METAVIR, sendo a prevalência do anti-HEV IgG de 30% ⁶⁴.

Por muitos anos, o esquema de tratamento da hepatite C crônica compreendia a associação do Interferon associado à ribavirina por um tempo variável entre 24 a 48 semanas, podendo em alguns casos se prolongar por um período de até 72 semanas, a depender especialmente do genótipo e cinética viral durante o tratamento. Em nossa série, dos 122 pacientes transplantados por VHC, 95 (32,3%) foram tratados com esquemas que incluía ribavirina em sua constituição. Dos 122 pacientes tratados, 33 (34,7%) apresentavam níveis de atividade inflamatória maior que 2 e 52 (54,7%) níveis de fibrose maior que 2, segundo a recategorização da classificação METAVIR, no entanto esses dados não tiveram significância estatística. Em estudo recente avaliando a infecção crônica pelo HEV após o transplante hepático mostrou que pode haver regressão da fibrose seguindo a terapia antiviral com a ribavirina. A atividade imunomodulatória da ribavirina desenvolve importante papel na regressão da fibrose hepática pela inibição do Interferon e IL4 os quais são envolvidos na sua indução ⁶⁷. A ribavirina é uma droga efetiva contra o HEV, não apenas controlando a atividade viral, mas também melhorando o dano histológico inflamatório induzido pelo HEV, embora já existam casos relatados em pacientes incapazes de eliminar o HEV após longos períodos de uso da ribavirina, possivelmente devido a hipogamaglobulinemia após fim de tratamento quimioterápico ⁶⁵. Vários estudos demonstraram que a ribavirina inibe a

replicação do HEV, no entanto, nenhum efeito antiviral direto contra o HEV já foi visto.

Dessa forma, em nossa casuística, os pacientes co-infectados pelo VHC e HEV não apresentaram níveis de atividade inflamatória e fibrose significativamente maiores dos que os infectados apenas pelo VHC, além de que, os casos em que os pacientes tratados para o VHC com a ribavirina também não apresentaram níveis significativamente maiores tanto de atividade inflamatória e fibrose, mostrando que em nosso meio, o HEV não é responsável por dano histológico mais agressivo entre os transplantados de fígado pelo VHC co-infectados pelo HEV no momento da análise realizada. Logicamente, maiores estudos de seguimento desse grupo se fazem necessários no intuito de avaliar o dano progressivo cônico na população de transplantados que apresentem evidência de infecção pelo HEV. Um dos nossos fatores limitantes foi o não seguimento desses casos com evidência sorológica ou molecular do HEV nos transplantados de fígado pelo VHC. Apesar de tudo, os casos de hepatite aguda ou crônica de origem desconhecida ou duvidosa no cenário pós transplante hepático em pacientes imunodeprimidos, a infecção pelo HEV deve ser considerada e investigada independente do tratamento prévio com o uso da ribavirina já que muitos casos podem na verdade, se tratarem de casos de hepatite E. Assim, sugerimos que clínicos devam atentar à possibilidade da infecção pelo HEV, particularmente entre homens mais velhos, transplantados de órgãos sólidos, imunodeprimidos, além de conduzi-los corretamente do ponto de vista diagnóstico e terapêutico.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

Apesar do diagnóstico de hepatites pelo vírus E deva ser considerado na população de transplantados de fígado que desenvolve hepatite de etiologia não identificada, esse estudo demonstrou haver baixa prevalência da circulação do HEV em nosso país quando comparados aos países europeus, a partir da pesquisa do anti-HEV IgM, anti-HEV IgG e HEV RNA. Pacientes transplantados com positividade para esses marcadores não tiveram maiores níveis de AST, ALT ou GGT quando comparados aos pacientes com marcadores sorológicos ou moleculares negativos para o HEV.

Dentre os pacientes transplantados por hepatite C crônica que apresentaram marcadores sorológicos ou moleculares positivos para o HEV, não houve maior dano histológico seja nos índices de atividade inflamatória ou estadios mais avançados de fibrose quando comparados com os transplantados pelo VHC que não tiveram marcadores positivos para o HEV. Portanto, em nosso meio, a co-infecção pelo HEV e VHC parece não apresentar impacto na piora progressão histológica da doença no cenário pós transplante de fígado. No entanto, estudos prospectivos com número de pacientes mais robustos e seguimento por um período de tempo maior fazem-se necessário.

7 Anexos

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	☐

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 clínico do paciente.

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 nº 500 prédio 2, 2º 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

**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. Edson Abdala 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 ____ / ____ / ____

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Behrendt P, Steinmann E, Manns MP, Wedemeyer H. The impact of hepatitis E in the liver transplant setting. *J Hepatol*. 2014;61(6):1418-29.
2. Smith, D.B., Simmonds, P., International Committee on Taxonomy of Viruses Hepeviridae Study, G., Jameel, S., Emerson, S.U., Harrison, T.J., Meng, X.J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H., Purdy, M.A., 2014. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. 2014 Oct;95(Pt 10):2223-32.
3. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis e virus infection. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1388-97 e1.
4. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(1):116-38.
5. Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. *Hepatology*. 2011;54(6):2218-26.
6. Kumar S, Subhadra S, Singh B, Panda BK. Hepatitis E virus: the current scenario. *Int J Infect Dis*. 2013;17(4):228-33.
7. Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(9):1484-93.
8. Kamar N, Legrand-Abravanel F, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus: what transplantation physician should know. *Am J Transplant*. 2012;12: 2281-87

9. Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:30-7.
10. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparasion of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol.* 2010;82(5):799-805.
11. Ma H, Zheng L, Liu Y, Zhao C, Harrison TJ, Ma Y. Experimental infection of rabbits with rabbits and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PloS One.* 2010;5(2):e9160.
12. Myint KS, Endy TP, Shrestha MP, Shrestha SK, Vaughn DW, Innis BL, et al. Hepatitis E antibody kinetics in Nepalese patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(10):938-41.
13. Kuniholm MH, Purcell RH, McQuillan GM, Engle RE, Wasley A, Nelson KE. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Infect Dis.* 2009;200(1):48-56.
14. Mirazo S, Ramos N, Mainardi V, Gerona S, Arbiza J. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med.* 2014;6:45-59.
15. Passos-Castilho AM, de Sena A, Reinaldo MR, Granato CF. Hepatitis E virus infection in Brazil: results of laboratory-based surveillance from 1998 to 2013. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(4):468-70.
16. Martins RM, Freitas NR, Kozlowski A, Reis NR, Lopes CL, Teles AS, et al. Seroprevalence of hepatitis E antibodies in a population of recyclable waste pickers in Brazil. *J Clin Virol.* 2014;59(3):188-91.

17. Pischke S, Behrendt P, Bock CT, Jilg W, Manns MP, Wedemeyer H. Hepatitis E in Germany-an under-reported infectious disease. *Dtsch Arztebl Int.* 2014;111(35-36):577-83.
18. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9744):895-902.
19. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012;55(4):988-97.
20. Chijioke O, Bawohl M, Springer E, Weber A. Hepatitis E virus detection in liver tissue from patients with suspected drug-induced liver injury. *Front Med (Lausanne).* 2015;2(20):1-5.
21. Pischke S, Greer M, Hardtke S, Bremer B. Course and treatment of chronic hepatitis E virus in lung recipients. *Transplant Infect.* 2014;16(2):333-9.
22. Merchante N, Parra-Sanchez M, Rivero-Juarez A, Cifuentes C, Camacho A, Macías J, et al. High prevalence of antibodies against hepatitis E virus in HIV-infected patients with unexplained liver disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(8):532-5.
23. Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2010;16(1):74-82.
24. Haagsma EB, Van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, et al. Chronic hepatitis E virus infection in Liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008;14(4):547-53.

-
25. Geng Y, Zhang H, Huang W, J Harrison T, Geng K, Li Z, Wang Y. Persistent hepatitis E virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat Mon.* 2014;14(1):e15618.
 26. Naik A, Gupta N, Goel D, Ippagunta SK, Sharma RK, Aggarwal R. Lack of evidence of hepatitis E virus infection among renal transplant recipients in a disease-endemic area. *J Viral Hepat.* 2013;20(4):e138-40.
 27. Parvez MK. Chronic hepatitis E infection risks and controls. *Intervirology.* 2013;56(4):213-6.
 28. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Quezzani L, Péron JM, Guitard J, et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2008;358(8):811-7.
 29. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology.* 2011;140(5):1481-9.
 30. Kyvernitakis A, Taremi M, Blechacz B, Hwang J, Jiang Y, Mahale P, et al. Impact of hepatitis E virus seropositivity on chronic liver disease in cancer patients with hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2015; 45(11):1146-51 .
 31. Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Krüger DH, et al. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol.* 2012;56(2):500-2.

-
32. Emerson SU, Nguyen H, Graff J, Stephany DA, Brockington A, Purcell RH. In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein. *J Virol.* 2004; 78(9):4838-46.
 33. Comont T, Bonnet D, Sigur N, Gerdelat A, Legrand-Abravanel F, Kamar N, et al. Acute hepatitis E infection associated with Guillain-Barre Syndrome in immunocompetent patient. *Rev Med Interne.* 2014;35(5): 333-6.
 34. Pischke S, Gisa A, Suneetha PV, Wiegand SB, Taubert R, Schlue J, et al. Increased HEV seroprevalence in patients with autoimmune hepatitis. *PLoS One.* 2014;9(1):e85330.
 35. Pischke S, Wedemeyer H. Chronic hepatitis E in liver transplant recipients: a significant clinical problem? *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2010;56(2):121-8.
 36. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Reviews.* 2013;10:24-33.
 37. Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. Mystery of hepatitis E virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol.* 2015;2015:872431.
 38. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssière L, et al. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis e virus infection after organ transplantation. *Transplantation.* 2010; 89(3):353-60.
 39. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterolgy.* 2011;140(5):1481-9.

-
40. Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J, Fytily P, Gronert A, et al. HEV-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*. 2012; 55(3):695-708.
 41. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, et al. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):e30-33.
 42. 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.
 43. Mallet V, Nicand E, Sultanik P, Chakvetadze C, Tessé S, Thervet E, et al. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med*. 2010;153(2):85-9.
 44. Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Lhomme S, Esposito L, et al. Ribavirin therapy inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis E virus infection. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1612-8.
 45. Chaillon A, Sirinelli A, De Muret A, Nicand E, d'Alterroche L, Goudeau A. Sustained virologic response with ribavirin in chronic hepatitis E virus infection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(7): 841-3.
 46. Pischke S, Stiefel P, Franz B, Bremer B, Suneetha PV, Heim A, et al. Chronic hepatitis E in heart transplant recipients. *Am J Transplant*. 2012;12(11):3128-33.
 47. Zhou X, Wang Y, Metselaar HJ, Janssen HL, Peppelenbosch MP, Pan Q. Rapamycin and everolimus facilitate hepatitis E virus replication:revealing a basal defense mechanism of PI3K-PKB-Mtor pathway. *J Hepatol*. 2014;61(4):746-54.

-
48. Dao Thi VL, Debing Y, Wu X, Rice CM, Neyts J, Moradpour D, Gouttenoire J. Sofosbuvir inhibits hepatitis E virus replication In vitro and results in an additive effect when combined with ribavirin. *Gastroenterology*. 2016;150(1):82-5.
 49. Gayotto LCC e Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED*. 2000;19(3):137-40.
 50. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996;24(2):289-93.
 51. Mokhtari C, Marchadier E, Haïm-Boukobza S, Jebblaoui A, Tessé S, Savary J, et al. Comparasion of real-time RT-PCR assays for hepatitis E virus RNA detection. *J Clin Virol*. 2013;58(1):36-40.
 52. Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM; HEV Collaborative Study Group. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(5):729-35.
 53. Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM, Group HEVCS. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1234-9.
 54. Ferreira AC. Pesquisa de marcadores sorológicos e moleculares da infecção pelo Vírus da Hepatite E (HEV) em indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

-
55. La Rosa G, Fratini M, Muscillo M, Iaconelli M, Taffon S, Equestre M, et al. Molecular characterisation of human hepatitis E virus from Italy: comparative analysis of five reverse transcription-PCR assays. *Viol J.* 2014;11:72.
 56. Fogeda M, Avellon A, Cilla CG, Echevarria JM. Imported and autochthonous hepatitis E virus strains in Spain. *J Med Virol.* 2009;81(10):1743-9.
 57. Blasco-Perrin H, Abravanel F, Blanco-Baque V, Peron JM. Hepatitis E, the neglected one. *Liver Int.* 2016;36 (Suppl 1):130-4.
 58. Echavaria JM, Gonzales JE, Lewis-Ximenes LL, dos Santos DR, Munne MS, Pinto MA, Pujol FH, Rodrigues-Lay LA. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol.* 2013;85(6):1037-45.
 59. Haasgma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H, et al. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 2009;15(10):1225-8.
 60. Pischke S, Suneetha PV, Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, et al. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 2010;16(1):74-82.
 61. Buti M, Cabrera C, Jardi R, Castells L, Esteban R. Are recipients of solid organ transplantation a high-risk population for hepatitis E virus infection? *Liver Transplant.* 2010;16(1):106-7.
 62. Geng Y, Zhang H, Huang W, Harrison TJ, Geng K, Li Z, Wang Y. Persistent hepatitis E virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat Mon.* 2014;14(1):e15618.

63. Drebber U, Odenthal M, Aberle SW, Winkel N, Wedemeyer I, Hemberger J, et al. Hepatitis E in liver biopsies from patients with acute hepatitis of clinically unexplained origin. *Front Physiol*. 2013;4:351.
64. Buffaz C, Scholtes C, Dron AG, Chevallier-Queyron P, Ritter J, Andre P, Ramière C. Hepatitis E in liver transplant recipients in the Rhône-Alpes region in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(6):1037-43.
65. Fontana RJ, Engle RE, Scaglione S, Araya V, Shaikh O, Tillman H, et al. The role of hepatitis E virus infection in adult Americans with acute liver failure. *Hepatology*. 2016;64(6):1870-80.
66. Wang M, He M, Wu B, Ke L, Han T, Wang J, et al. The association of elevated alanine aminotransferase levels with hepatitis E virus infections among blood donors in China. *Transfusion*. 2017;57(2):273-9.
67. Mazzola A, Minh MT, Charlotte F, Hdjii A, Bernard D, Wendum D, et al. Chronic hepatitis E viral infection after liver transplantation: a regression of fibrosis following antiviral therapy. *Transplantation*. 2017 April 4.