

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

HEPATITE B OCULTA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

ALESSANDRO AFONSO PERES

Porto Alegre

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: NEFROLOGIA

HEPATITE B OCULTA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas: Nefrologia.

ALESSANDRO AFONSO PERES

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

PORTO ALEGRE

2004

*À minha família que foi o refúgio
de minhas angústias, acreditou e me
incentivou na busca do conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Roberto Ceratti Manfro, orientador deste trabalho, pela atenção, paciência, apoio e dedicação em todos os momentos desta construção e pelos conhecimentos transmitidos durante a elaboração da dissertação.

A colega Esther Aquino Dias, pela imprescindível orientação e colaboração quanto a realização do processo de análise laboratorial, além de seu incansável apoio em todos os momentos.

Ao meus colegas do programa de pós-graduação pelo constante incentivo.

Aos profissionais dos laboratórios de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que aceitaram participar da pesquisa, pela disponibilidade e profissionalismo, sem os quais o trabalho não seria possível.

Ao laboratório de Imunologia do HCPA em especial ao Dr. Luis Fernando Jobim e a Dr^a Marisa Chesky pela paciência e colaboração.

Às enfermeiras do HCPA, em especial a Maria Conceição Proença no auxílio da coleta do material.

Aos amigos pelas palavras de incentivo e respeito nas horas mais difíceis.

Ao Dr. Fernando Roman e à Dr^a Liriane Comerlato, que foram amigos especiais durante esta jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À secretária Rute Santos do curso de Pós Graduação em Nefrologia pelo auxílio e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro.

Ao grupo de Pesquisa e Pós Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo suporte financeiro.

Á Marivana Ferigolo, companheira e amiga, pela total dedicação e presença constante nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus familiares, pela compreensão e apoio. Sem eles nada disso teria acontecido.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS.....	
INTRODUÇÃO.....	01
1. Considerações gerais	01
2. Hepatite C.....	04
2.1. Aspectos biológicos do vírus C.....	04
2.2. Transmissibilidade.....	06
2.3. Epidemiologia.....	07
2.4. Hepatite C e transplante renal.....	08
3. Hepatite B.....	09
3.1. Considerações gerais.....	09
3.2. Vírus da hepatite B.....	11
3.3. Replicação do HBV.....	12
3.4. Ciclo de vida do HBV.....	13
3.5. Infecção pelo HBV.....	14
3.6. Epidemiologia.....	15
3.7. Transmissão do HBV em grupos de maior risco.....	15
3.8. Manifestações clínicas.....	16
3.9. Hepatite B e transplante renal.....	17
3.10. Transmissão do HBV em doadores HbSAg positivos.....	18

3.11. Reativação do HBV após transplante renal.....	18
4. Hepatite B oculta	21
4.1. Introdução.....	22
4.2. Detecção do DNA do vírus da hepatite B.....	23
4.3. Mecanismos de infecção oculta pelo HBV	24
5. Justificativa.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
OBJETIVOS	45
1. Objetivo Geral	45
2. Objetivos Específicos	45
CONCLUSÃO.....	46
ARTIGO EM PORTUGUÊS	47
ARTIGO EM INGLÊS.....	69

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1- Freqüência de receptores de enxerto renal positivos para HBsAg	17
Tabela 2- Doença hepática em receptores de transplante renal.....	20

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1- Dados demográficos nos grupos anti-HCV reagente e anti-HCV não reagente.....	65
Tabela 2- Dados laboratoriais nos grupos anti-HCV reagente e anti-HCV não reagente.....	66
Tabela 3- Análise multivariada.....	67
Tabela 4- Proporção de Gene S nos subgrupos.....	68

ARTIGO EM INGLÊS

Table 1. Demographic data in the anti-HCV reagent and anti-HCV non-reagent groups.....	86
Table 2. Laboratory data in the anti-HCV reagent and anti-HCV non-reagent groups.....	87
Table 3. Multivariate analysis model to evaluate the alanine aminotransferase alteration.....	88
Table 4. Prevalence of S gene positivity of occult hepatitis B.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
Anti-HCV	Anticorpos anti-HCV
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HbeAg	Antígeno de replicação viral do vírus da hepatite B
HBcAg	Antígeno de core do vírus da hepatite B
Anti-HBc IgM	Anticorpos IgM anti-HBc
Anti-Hbs	Anticorpos anti-HBs
Anti-Hbe	Anticorpos anti-HBe
HCC	Carcinoma hepatocelular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
CyA	Ciclosporina
Aza	Azatioprina
PCR	Reação de cadeia da polimerase
Tx	Transplante
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
GGT	Gama glutamiltranspeptidase

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

O transplante renal é hoje a melhor opção terapêutica para uma parcela significativa dos pacientes com insuficiência renal crônica, seja do ponto de vista médico, social ou econômico, estando indicado em pacientes com falência renal terminal em fase dialítica ou pré dialítica (1). Atualmente os transplantes renais tem elevado índice de sucesso e no mundo todo são executados milhares de transplantes anualmente. No Brasil realizam-se em torno de 3000 transplantes por ano, e este número ainda é insuficiente para atender a crescente demanda de indivíduos com insuficiência renal crônica terminal candidatos ao transplante renal (2).

Nos últimos anos ocorreu um grande avanço terapêutico no que diz respeito a drogas imunossupressoras, possibilitando hoje uma prescrição mais individualizada, fornecendo ao paciente o regime mais adequado de imunossupressão. Em 2003 no Rio Grande do Sul havia 4600 pacientes em programa de diálise crônica e 1015 (22%) em lista de espera para transplante renal com doador cadáver. Este dado demonstra que boa parte dos pacientes em programa de diálise crônica apresenta uma ou mais contra-indicações absolutas ou relativas para realização de transplante. Entre os principais problemas encontrados, a presença de infecção crônica por vírus hepatotrópicos é um achado freqüente nestes pacientes.

Enquanto a prevalência do vírus da hepatite B (HBV) vem diminuindo continuamente em pacientes em tratamento dialítico e conseqüentemente nos pacientes transplantados renais, a prevalência do vírus da hepatite C (HCV) tem permanecido estável. As razões para esse achado parecem ser diversas. O melhor conhecimento da transmissibilidade do HBV, a introdução da eritropoietina, que diminuiu consideravelmente a necessidade das transfusões sangüíneas e seus

posteriores riscos, e a disponibilidade de vacinas efetivas para o HBV parecem ser os fatores responsáveis pela diminuição da prevalência desta infecção.

Em relação ao HCV o quadro não é tão promissor. Não existem até o momento vacinas efetivas contra o HCV, a transmissibilidade é alta no ambiente de hemodiálise e a prevalência no meio além de elevada, tem permanecido estável ao longo dos anos. Em 1995 Karohl e cols. detectaram prevalência de 29,8% de pacientes com anticorpos anti-HCV em unidades de hemodiálise de Porto Alegre (3), e em 2003 Dotta e cols. detectaram uma prevalência de 31,2 % de pacientes com anticorpos anti-HCV em unidades de hemodiálise na mesma localização geográfica (4).

A doença hepática crônica continua sendo um problema relevante após o transplante renal e isso decorre principalmente da toxicidade por drogas ou das infecções por vírus hepatotrópicos, em especial o HBV e o HCV. O uso imperativo de imunossupressão farmacológica nos pacientes transplantados renais pode potencialmente alterar a evolução da história natural destas infecções, propiciando um curso mais acelerado do dano hepático na medida em que possibilita maior replicação viral ou, alternativamente, diminuindo a resposta inflamatória e assim a agressão tecidual (5).

A infecção pelo HBV tem sido apontada como um fator de risco significativo para o óbito pós transplante renal (6,7). No entanto, recentemente, em um estudo de grande porte não foi evidenciada maior mortalidade ou perda do enxerto em pacientes infectados pelo HBV (8).

O efeito da infecção pelo HCV em pacientes receptores de transplante renal permanece controverso, sendo que alguns estudos não mostraram impacto significativo na sobrevida do enxerto e do paciente (5,8,9). No entanto, em estudos com maior tempo de seguimento tem-se demonstrado pior sobrevida dos pacientes anti-HCV positivos quando comparados aos anti-HCV negativos (10-12).

Adicionalmente, é importante que se enfatize que pacientes anti-HCV positivos tem melhor sobrevida quando transplantados do que permanecendo em tratamento dialítico (12). Com base nestes dados podemos concluir que a infecção pelo HCV tem um impacto negativo na sobrevida de longo prazo de pacientes transplantados renais, em relação aos pacientes anti-HCV negativos. Por outro lado, o transplante renal não parece ter impacto negativo na sobrevida de pacientes com hepatite C.

Em um estudo de acompanhamento de dez anos pós transplante Correia e cols. demonstraram que HCV e HBV isolados não causavam efeito deletério na sobrevida do paciente e do enxerto renal, mas que a coinfeção pelo HCV e HBV apontava para um efeito negativo significativo com redução da sobrevida dos pacientes (13).

Recentemente foi descrito na literatura um tipo particular de infecção pelo HBV no qual detecta-se a presença do DNA viral em pacientes sem HBsAg detectável pelos métodos sorológicos convencionais. Esta é a chamada hepatite B oculta, onde caracteristicamente os pacientes apresentam baixas cargas virais, em geral menores que 10^4 cópias/ml, o que possivelmente explique a falha dos métodos sorológicos convencionais em detectar o HBsAg (14-16). Diversos estudos indicam que a hepatite B oculta é mais freqüente em pacientes infectados pelo HCV (15, 17-20). As implicações clínicas da infecção oculta pelo HBV ainda não estão bem definidas. Dados da literatura suportam desde a não influência na evolução clínica da doença hepática até a ocorrência de replicação viral mais acelerada (21). Há também a sugestão de que nos pacientes com hepatite B oculta co-infectados pelo HCV haveria menor resposta à terapia com interferon alfa, progressão mais rápida para a cirrose hepática e maior tendência ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (15, 22-24).

Pacientes transplantados renais são muitas vezes infectados pelo HBV e/ou pelo HCV em decorrência de suas exposições epidemiológicas prévias, seja na diálise, por transfusões

prévias ou no procedimento do transplante. Nesta população, o curso da doença hepática viral pelos vírus B ou C isolados é controverso, no entanto está bem estabelecido que a co-infecção pelos vírus B e C determina prognóstico desfavorável (7, 22, 24-26).

Parte da variabilidade nos desfechos de sobrevida encontrados nos estudos com pacientes transplantados renais com hepatite C pode ser devida à presença de hepatite B oculta, o que nos levou a executar este estudo visando determinar a prevalência desta condição em nossa população de pacientes transplantados renais.

2. Hepatite C

2.1. Aspectos biológicos do vírus C

Inicialmente denominada de hepatite não A não B, a hepatite C foi durante várias décadas uma constante interrogação aos pesquisadores e estudiosos da história natural das hepatites pós-transfusionais. Nos primeiros anos da década de 80, estudos experimentais em primatas desenvolvidos no Centro de Controle de Doenças de Atlanta (EUA), revelaram a presença de um agente infeccioso com 60 nm de diâmetro, revestido de um invólucro lipoprotéico, com o genoma constituído de ácido ribonucleico (RNA), classificado inicialmente como pertencente à *família Togoviridae* e transmissível mediante sangue e hemoderivados (27). No momento da descoberta, Daniel Bradley e colaboradores o denominaram de “Agente de Forma Tubular”.

Em 1989, mediante a sucessivos estudos de biologia molecular, Michael Houghton e colaboradores identificaram finalmente o genoma do agente viral responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não A e não B (28). Tal agente foi denominado de "vírus da

hepatite C", apresentando características biológicas peculiares que o diferenciam dos outros agentes virais hepatotrópicos (29).

Após a clonagem do vírus do HCV e uma seqüência de descobertas, tais como: a expressão da proteína viral recombinante; o desenvolvimento de testes imunológicos específicos; a análise de sua seqüência nucleotídica e o conhecimento de sua elevada taxa de mutação, permitiram-nos conhecer em um breve espaço de tempo informações importantíssimas sobre os principais aspectos biológicos do HCV, o perfil epidemiológico da infecção e a história natural da doença.

Com relação aos seus aspectos biológicos, o genoma do HCV é constituído por uma molécula de RNA em cadeia simples e polaridade positiva, com aproximadamente 10.000 nucleotídeos (28).

A análise da seqüência nucleotídica deste vírus revelou homologia entre dois membros da família *Flaviviridae* (vírus da Febre Amarela e Dengue) e como também da família *Pestiviridae* (30,31). O genoma do HCV, como outros vírus constituídos de RNA apresenta um notável grau de variabilidade, determinando variações de sua seqüência, e conseqüentemente, mutação genética. A análise comparativa de sua seqüência evidenciaram a existência de pelo menos seis genótipos virais (32-34), subtipados como 1a /1b, 2a/2b, 3a, 4, 5, 6 , de acordo com classificação proposta por Simmonds e cols. (35).

Estudos recentes revelam uma distribuição geográfica diferenciada quanto aos subtipos do HCV (36), predominando os subtipos 1a e 1b nos Estados Unidos, Japão, Europa e América Latina, enquanto os subtipos 2a e 2b tem distribuição universal. Os subtipos 3a e 5 são observados com maior prevalência em países da América do Sul, e em menor grau na Europa e Estados Unidos. O subtipo 4 é endêmico no Egito, Gabão e em países do Oriente Médio e o subtipo 6 predomina em doadores de sangue, nativos de Hong Kong. Numerosos estudos

sugerem que a elevada heterogenicidade do HCV tenha implicação patogênica, terapêutica e preventiva (37-39).

2.2. Transmissibilidade

O perfil epidemiológico da infecção pelo HCV é tão complexo quanto a história natural da doença ocasionada por este agente viral. Circulando no sangue em baixos títulos, o HCV tem como principais mecanismos de transmissão o sangue infectado e seus hemoderivados. Nos Estados Unidos da América do Norte, estudos prospectivos e realizados pelo Instituto Nacional de Saúde revelaram um marcado decréscimo da infecção pelo VHC após a realização dos testes para a detecção do anti-HCV, como procedimento de rotina nos bancos de sangue (40).

No período de 1960 a 1991, 5 a 15% dos receptores de produtos sanguíneos infectaram-se com o HCV. De acordo com estes estudos, no momento atual o risco de transmissão do HCV por transfusão sanguínea é de 1:103.000. Na Itália, a incidência de hepatite C pós-transfusional por 1.000.000 de habitantes alcançou níveis de 7,5% em 1986 e de 0,4% em 1993, revelando estes dados uma importante queda na transmissão do HCV por transfusão sanguínea (41). Recentemente, com o advento de testes mais sensíveis por biologia molecular, já em uso em países desenvolvidos, o risco de se infectar com HCV por transfusões de sangue e seus hemoderivados é de 1:2.700.000 (42).

Independente do baixo risco de transmissão do HCV por produtos sanguíneos, devem-se considerar que outros mecanismos de transmissão são capazes de infectar um indivíduo exposto a este vírus, tais como uso de drogas intravenosas, transplante com órgãos de doadores infectados, uso de cocaína intra-nasal e promiscuidade sexual.

Estudos recentes identificaram que 75% dos pacientes infectados pelo HCV tinham como principal fonte de infecção a via parenteral, seja de forma aparente, inaparente, direta ou

indireta (43). Peculiar, a transmissão do HCV por via parenteral inaparente direta estaria provavelmente localizada no ambiente familiar, tendo como fatores epidemiológicos a exposição e transmissão por lesões cutâneas e de mucosas. Por outro lado, a transmissão por via parenteral inaparente indireta poderia estar relacionada com o contacto íntimo prolongado ou através da contaminação de instrumental e utensílios contaminados com sangue infectado. Porém, até o presente momento, não existem evidências de transmissão familiar ou sexual, quando os contatos específicos do caso índice foram testados (44).

Com relação à transmissão vertical (materno-fetal) e de acordo com Ohto e cols. (45), esta ocorreria em apenas 5,65% dos casos e estaria relacionada com os altos títulos do HCV-RNA circulante materno.

2.3 Epidemiologia

Na população em geral, os índices de prevalência de hepatite C variam de região para região. Na maioria dos países da Europa Ocidental e na América do Norte, a prevalência varia de 0,1% a 2,0%, enquanto em determinadas áreas do Mediterrâneo este percentual alcança 2,9% da população estudada (40,41,46). As maiores taxas de prevalência são observadas na África, com percentuais que variam de 6,0 a 12,5% (47). Estudos da prevalência da infecção pelo HCV em doadores de sangue revelam índices menores em países da Europa Ocidental, variando de 0,3 a 0,8%, e outros bastante significativos em determinadas áreas da Ásia e África, 2,0 e 13,6%, respectivamente. Na América do Norte, a taxa média de prevalência entre os doadores de sangue está em torno de 0,16% (44). A prevalência de infecção pelo HCV no Brasil está ao redor de 1,4% na população geral e 2% nos doadores de sangue. Esta estatística na América do Sul é estimada por estudos realizados em amostras de pré-doadores de sangue (42, 48).

A infecção pelo HCV tem uma distribuição universal e a sua alta taxa de prevalência está diretamente relacionada com os chamados grupos de riscos (hemofílicos, pacientes hemodialisados, receptores de múltiplas transfusões de sangue, recém-nascidos de mães portadoras, toxicômanos). Nestes, dois grupos chamam a atenção, os hemofílicos e os pacientes hemodialisados. Nos hemofílicos, a prevalência de infecção pelo HCV varia de 53 a 89% em vários países do mundo (49) e no Brasil observam-se índices de até 87,3% (50), enquanto nos pacientes hemodialisados verificamos percentuais que variam de 10,0% a 47,2% (51-54), sendo encontrada uma maior prevalência na Ásia e África, e menores prevalências nos EUA.

2.4. Hepatite C e transplante renal

O curso clínico e os desfechos impostos pela infecção pelo HCV em pacientes transplantados renais infectados pelo vírus da hepatite C tem sido alvo de muitos estudos, sendo que alguns não mostraram impacto significativo na sobrevida do enxerto e do paciente, como mencionado anteriormente (5, 8, 9). Entretanto, estudos com maior tempo de seguimento, dez anos ou mais, demonstram uma piora na sobrevida do paciente e do enxerto renal para os receptores anti-HCV positivos, quando comparados a receptores anti-HCV negativos (10-12). As causas de piora da sobrevida do paciente são principalmente a cirrose descompensada e o hepatocarcinoma, enquanto que a causa de piora na sobrevida do enxerto renal é a glomerulonefrite *de novo* dos pacientes anti-HCV positivos (2).

Atualmente o tratamento de escolha para pacientes anti-HCV positivos com hepatopatia crônica ativa é a combinação de interferon alfa associado a ribavirina, tendo como objetivo primário a erradicação do vírus a longo prazo, e como objetivo secundário a prevenção da cirrose e do carcinoma hepatocelular. A resposta terapêutica varia de acordo com o genótipo viral, desde 42% em pacientes com genótipo tipo 1 até 82% nos genótipos tipo 2 e 3 (21).

3. Hepatite B

3.1. Considerações gerais

A doença conhecida como hepatite B é causada pela infecção do vírus da Hepatite B (HBV). A hepatite B tem uma série de denominações que representam o conhecimento que foi sendo adquirido acerca desta doença: hepatite do soro, hepatite de inoculação, hepatite pós-transfusão, hepatite do antígeno Austrália, entre outros (55). Esta hepatite toma ainda a designação de *hepatite sérica* para a distingüir da *hepatite infecciosa* – hepatite A (56). A adoção do termo hepatite B surgiu por oposição à hepatite A, doença de curta incubação.

Em 1970, Dane e cols. (57) conseguiram identificar as partículas do vírus da hepatite B (HBV) no soro de um paciente, mas já em 1964, Blumberg identificara o antígeno de superfície deste vírus, que denominou antígeno Austrália, mas que atualmente se denomina HBsAg (55). Kaplan e cols. (58) confirmaram a natureza viral destas partículas, detectando um DNA endógeno dependente de uma DNA polimerase que se encontrava no seu interior. A descoberta desta polimerase permitiu a caracterização do genoma do HBV por Robinson e Greenman (59).

Estudos epidemiológicos demonstram que a hepatite B é responsável por 2 milhões de mortes por ano em todo o mundo. As estatísticas confirmam, em todo o mundo, a existência de 200 milhões de portadores da hepatite B, o que corresponde a 5% da população geral. Define-se portador como o indivíduo que apresenta antígeno de superfície (HbsAg) por um período superior a 6 meses. Verificou-se, também, uma correlação geográfica significativa entre o número de portadores crônicos de antígeno em um determinado país e a incidência anual de carcinoma hepatocelular, demonstrando que a existência de risco em contrair este tipo de tumor

é aproximadamente 200 vezes superior nos portadores crônicos do antígeno, relativamente aos não portadores (55).

Estudos realizados na década de 40 permitiram concluir que a hepatite B se tratava de uma doença altamente infecciosa por inoculação. Não se acreditava, no entanto, que esta doença fosse transmitida por via oral. Atualmente, estudos efetuados detectaram a presença do HBV no sangue, saliva, leite materno, fluidos vaginais, sêmen e outros líquidos corporais (56).

O avanço das investigações permitiu identificar as zonas onde esta doença é mais prevalente e os grupos de risco, sabendo-se agora que é mais comum nos homens do que nas mulheres, afetando particularmente os jovens adultos que vivem em meios urbanos, especialmente consumidores de droga e homossexuais masculinos. Entre as medidas gerais de prevenção, descrevem-se a determinação obrigatória de HBsAg em doentes submetidos a transfusões ou hemodiálise, o uso de materiais descartáveis, a formação sobre atitudes preventivas na manipulação de material que se sabe contaminado, e a imunização (55). Existem vacinas disponíveis contra o HBV, mas podem não ser totalmente efetivas contra todas as variantes do vírus, não existindo cura para os indivíduos infectados. São necessários mais estudos para que se possa compreender e controlar melhor o desenvolvimento deste agente infeccioso.

3.2. Vírus da Hepatite B (HBV)

O genoma do HBV é único na virologia devido à sua natureza compacta, por possuir moldes de leitura sobrepostos e por ser dependente da transcrição reversa.

O HBV é um vírus de DNA da família *Hepadnaviridae*, pertencendo ao gênero *Hepadnavirus* (vírus hepatotrópico de DNA). O seu genoma é constituído por 3200

nucleotídeos, em cadeia dupla, uma longa e uma curta, tendo esta última comprimento variável (60, 61). A partícula vírica infecciosa ou virião do HBV, denominada partícula Dane, revela uma estrutura interna ou “core” (HBcAg), e um invólucro externo (HBeAg), com um diâmetro de 42 nm (62). Os viriões purificados possuem a proteína HBc que se vai agregar, dando origem à estrutura interna ou “core”.

O “core” encerra no seu interior o genoma do vírus e a enzima DNA polimerase. O invólucro externo ou antígeno de superfície, é constituído por proteínas, glicoproteínas e lípidos, e compreende três componentes moleculares básicos, pré-S1, pré-S2 e pequeno S, ou forma predominante. No virião maturo, o “core” é envolvido pelas membranas de superfície da hepatite B. Parece que os domínios dos envelopes das proteínas, Pre-S1 e S, interagem com o “core” (63).

Além da partícula infecciosa, existem outras partículas subvirais menores, com 20 nm de diâmetro, de forma filamentosa e esférica que podem ser encontradas no soro de indivíduos infectados. Estas formas são constituídas exclusivamente por antígenos de superfície, e como não contêm o genoma do vírus, não sendo infecciosas .

Elevados níveis destas partículas não infecciosas podem ser encontrados na fase aguda da infecção. Os altos níveis destes antígenos de superfície induzem uma resposta imune. Contudo, pensa-se que a presença de tais níveis elevados das proteínas não infecciosas pode permitir que as partículas virais infecciosas passem para a corrente sanguínea, sem serem detectadas pelos anticorpos neutralizantes (64).

O vírus da hepatite B é bastante estável, podendo apenas ser inativado por fervura em água durante 10 minutos, por aquecimento em autoclave a 121°C durante 15 minutos, por calor seco a 160°C durante 2 horas, por hipoclorito de sódio a 1% durante 30 minutos, por formaldeído aquoso a 16% durante 2 horas e por esterilização com óxido de etileno (61).

3.3. Replicação do HBV

O processo inicial da entrada do vírus no hepatócito não é detalhadamente conhecido, mas parece envolver receptores específicos no invólucro do vírus e no hepatócito. O primeiro parece localizar-se na região pré-S1, aminoácidos 21-47, e o receptor celular ainda não foi identificado. A não existência de um sistema de células em cultura em que o vírus possa se propagar tem dificultado estes estudos. As culturas primárias de hepatócitos humanos não são susceptíveis à infecção pelo HBV, sendo necessário preparar culturas de hepatócitos de rato, que suportam a infecção produtiva pelo vírus da hepatite do pato, permitindo assim o estudo da ligação do vírus ao hepatócito e a sua internalização.

O conhecimento do mecanismo de replicação do genoma dos hepadnavírus deriva fundamentalmente do estudo do vírus da hepatite do pato realizado por Summers e Mason (63). Estes autores demonstraram que o genoma do DNA do vírus é replicado através de um RNA de cerca de 3,4 Kb. Este RNA constitui o molde para a síntese de uma das cadeias da molécula de DNA pela atividade enzimática da transcriptase reversa (polimerase do vírus). Para além do RNA pré-genômico que serve de molde para a replicação, existe uma outra espécie de RNA aproximadamente do mesmo tamanho que o RNA mensageiro (mRNA) para a síntese da proteína “core” e da proteína multifuncional P. O fato destas proteínas estarem em cadeias de leitura diversas implica que o ribossoma inicia a tradução numa seqüência de iniciação interna para traduzir a proteína P. Os mRNA dos antígenos de superfície de 2,4 e 2,1 Kb, correspondem o primeiro à proteína pré-S1 e o segundo à proteína pré-S2 e S, este último traduzido a partir de uma seqüência de iniciação interna. Finalmente, o produto do gene X parece ser traduzido a partir de uma outra espécie de mRNA. Algumas seqüências reguladoras da transcrição foram

mapeadas (promotores e “enhancers”) e algumas interações específicas entre estas seqüências e fatores de transcrição derivados da célula hepática (que podem também contribuir para o hepatotropismo do vírus) começam agora a ser esclarecidas (63).

3.4. Ciclo de vida do HBV

O vírus da hepatite B, tal como todos os vírus, tem que primeiramente ligar-se a uma célula capaz de suportar a sua replicação. Embora os hepatócitos sejam mais efetivos para a replicação do HBV, existem outros sítios extrahepáticos que também conseguem suportar a replicação, mas em nível mais baixo.

Após a entrada do vírus no hospedeiro, seu primeiro passo, se passar pelo sistema imunitário, é infectar os hepatócitos. O vírus ataca a membrana do hepatócito e a partícula “core” penetra na célula, liberando seu conteúdo no núcleo do hepatócito. Dentro do núcleo da célula, o DNA do HBV vai induzir a produção de RNA mensageiro, proteínas de superfície (HBs), proteína core (HBc), DNA polimerase e proteína Hbe. Como a DNA polimerase vai induzir o hepatócito a produzir cópias do vírus da hepatite B, estas cópias do vírus serão liberadas da membrana das células do fígado para a circulação sanguínea e podem infectar outras células hepáticas, que se vão replicar. Contudo, ao longo da replicação, podem ocorrer erros originando cadeias diferentes ou cadeias mutantes da hepatite B (63).

3.5. Infecção pelo HBV

É possível um indivíduo estar infectado com o vírus da hepatite B e não apresentar quaisquer sintomas de doença. No entanto, comumente, ocorre um quadro agudo pela hepatite

que manifesta-se por mal estar, cansaço e perda de apetite. Por vezes, observa-se apenas icterícia. Estes sintomas podem durar uma semana até alguns meses.

O diagnóstico da hepatite B é geralmente realizado com base na sorologia. Virtualmente, todos os indivíduos infectados com HBV irão possuir antígenos (HBsAg) detectáveis no soro. Na infecção aguda os antígenos são detectáveis no soro algumas semanas após a infecção, coincidindo com o aparecimento dos sintomas da doença, e também podem ser detectados pela elevada taxa de replicação viral observada neste tipo de infecções. Ao mesmo tempo, os anticorpos IgM contra os antígenos da partícula “core” são detectáveis no soro. Subsequentemente, anticorpos IgG contra os antígenos da partícula “core” são produzidos. À medida que a infecção aguda se dissipa, os anticorpos IgG contra os antígenos da partícula “core” vão persistir, mas os anticorpos IgM e o antígeno da hepatite B (HBsAg) tornam-se indetectáveis. Os indivíduos que desenvolvem uma resposta imunitária contra o HBV desenvolvem anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus B, o anti-HBs. Tais anticorpos são também induzidos pela vacinação.

Cerca de 90% das pessoas que foram infectadas pelo vírus B se recuperam e vão continuar a produzir anticorpos IgG para os antígenos da partícula “core” para o resto de sua vida, tornando-se imunes à doença. Contudo, cerca de 10% das pessoas infectadas perdem estes anticorpos, tornando-se susceptíveis a uma infecção futura ou a desenvolverem infecção crônica (63).

3.6. Epidemiologia

O vírus da hepatite B encontra-se globalmente distribuído. Apesar de existirem indivíduos afetados em todo o mundo, a prevalência do vírus está diminuindo nos países desenvolvidos, devido à vacinação efetiva.

A OMS calculava, em 1992, que mais de um terço da humanidade apresentava marcadores da infecção pelo HBV e que existiriam cerca de 350 milhões de portadores crônicos do vírus, dos quais cerca de 65 milhões faleceriam em consequência da infecção.

A distribuição do vírus é muito desigual podendo considerar-se três níveis diferentes de endemia, sendo regiões de endemia elevada a África, o Sudoeste Asiático, o Sul da China, a Bacia Amazônica, o Alasca e a Gronelândia, onde 8 a 20% da população é portadora da infecção e 70 a 90% teve contacto com o vírus. A transmissão vertical do HBV assume nessas regiões uma importância primordial e, em consequência, o grupo etário predominante é o das crianças de pouca idade. Nas regiões de endemia média – Europa Oriental, Baixo Oriente e Bacia Mediterrânea – 2 a 7% da população é portadora do vírus, enquanto nas regiões de baixa endemia – Europa Ocidental, América do Norte e Austrália – a prevalência de portadores é inferior a 2%. Nas regiões de média e baixa endemia a infecção afeta sobretudo, os adolescentes e os adultos jovens (61).

3.7. Transmissão do HBV e grupos de maior risco

O vírus está presente nos líquidos orgânicos, particularmente no sangue, no sêmen, nas secreções vaginais e na saliva, daí que as principais vias de transmissão sejam a percutânea, a

sexual e a vertical. A saliva pode ser veículo de transmissão através de mordeduras, não estando comprovadas outras formas de contágio pela saliva.

Estão descritos casos esporádicos e maior prevalência de infecção pelo HBV em algumas famílias de portadores sem que as vias de transmissão sejam conhecidas. É possível que nestes casos a transmissão percutânea inaparente desempenhe algum papel (61).

A rejeição de derivados de sangue daqueles indivíduos com sorologia positiva para o HBV e/ou com alterações das aminotransferases reduziu de forma drástica a incidência de casos de hepatite pós-transfusional. A inativação do vírus pelo calor nos derivados de sangue e a adoção de medidas mais rigorosas de higiene, a utilização de agulhas e outros materiais descartáveis e a esterilização de outros instrumentos médicos permitiu também uma redução acentuada de casos adquiridos em consequência de atos médicos.

A transmissão parenteral continua a ser importante no grupo dos drogadictos com uso de drogas endovenosas. Os politransfundidos e os hemodialisados tiveram reduzido o seu risco de aquisição da infecção, devido as alterações introduzidas no seu tratamento. Nos países de baixa prevalência, a transmissão sexual, sobretudo em indivíduos com múltiplos parceiros, constitui um modo de contágio bastante freqüente (61).

3.8. Manifestações clínicas

O HBV é responsável por quadros de hepatite aguda, muitas vezes anictéricos. Em cerca de 90 a 95% dos casos, a infecção aguda resolve-se com o desaparecimento do antígeno HBsAg e o desenvolvimento de imunidade protetora, mas em cerca de 1% dos casos a infecção aguda pode ter uma evolução fulminante. Cinco a dez por cento das infecções, adquiridas na idade adulta, evoluem para a cronicidade com o possível desenvolvimento de cirrose ou neoplasia do

fígado, embora esta seja pouco frequente no nosso meio. A evolução para a cronicidade é mais frequente e a doença é, eventualmente, mais grave quando a infecção é adquirida por transmissão vertical ou no pós-parto (61).

Hepatite B e transplante renal

Doença hepática é uma complicação frequente e uma importante causa de morbidade e mortalidade em receptores de transplante renal (65-71). O HBV e o HCV são os maiores agentes de doença hepática em transplantados renais.

Índices variados de infecção pelo HBV tem sido encontrados em receptores para enxerto renal. (Tabela 1)

Tabela 1. Frequência de receptores de enxerto renal positivos para HBsAg

Autor	Ano de publicação	HBsAg positivo	
		n	%
Pouteil-Noble et al. (71)	1995	108/1.096	9,8
Mathurin et al. (73)	1993	128/834	15,3
Aroldi et al. (68)	1992	105/524	20,0
Bang et al. (74)	1995	79/577	13,7
Hiesse et al. (75)	1992	109/510	21,3

A prevalência de positividade para HBsAg em receptores de transplante renal está decrescendo. Mathurin e cols. (73) encontraram um significativo decréscimo de receptores HBsAg positivos : 24,2% antes de 1982 versus 9,1% após 1982 .

A frequência de aquisição do HBsAg no pós transplante renal varia muito nos diferentes centros. Huang e cols. (76) encontraram somente 6,1% de pacientes que adquiriram HBsAg

durante ou após o transplante renal, enquanto que Parkey e cols. (77) encontraram um número bem mais elevado de 59%, observando que a maioria dos pacientes adquiriram o HBsAg nos 6 meses que se seguiram ao transplante renal. Bang e cols. (74) observaram que 16,4% dos seus receptores de Tx renal tornaram-se HBsAg positivos no seguimento após o transplante renal.

3.10. Transmissão do HBV em doadores HBsAg positivos

A possibilidade de transmissão do HBV a partir de doadores HBsAg positivos para receptores HBsAg negativos é bem documentada (78). Mas o tipo de infecção, seja com o quadro de hepatite clínica com alterações enzimáticas ou apenas o surgimento de marcadores antivirais, varia de paciente para paciente.

3.11. Reativação do HBV após o transplante renal

O transplante renal não é contra-indicado nos pacientes com insuficiência renal crônica e infecção assintomática pelo vírus da hepatite B. Porém a evolução clínica da hepatopatia e a sobrevida do enxerto podem ser piores nestes pacientes.

O efeito do transplante renal na atividade do HBV foi bem descrito por Nagington e cols. (79). Eles observaram que nos receptores de transplante havia aumento da replicação viral, fato constatado pelo reaparecimento e/ou aumento no plasma do nível de HBV-DNA, bem como o reaparecimento do HBsAg.

Degos e cols. (80) demonstraram reativação do HBV em 11 de 12 (92%) pacientes HBsAg positivos e aumento da replicação viral em 6 de 11 (54%) pacientes. Um outro achado importante foi a descrição de um subgrupo de pacientes (7/35 – 20%) sem HBsAg ou HBV DNA no soro antes do transplante renal, mas com HBV-DNA, detectado por hibridização no soro no seguimento do transplante. Tal achado sugere que a imunossupressão pode propiciar

aumento na replicação do HBV. Os mecanismos citados pelos quais a terapêutica imunossupressora pode permitir o aumento na replicação do HBV são :

- a) A atividade dos linfócitos T citotóxicos está diminuída e o genoma do HBV contém um elemento glicocorticóide responsivo, o que serve como um sinal para aumentar a atividade do HBV (81);
- b) Os glicocorticóides podem causar a produção do HBsAg e HBeAg e expressão do DNA viral por estimulação da transcrição do HBV (82,83);
- c) A azatioprina parece estimular a síntese intracelular de HBV (84);
- d) A ciclosporina tem efeitos diretos na replicação viral (85).

Em um estudo no qual foram avaliados 151 receptores de transplante renal HBsAg positivos com média do tempo de seguimento de 125 meses, observou-se piora da histologia hepática em 85% dos pacientes, o que foi acompanhado de cirrose em 28% dos pacientes e de carcinoma hepático em 23% dos casos. A sobrevida do enxerto renal foi significativamente menor no grupo dos pacientes com hepatite B quando comparados com o grupo não infectado (21). Outro estudo também demonstrou que a mortalidade de pacientes portadores do vírus da hepatite B é maior em relação aos pacientes HBsAg negativos, e o prognóstico é pior naqueles que apresentavam replicação viral (HBeAg positivo) e co-infecção pelo HCV (21).

Considera-se que a elevação de enzimas hepáticas aumenta a probabilidade de evidência histológica de doença hepática. No entanto, a correlação entre a atividade das aminotransferases e a severidade da doença hepática pode não ser tão forte (76). A frequência de doença hepática crônica, definida como elevação das aminotransferases é demonstrada na Tabela 2

Tabela 2. Doença hepática em receptores de transplante renal

Autores	Ano de publicação	Pacientes com doença hepática crônica	Frequência %
La Quaglia et al. (65)	1981	35/405	8,6
Parfrey et al. (66)	1985	54/358	15
Weir et al. (67)	1985	26/184	14
Aroldi et al. (68)	1992	212/684	30,9
Rao and Anderson (69)	1995	115/785	14
Chan et al. (72)	1992	10/98	10,2

Um grande número de receptores com infecção pelo HBV não mostra sinais bioquímicos de doença hepática (76). As possíveis explicações para a ausência destes achados bioquímicos em receptores de transplante renal HBV positivo seriam os baixos níveis de replicação viral do HBV, a flutuação da carga viral do HBV e as condições de saúde do paciente carreador do vírus (53, 54).

Em pacientes HbsAg positivos e candidatos ao transplante renal é importante identificar os fatores relacionados ao vírus (nível de DNA e genótipo) e ao receptor, como o nível de alanina aminotransferase (ALT) e histologia hepática. Carga viral alta pré transplante, demonstrada pela positividade do HBeAg ou por níveis superiores a 10^5 cópias/mL, tem sido associada com piora da sobrevida ao longo de dez anos. Conforme citado anteriormente, os níveis de ALT não tem uma forte correlação com a gravidade da doença hepática pré ou pós transplante. O fator preditivo de mortalidade mais importante é a presença de cirrose pré transplante, o que indica a necessidade da biópsia hepática para definir o grau de lesão histológica destes pacientes (21).

No que diz respeito ao tratamento dos receptores de transplante renal com hepatite B, a melhor conduta ainda não está bem definida. O tratamento com alfa interferon tem eficácia baixa em pacientes imunossuprimidos e pode desencadear rejeição aguda do enxerto renal (87, 88). Nestes pacientes a lamivudina vem sendo testada como opção terapêutica. Alguns estudos clínicos não controlados demonstraram DNA viral indetectável em até 80% dos pacientes tratados, e normalização das enzimas hepáticas até 4 meses pós tratamento. O melhor momento para o início da terapia é controverso, podendo esta ser utilizada como tratamento da ativação do HBV ou como tratamento pré-emptivo em todos os pacientes HBsAg positivos no momento do transplante. Este tratamento não tem benefício para hepatite colestática fibrosante ou cirrose descompensada, porém suprime a reativação da hepatite B crônica e previne a progressão para cirrose. O uso pré-emptivo também está associado am menor indução de resistência viral manifesta pelo surgimento da variante genética YMDD. Os níveis de HBV-DNA e alanina aminotransferase (ALT) devem ser monitorizados trimestralmente em todos os pacientes em terapia com lamivudina. Níveis crescentes de cópias do DNA viral, na vigência do tratamento com lamivudina podem refletir indução de resistência ao medicamento. Nestes casos deve-se monitorizar a ALT mensalmente e considerar o uso de adenofovir (90- 92).

4. Hepatite B oculta

4.1. Definição

Infecção crônica pelo HBV é caracterizada pela persistência do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e viremia. O clearance do HBsAg em pacientes com infecção pelo HBV é associado com o desaparecimento da viremia e remissão da doença. Entretanto, vários dados indicam que baixos níveis de HBV-DNA permanecem detectáveis no soro e no tecido hepático

de pacientes que negativaram o HBsAg , após hepatite auto-limitada ou após tratamento antiviral com sucesso.

A esta entidade clínica deu-se o nome de “hepatite B oculta”, ”hepatite B silenciosa” ou “hepatite B latente”, que foi definida como a presença de infecção pelo HBV em pacientes com HBsAg indetectável. Neste grupo de pacientes com infecção crônica pelo HBV é o vírus B identificado usando-se testes moleculares de alta sensibilidade para HBV DNA (93). Seus primeiros relatos são da década de 80, quando transfusão sanguínea de pacientes portadores de anticorpos anti-HBs e HBsAg negativos mas com Anti-HBc positivo, resultou em infecção pelo HBV (94).

Posteriormente, com a disponibilidade das técnicas moleculares, foi encontrado HBV DNA em pacientes com HBsAg negativo, mas com Anti-HBs positivo, o que até então era considerado marcador de imunidade contra o HBV.

A infecção oculta é vista com mais frequência em pacientes que tenham anti-HBc como único marcador sorológico da hepatite. Entretanto também é descrita infecção oculta em pacientes com Anti-HBs isolado ou até mesmo em pacientes sem nenhum marcador sorológico de hepatite (95- 98). Também é descrita uma maior prevalência de hepatite B oculta em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV), mas as taxas de prevalência são bastante variadas, sendo maior a prevalência em determinadas regiões geográficas, como a Ásia (99). Paralelo a este dado, em publicações recentes foi demonstrado que a associação entre a co-infecção pelo HBV em pacientes com hepatite C levaria estes pacientes a ter um risco maior para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, menor resposta ao interferon e maior progressão para a cirrose hepática (15, 100).

4.2. Detecção do DNA do vírus da Hepatite B oculta

Através das técnicas de biologia molecular, usando a reação de cadeia da polimerase

(PCR) para o HBV, o DNA deste vírus foi demonstrado no fígado, em células mononucleares do sangue periférico e no soro de pacientes HBsAg negativos (101-103).

O nível do HBV viral no soro é usualmente menor do que 10^4 cópias/ml (104), o que é significativamente menor do que em pacientes com HBsAg positivo e infecção pelo HBV (16, 105). Além disso os estudos revelam uma flutuação na viremia dos pacientes com infecção oculta pelo HBV (106) .

A frequência de HBV DNA intrahepático é usualmente maior do que a encontrada no soro, em pacientes com HBV oculto. Isso pode ser facilmente explicado pelo fato de que o fígado serve como reservatório para a replicação do vírus. Porém o HBV DNA pode estar presente apenas no soro e ausente no tecido intrahepático (107), o que pode representar a fase de transição da infecção oculta pelo HBV .

Diversos estudos (96, 97), mas não todos (106, 108), confirmam o HBsAg e o HBcAg em uma variável proporção nestes pacientes. Porém, a frequência de HBcAg intrahepático é usualmente menor do que a de HBsAg. Estes achados indicam uma ativa tradução de proteínas do HBV, ao menos em pacientes com infecção oculta pelo HBV.

4.3. Mecanismos de infecção oculta pelo HBV

Os mecanismos pelos quais os pacientes mantém baixa, porém constante replicação viral não são bem definidos. Baseado nos dados avaliados até o momento, algumas possibilidades são propostas. São elas:

1. Mutação na região S do HBV

Várias mutações na região pré-S/S podem causar alteração na antigenicidade do HBsAg e a inibição da produção do anti-HBs. Embora o sequenciamento de nucleotídeos tenha demonstrado um série de mutações no HBV-DNA na região pré-S/S, os estudos tem

demonstrado que a maioria das mutações aparecem ao acaso e com implicações indefinidas. Entretanto, certos tipos de mutações pré-S/S parecem estar associados com infecção oculta pelo HBV. Os aminoácidos 124-147 na região S contém o epítipo para resposta do anti HBs. Uma simples substituição de aminoácidos nesta região pode mediar a fuga para a produção do anti-HBs circulante, resultando em uma nova infecção após vacinação contra a hepatite B ou infecção oculta pelo HBV.

Mutações na região da alça hidrofílica podem contribuir para um escape imune e patogênese da infecção oculta pelo HBV (104). Outros estudos mostraram que a maioria das infecções ocultas pelo HBV são causadas por cepas selvagens do HBV (106). Apesar destes dados, a real importância das mutações na gênese do HBV permanece indeterminada.

Mutações na região pré-S1 podem reduzir a formação de virions e prevenir a interação do HBV com os hepatócitos. Esta deleção geralmente acompanha cepas selvagens do HBV.

Mutações na região pré-S2 podem levar a infecção oculta pelo HBV por reduzir a infectividade do HBV. Mais recentemente uma deleção no oitavo nucleotídeo na região promotora do core / região distal do gene X do HBV foi demonstrado em pacientes com HCV e infecção oculta pelo HBV (15, 98, 109) .

2. Integração do HBV

É bem conhecida a integração do HBV-DNA no DNA cromossômico, tanto em infecção aguda, como em infecção crônica pelo HBV. Essa integração do HBV-DNA pode causar um rearranjo na sequência do DNA viral (110), o que pode alterar a expressão do HBsAg e resultar em um HBsAg negativo mesmo quando há infecção pelo HBV. Uma alta incidência de HBV integrado é associado ao desenvolvimento de hepatocarcinoma durante infecção pelo HBV, incluindo infecção oculta pelo HBV (110, 111). Usando-se técnica de Southern Blot, foi confirmado a presença de HBV integrado em pacientes com infecção oculta pelo HBV,

especialmente naqueles com carcinoma hepatocelular (HCC) (110). Estudos subsequentes com PCR confirmaram esta incidência. Os fatores que podem contribuir para essa integração são a instabilidade genética, mutação no gene p53 e atividade da telomerase.

3. Infecção de células mononucleares do sangue periférico

Estudos recentes tem demonstrado uma alta frequência de HBV-DNA em células mononucleares do sangue periférico durante infecção aguda e crônica (112, 113). Na maioria dos pacientes o HBV-DNA encontra-se na sua forma íntegra ou epissomal. Alguns estudos, mas não todos, tem demonstrado e identificado HBV replicando em células mononucleares do sangue periférico e com HBV-DNA integrado ocasionalmente. A presença do HBV DNA em células mononucleares do sangue periférico é associada com co-expressão de proteínas do HBV nestas células, HBeAg e HBV-DNA e atividade da doença. Estes achados sugerem que infecção pelo HBV em células mononucleares do sangue periférico é um fenômeno comum durante infecção pelo HBV. A identificação do HBV em células mononucleares do sangue periférico de pacientes HBsAg negativos dá suporte à hipótese de que estas células servem como um reservatório para manter a persistência do HBV.

O possível papel patogênico de células mononucleares infectadas pelo HBV foi recentemente demonstrado em pacientes que após transplante hepático por doença relacionada ao HBV, receberam altas doses de imunoglobulina anti-HBs e mantiveram o HBsAg negativo no soro e o HBV-DNA negativo no fígado, mas as células mononucleares do sangue periférico permaneciam abrigando o HBV-DNA (114).

Além deste papel de reservatório para o HBV-DNA as células mononucleares do sangue periférico parecem ter um papel de seleção de vírus mutantes após transplante hepático, já que após o transplante a infecção recorrente pelo HBV é caracterizada pela troca de cepas HBV que

antes localizavam-se no fígado por cepas de HBV que localizam-se nas células mononucleares do sangue periférico (115).

4. HBV formando imunocomplexos

Alguns poucos estudos tem demonstrado a presença de partículas de HBV-DNA no sangue após a recuperação de hepatite B aguda , mesmo na presença de anti-HBs (116, 117). A hipótese postulada é que o HBV-DNA circule na forma de imunocomplexo com anti HBs na infecção oculta pelo HBV. Por outro lado, em pacientes com infecção oculta pelo HBV secundário a hepatite B crônica com demora em realizar o clearance do HBsAg, não foram detectados imunocomplexos de HBV, sugerindo que este mecanismo não funcione para a forma crônica da doença da mesma maneira que funciona para a forma aguda (105).

5. Status de resposta imune do hospedeiro

É consenso geral que o resultado da infecção viral pelo HBV depende da interação dinâmica entre o vírus e o hospedeiro, da replicação viral e da resposta imune do hospedeiro. Tanto a resposta imune celular como a humoral estão envolvidas neste processo de eliminação viral. A adequada resposta multiespecífica células T anti HBV contra proteínas do HBV resulta no clearance do vírus. Então um defeito na resposta imune pode ser responsável pela manutenção do vírus e persistência da infecção pelo HBV (114). Por este motivo a diminuição da resposta imune do hospedeiro pode estar envolvida na infecção oculta pelo HBV. Com relação a imunossupressão, é bem definido que ela pode contribuir para a recorrência de infecção pelo HBV após transplante hepático. Os pacientes podem manter um nível baixo porém detectável de HBV-DNA no soro por um período variável de tempo mesmo na presença de níveis adequados de anticorpos anti-HBV.

6. Interferência viral

Estudos com os vírus das hepatites B e C tem demonstrado mútua interferência. Pacientes com infecção aguda pelo HBV e co-infecção pelo HCV tem usualmente demora no aparecimento, baixo nível, e curta duração do HBsAg sérico. Em modelos humanos e animais com infecção crônica pelo HBV e co-infecção pelo HCV existe uma tendência a baixos níveis de HBV DNA e um significativo aumento do clearance do HBsAg. O que é sugerido é que a proteína do core do HCV possa estar envolvida na inibição da replicação do HBV (107). Este fato indica que co-infecção pelo HBV pode atenuar a apresentação clínica e promover o clearance do HBV.

A alta frequência da deleção do oitavo nucleotídeo na região promotora do core / distal X do HBV tem sido relacionada em pacientes com infecção oculta pelo HBV e co-infecção pelo HCV (20, 98, 109), sendo que esta mutação parece não estar presente em pacientes com infecção ativa isolada pelo HBV.

Pacientes com a deleção do nucleotídeo oito, cópias do HCV genótipo 1b e infecção oculta pelo HBV tem um nível significativamente maior de HCV no soro do que pacientes com infecção pelo HCV isolado. Isto suporta a idéia que esta mutação, associada ou não com a infecção oculta pelo HBV, possa levar a um aumento da replicação do HCV, assim como associada ao HCV possa diminuir a replicação do HBV (98).

7. Outros possíveis mecanismos patogênicos

Embora sem uma melhor definição, foi pesquisado dentre os genótipos do HBV qual deles teria uma maior incidência na infecção oculta do HBV. Foi observado que 61% dos pacientes com infecção oculta pelo HBV são do genótipo D. Paralelo a isso, foi também observado que dos pacientes que são HBsAg positivos, 53% são do genótipo A. Embora sem muitos estudos, este dado aponta que o genótipo do vírus possa estar relacionado ao desenvolvimento ou não de infecção oculta pelo HBV (104).

Justificativa

Em conjunto com a possibilidade de controle mais eficiente da resposta imune ao transplante, a avaliação clínica e laboratorial adequada dos pacientes são fatores determinantes no sucesso desta modalidade terapêutica. Os novos métodos diagnósticos, em especial das doenças infecciosas, contribuem significativamente para este objetivo. A hepatite B oculta tem sido descrita em vários trabalhos, sendo que na maioria deles existe uma forte associação com a hepatite C, onde o HBV aparece como co-infecção. Dados da literatura relatam que o HBV pode ser reativado pela imunossupressão mesmo após longo período do desenvolvimento da doença, sendo encontrado no fígado ou em células mononucleares do sangue periférico (117). Correa e cols. (13) demonstraram recentemente em um estudo de acompanhamento de dez anos de pacientes transplantados renais uma associação entre uma menor sobrevida de pacientes e de enxertos renais nos grupos que apresentavam HCV e HBV, sendo estes achados concordantes com outros estudos (25, 76). Existe também a possibilidade nestes pacientes com hepatite C co-infectados pelo HBV de uma maior progressão de dano hepático, evoluindo para cirrose ou carcinoma hepatocelular e menor resposta terapêutica ao tratamento com interferon (15). Porém, também há relatos opostos, em que a frequência de HBV-DNA em pacientes com anti HCV positivo foi verificada, não tendo sido observada a relação do HBV com algum potencial hepatocarcinogênico (118). A frequência de hepatite B oculta também é motivo de discussão, havendo relatos distintos, citando-se com uma maior prevalência em países asiáticos. Essa variação de prevalência é explicada por alguns fatores: (a) diferenças na capacidade de detecção através das técnicas de biologia molecular que são usadas; (b) a viremia pode sofrer flutuações, não sendo detectada em um determinado momento; (c) há variação geográfica destes pacientes (99), havendo relatos de 87% de pacientes com hepatite B oculta em um estudo japonês (20), de

nenhum paciente em um estudo realizado por Pontisso e cols. (119) e de 5,5% em um estudo francês recente (120).

As peculiaridades expostas acima nos levaram a executar um estudo de prevalência de hepatite B oculta em pacientes transplantados renais infectados pelo vírus da hepatite C, com o objetivo de testar a hipótese de que uma porcentagem significativa dos pacientes, em especial entre os pacientes anti-HCV positivos, estaria co-infectada de forma oculta pelo HBV.

Referências bibliográficas

1. Riella MC. Infecções em Transplante Renal. In: Riella MC .Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos, 4ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003, cap. 54 : 981-983.
2. Ribeiro AR, Gonçalves LF. Complicações do Transplante Renal - Complicações Hepáticas. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP. Manual de Transplante Renal, 1ª edição, São Paulo, Editora Manole, 2004, p 265-274.
3. Karohl, C., Manfro, R.C., Senger, M.B., et al.: Prevalência de Anticorpos Anti-Vírus da Hepatite C em Pacientes em Hemodiálise Crônica. J Bras Nefrol 1995: 17; 40-6
4. Dotta MA, Cheuquer H, Pereira JPM, Schimitt VM, Krug L e Saitovitch D Métodos molecular e imunológico no diagnóstico de hepatite C em pacientes em hemodiálise J Bras Nefrol 2003; 25: 86-94.
5. Morales JM , Campistol JM. Transplantation in the patient with hepatitis C . J Am Soc Nephrol. 2000; 11: 1343-53.
6. Hanafusa T, Ichikawa Y, Kishikawa H, Kyo M et al. Retrospective study on the impact of hepatitis C vírus infection on kidney transplant patients over 20 years . Transplantation 1998; 66: 471-476.
7. Sengar DPS, Couture RA , Lazarovits AI, Jindal SL. Long-term patient and renal allograft survival in HBsAg infection: a recent up-to-date. Transplant Proc. 1989; 16: 1106-8.
8. Mahmoud IM, Sobh MA, Amer GMEI-Chenawy FA, Gazzaeen SH, El-Sherif A, et al. A prospective study of hepatitis C viremia in renal allograft recipients Am J Nephrol 1999; 19: 576-85.

9. Stempel CA , Lake J, Kuo G, Vincenti F. Hepatitis C , its prevalence in end-stage renal failure patients and clinical course after kidney transplantation . *Transplantation* 1993; 55: 273-6.
10. Bouthot BA, Murthy BVR , Schmid CH, Levey AS, Pereira BJJ. Long-term follow-up of hepatitis C virus infection among organ transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 849-53.
11. Gentil MA, Rocha JL, Rodriguez-Algarra G, Pereira P, Lopez R, Bernal G. Impaired kidney transplant survival in patients with antibodies to hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 ; 10: 2455-60.
12. Pereira BJJ; Natov Sn, Bouthot BA, Murthy BVR, Ruthazer R, Schmid CH et al. Effect of hepatitis C infection and renal transplantation on survival in end-stage renal disease . *Kidney Int*. 1998: 53; 1374-1381.
13. J.R.M Correa, F. Rocha, A. A. Peres, L. F. Gonçalves, R.C. Manfro. Long-Term Impact of Hepatitis B and C Virus Infection in Kidney Transplantation Recipient's Survival. *Transplant Proc*. 2003; 35: 1076-1077.
14. Cabrerizo M, Bartolome J, De Sequera P, et al. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8: 1443-7.
15. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease. *N Eng J Med* 1999; 341:22-26.
16. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, et al. Quantification of Intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) in Patients With Chronic HBV Infection. *Hepatology* 2000; 1: 507-512.

17. Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 33: 785-90.
18. Lee DS, Huh K, Lee EH, et al. HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia : possibility of coinfection in these patients must be considered in HBV-high endemic area. *J Gastroenterol Hepatol* 1997 Dec; 12 : 855-61.
19. Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, et al. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 1995; 48: 1967-71.
20. Uchida T, Kaneita Y, Gotoh K, et al. Hepatitis C virus is frequently coinfecting with serum marker negative hepatitis B virus : probable replication promotion of the former by the latter as demonstrated by in vitro cotransfection. *J Med Virol* 1997 Aug; 52 : 399-405.
21. Nirei K, Kaneko M, Moryama M, et al. The clinical features of chronic hepatitis C are not affected by the coexistence of hepatitis B virus DNA in patients negative for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 2000; 43: 95-101.
22. Bain V.G. Hepatitis B in transplantation. *Transplant Infectious Disease* 2000; 2: 153-165.
23. International Interferon-alfa Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon-alfa on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: retrospective cohort study. *Lancet* 1998; 351: 1535-9.
24. Oldakowska-Jedynak M, Durlak M, Paczek L, et al. Hepatocellular Carcinoma Development in Renal Allograft Patients. *Transplant Proc.*, 2000; 32: 1363-1364.

25. Santos RF. Impacto das infecções pré-transplante pelos vírus das hepatites B e C nos resultados do transplante renal. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo. 1998. 138p.
26. Rocha FD, Cauduro RL, Karohl C, Manfro RC. Efeito da infecção pelos vírus das hepatite B e C na sobrevida de pacientes transplantados renais. Rev HCPA, 2000.
27. Bradley DW, Mc Caustland KA, Cook EH, et al. Post-transfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees: psychochemical evidence that the tubule forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterology* 1985; 88: 773-779.
28. Choo Q-L, Kuo G, Weiner Aj, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362 .
29. HoughIon M, Miner A, Kuo G, et al. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control. *Hepatology* 1991; 14: 381 388.
30. Choo Q-L, Richamm KH, Han JH, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 2451-2455.
31. Miller RH & Purcell RH. Hepatitis C virus shares with Pestviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 2057-2061.
32. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, et al. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome, from japanese patients with non-A, non-B hepatitis. . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87; 9524-9528.
33. Taikanizavia A, Mori C, Fuke I, et al. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*. 1990; 71: 3027-3033.

34. Simmonds P, Holmes E., Cha T. et al. Classification of hepatitis C virus in six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetics analysis of the NS-5 region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 91: 101345-10348.
35. Simmonds P, Alberti A., Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genomes. *Hepatology* 1994; 19: 1321-1324.
36. Mc Omish F., Yap PI, Dow BC, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotype in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Micro* 1994;32: 884- 892.
37. Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. A long-term study hepatitis C virus replication in non-A. non-B hepatitis. *N Eng J Med* 1991; 325: 98-104.
38. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C. et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 346-3070 .
39. Kanak K, Kako M., Okamoto H. HCV genotypes in chronic hepatitis and response to interferon. *Lancet* 1992; 339: 1543.
40. Alter HJ, Purcell RH, Shih J, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non B hepatitis. *N Eng J Med* 1989; 321: 1494-1500.
41. Chiaramonte, M, Stroffolini T, Caporaso N, et al. Hepatitis C virus infection in Italy: a multicentric sero-epidemiological study. *Italian Journal of Gastroenterology* 1991; 23: 555-558.
42. http://www.hepcentro.com.br/hepatite_c.ht . Consulta em setembro de 2003.

43. Conry-Cantilena. Van Raden MA, Gibbe J, et al. Routes of infection, viremia and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N Eng J Med* 1996; 333: 1691-1696.
44. Alter HJ. Blood donors with hepatitis C. Program and Abstracts of NIH Consensus, Development Conference (Bethesda, Maryland - USA; March 24-26.1997) Management of hepatitis C 1997; 31-33.
45. Ohto H, Terazawa S., Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mother to infant. *N Eng J Med* 1994; 333: 744-750.
46. Kühnl P, Seidi S., Stangel W. et al. Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* 1989; 2: 324.
47. Ngatchu T, Stroffolini T Rapicetta M. Seroprevalence of anti-HCV in an urban child population: a pilot study in a developing area. Cameroon. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 91 : 57-61.
48. Fay O, Schatzmayr H, Visona J, et al. Prevalence of HVC antibodies in Latin America. *Hepatology* 1994; 19 : 601.
49. Boyer JL, Reuben A. In: Schiff 1, Shiff ER, Eds. *Diseases of the Liver*. 7th ed, Philadelphia, Lippincott Co.1993; 586-637.
50. Brandão-Mello CE, Basílio de Oliveira CA. Gonzaga AL. Hepatitis C and liver disease in hemophilia. *Hepatology* 1994; 19: 441.1994.
51. Esteban F., Esteban R., Viladomiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk group in Spain. *Lancet* 1989; 2: 294-297.
52. Ayola EA., Huraib S., Arif M, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among saudi haemodialysis patients. *J Med Virol* 1991; 35: 155-159.

53. Sheu J-C, Lee S-H., Wang JJ, et al. Prevalence of anti-HCV and HCV viremia in hemodialysis patients in Taiwan. *J Med Virol.* 1992; 37: 108-112.
54. Knoll GA, Tankersley MR, Lee JY, Julian BA, CurtisJJ. The impact of renal transplantation on survival in hepatitis C-positive end-stage renal disease patients. *Am J Kidney Dis.* 1997: 608-14.
55. Bulmberg BS, Alter HJ, Visnich S. A “new” antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 159-6.
56. Ribeiro, A. Hepatite B: a sua prevenção na comunidade, *Nursing – Revista Técnica de Enfermagem, Lisboa* 1997; 112 : 23-27.
57. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. Virus-like Particles in Serum of Patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis, *Lancet* 1970; i: 695-698.
58. Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Robinson,W.S. DNA Polymerase Associated with Human Hepatitis B Antigen. *J Virol.* 1973; 12: 995-1005.
59. Robinson W.S., Greenman, R.L. DNA Polymerase in the Core of the Human Hepatitis B Virus Candidate. *J Virol.* 1974; 13: 1231-1236.
60. Areias, J. Hepatites Víricas. *Medisa – Edições e Divulgações Científicas, Ltda., Porto,* 161 pp.1991.,
61. Castro, R. S. Epidemiologia da Hepatite Vírica, *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, Lisboa* 1999; 2:89-99.
62. Nassal, H. & Schaller, H. *Virus Strategies.* W. Doerfler and P. Bohm,1993; pp 42-74. VCH, Weinheim, Germany.
63. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982; 29: 403-15.

64. Burns, M., Miska, S., Chassot, S. & Will, H. (s/ data). Enhancement of Hepatitis B Virus Infection by Non-Infectious Subviral Particles. *J Virol.*;72: 1462-1468.
65. LaQuaglia MP, Tolckoff-Rubin NE, Dienstag JL, Cosimi AB, Herrin JT, Kelly M, Rubin RH: Impact of hepatitis on renal transplantation. *Transplantation* 1981; 32: 504–507
66. Parfrey PS, Farge D, Forbes RDC, Dandavino R, Kenick S, Guttman RG: Chronic hepatitis in end-stage renal disease: Comparison of HBsAg-negative and HBsAg-positive patients. *Kidney Int.* 1985; 28: 959–967.
67. Weir MR, Kirkman RL, Strom TB, Tilney NL: Liver disease in recipients of long-functioning renal allografts. *Kidney Int.* 1985; 28: 839–844.
68. Aroldi A, Tarantino A, Montagnino G, Paparella M, Cesana B, Rumi MG, Ponticelli C: Renal transplant recipients and chronic liver disease: Statistical evaluation of predisposing factors. *Nephron* 1992; 61: 290–292.5
69. Rao KV, Anderson WR: Liver disease after renal transplantation: *Am J Kidney Dis.* 1992; 5: 496–501.6
70. Pol S, Dubois F, Mattlinger B, Carnot F, Legendre C, Brechot C, Berthelot P, Kreis H: Absence of hepatitis delta virus infection in chronic hemodialysis and kidney transplant patients in France. *Transplantation* 1992; 54: 1096–1097.
71. Pouteil-Noble C, Tardy JC, Chossegros P, Mion F, Chevallier M, Gerard F, Chevallier P, Megas F, Lefrancois N, Touraine JL: Co-infection by hepatitis B virus and hepatitis C virus in renal transplantation: Morbidity and mortality in 1,098 patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1995; 10: 122–124.

72. Chan PKC, Lok ASF, Cheng IKP, Chan MK: The impact of donor and recipient hepatitis B surface antigen status on liver disease and survival in renal transplant recipients. *Transplantation* 1992; 53: 128–131.
73. Mathurin P, Mouquet C, Poynard T, Sylla C, Benalia H, Fretz C, Thibault V, Cadranel JF, Bernard B, Opolon P, Coriat P, Bitker MO: Impact of hepatitis B and C virus on kidney transplantation outcome. *Hepatology* 1999; 29: 257–263.
74. Bang BK, Yang CW, Yoon SA, Kim YS, Chang YS, Yoon YS, Koh YB: Prevalence and clinical course of hepatitis B and hepatitis C liver disease in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Nephron* 1995; 70: 397–401.
75. Hiesse C, Buffet C, Neyrat N, Rieu P, Charpentier B, Etienne JP, Fries D: Impact of HBs antigenemia on long-term patient survival and causes of death after renal transplantation. *Clin Transplant*. 1992; 46: 461–467.
76. Huang CC, Lai MK, Fong MT: Hepatitis B liver disease in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transplantation* 1990; 49: 540–544.
77. Parfrey PS, Forbes RDC, Hutchinson TA, Kenick S, Farge D, Dauphinee WD, Seely JF, Guttman RD: The impact of renal transplantation on the course of hepatitis B liver disease. *Transplantation* 1985; 39: 610–615
78. Wolf JL, Perkins HA, Schreeder MT, Vincenti F: The transplanted kidney as a source of hepatitis B infection. *Ann Intern Med* 1979; 91: 412–414.
79. Nagington J, Cossart YE, Cohen BJ: Reactivation of hepatitis B after transplantation operations. *Lancet* 1977; i: 558–560.
80. Degos F, Lugassy C, Degott C, Debure A, Carnot F, Thiers V, Tiollais P, Kreis H, Brechot C: Hepatitis B virus and hepatitis B-related viral infection in renal transplant

- recipients: A prospective study of 90 patients. *Gastroenterology* 1988; 94: 151–156.
81. Martin P, Friedman LS: Chronic viral hepatitis and the management of chronic renal failure. *Kidney Int.* 1995; 47: 1231–1241.
82. Tur Kaspas R, Burk RD, Shaul Y, Moore DD, Shafroth DA: Hepatitis B virus DNA contains a glucocorticoid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 1627–1631.
83. Tur Kaspas R, Laub O: Corticosteroids stimulate hepatitis B virus DNA, mRNA, and protein production in a stable expression system. *J Hepatol.* 1990; 11: 34–36.
84. McMillan JS, Shaw T, Angus PW, Locarnini SA: Effect of immunosuppressive and antiviral agents on hepatitis B virus replication in vitro. *Hepatology* 1995; 22: 36–43.
85. Cote PJ, Tennant BC, Baldwin B, Korba BE, Gerin JL: Modulation of WHV infection and disease with cyclosporine A and dexamethasone. *Int Symp on Viral Hepatitis and Liver disease, Houston, 1990.*
86. Degos F, Degott C, Bedrossian J, Camilieri JP, Barbanel C, Doboust A, Rueff B, Benhamou JP, Kreis H: Is renal transplantation involved in post-transplantation liver disease? *Transplantation* 1980; 29: 100–102.
87. Parfrey PS, Forbes RD, Hutchinson TA, Beaudoin JG, Dauphinee WD, Hollomby DJ, Guttman RD: The clinical and pathological course of hepatitis B liver disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 1984; 37: 461–466.
88. Kramer P, ten Kate FW, Bijnen AB, Jeekel J, Weimar W: Recombinant leucocyte interferon. A induces steroid-resistant acute vascular rejection episodes in renal transplant recipients. *Lancet* 1984; i: 989–990.

89. Rostaing L, Modesto A, Baron E, Cisterne JM, Chabannier MH, Durand D: Acute renal failure in kidney transplant patients treated with interferon alpha 2b for chronic hepatitis C. *Nephron* 1996; 74: 512–516.
90. Kletz MJ, Watschinger B, Muller C et al. Twelve months of lamivudine treatment for chronic hepatitis virus B infection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2000; 70: 1404-7.
91. Santos FR, Hajashi AR, Araújo MRT, et al. Lamivudine therapy for hepatitis B in renal transplantation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2002; 35: 199-203.
92. Rostaing L, Henry S, Cisterne JM et al. Efficacy and safety of lamivudine on replication of current hepatitis B after cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1997; 64: 1624-7.
93. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infectious Disease*. Review 2002 Aug; 2 : 479-86.
94. Hoofnagle JH, Seef LB, Zimmerman HJ. The type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Eng J Med* 1978 ; 298: 1379-1383.
95. Nalpas B, Berthelot P, Thiers V et al. Hepatitis B virus multiplication in the absence of usual serological markers. A study of 146 chronic alcoholics. *Journal of Hepatology* 1985; 1: 89-97.
96. Tanaka Y, Esumi M, Shitaka T. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver* 1990; 10: 6-10.
97. Chemin I, Zoulin F, Merle P et al. High incidence of hepatitis B infection among chronic hepatitis cases of unknown aetiology. *J Hepatol* 2001 ; 34: 447-454.

98. Fukuda R, Ishimura N, Niigaki M et al. Serologically silent hepatitis B coinfection in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver disease: clinical and virological significance. *J Med Virol* 1999; 58: 201-207.
99. Lili K-M, Petermann D, Müller C. Hepatitis virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2000; 33: 785-790.
100. Gob P, Jilg W, Bornhak H et al. Serological pattern anti HBc alone: report on workshop. *J Med Virol* 2000; 62: 437-455.
101. Kaneko S, Miller RH, Feinstone SM et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989, 86: 312-316.
102. Kato J, Hasegawa K, Torii N, Yamauchi K, Hayashi N. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 1996; 23: 389-395.
103. Marusawa H, Uemoto S, Hijikata M et al. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 2000; 31: 488-495.
104. Weinberger KM, Buer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific determinant of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol*. 2000; 81: 1165-1174.
105. Cabrerizo M, Bartolome J, Caramelo C, Barril G, Garreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000; 32: 116-123.

106. Zhang Y-Y, Hansson BG, Kuo LS, Widell A, Nordenfelt E. Hepatitis B virus DNA in serum and in liver in commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the prevalence of antibodies to HBsAg. *Hepatology* 1993; 17:583-544.
107. Lili K-M, Petermann D, Müller C. Hepatitis virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg patientes with chronic hepatis C. *Journal of Hepatology* 2000; 33: 785-790.
108. Baransain C, Betes M, Panizo A et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasemia of unknow aetiology. *Gut* 2000; 47: 429-435.
109. Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y et al. Hepatits B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically “silent” non-B, non-C chronic hepatitis. *Microbiology Immunology* 1996; 40: 481:488.
110. Lai M-Y, Chen P-J, Yang P-M, Sheu J-C, Shung J-L, Chen I. Identification and characterization of intrahepatic hepatis B virus DNA in HBsAg-seronegative patientes with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Hepatology* 1990; 12: 575-581.
111. Paterlini P, Gerken G, Nakajima E et al. Polymerase chain reaction to detect hepatis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancers from patient negative for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1990; 323: 80-85.
112. Sugai Y, Okamoto H. State of hepatis B virus DNA in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected individuals: correlations with e antigen and viral DNA in the serum as well as activity of liver disease. *Tohoku J Exp Med* 1989; 158: 73-84.
113. Bouffard P, Lamelin JP, Zoulim F, Pichoud C, Trepo C. Different forms of hepatitis B virus DNA and expression of HBV antigens in peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1990; 31: 312-317.

114. Feray C, Zignego AL, Samuel D et al. Persistent hepatitis B virus infection of mononuclear blood cells without concomitant liver infection. The liver transplantation model. *Transplantation* 1990; 49: 1155-1158.
115. Brind A, Jiang J, Samuel D et al. Evidence of selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection. *J Hepatol* 1997; 26: 228-235.
116. Machalak TI, Pasquinelli C, Guilhot S, Chisari FV. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994 ; 93: 230-239.
117. Bläckberg J, Kidd-Ljunggren K,: Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000; 30: 992-997.
118. Shintani Y, Yotsuyanagi H et al. The significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma of patients with hepatitis C. *2000 Cancer*; 88: 2478-2486.
119. Pontisso P, Ruvoletto MG, Fatovich G, Chemello L, Gallorini A, Ruol A et al. Clinical and virological profiles in patients with multiple hepatitis infection. *Gastroenterology* 1993; 105:1529-33.
120. Porchon C, Kremsdorf D, Pol S, Lunel-Fabianni F, Driss F, Opolon P, Berthelot P, Brechot C. Serum hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in non-A, non-B post-transfusional and sporadic chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1992; 16: 184-9.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar a prevalência de hepatite B oculta em pacientes transplantados renais.

Objetivos secundários

1. Determinar se a taxa de prevalência de hepatite B oculta é maior nos pacientes infectados pelo HCV.
2. Avaliar a função hepática de pacientes transplantados renais, infectados ou não pelo HCV.
3. Avaliar a influência da azatioprina na função hepática de pacientes transplantados renais, infectados ou não pelo HCV.

CONCLUSÃO

No presente trabalho encontramos uma prevalência muito baixa de hepatite B oculta em nossa população de pacientes transplantados renais, que ficou em 2% da população estudada, não sendo encontrada diferenças entre o grupo HCV reagente e o HCV não reagente. O número pequeno de pacientes encontrados portadores do HBV-DNA não nos permitiu margem para realizar uma análise clínica e laboratorial comparando os pacientes com HBV-DNA e sem o HBV.

A análise laboratorial entre os pacientes do grupo HCV reagente e HCV não reagente demonstrou uma alteração no valor de aminotransferases, fosfatase alcalina e proteínas totais, que foi maior no grupo HCV reagente. O tempo de hemodiálise foi maior nos pacientes HCV reagentes, o que já foi descrito previamente com pacientes em hemodiálise crônica. Adicionalmente os níveis de ciclosporina encontrados foram mais elevados nos pacientes infectados pelo HCV e na avaliação da função hepática através de uma análise multivariada verificamos que o uso de azatioprina não influenciou de forma significativa as alterações hepáticas encontradas .

Hepatite B oculta em pacientes transplantados renais

Autores: Alessandro A Peres, Esther A Dias, Marisa Chesky, Luis F. Jobim , Luiz FS Gonçalves,
Roberto C Manfro.

Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia. Faculdade de Medicina.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003

Porto Alegre, RS. Brazil

Palavras-chave: Hepatite B oculta, Hepatite C, Transplante renal

Título Resumido: Hepatites em transplante renal

Endereço para correspondência:

Roberto C. Manfro MD

Serviço de Nefrologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS. Brasil

90035-003

FAX: 55 51 3316-8121

Email: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Abreviações

HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpos anti-HCV
HBsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
CyA	Ciclosporina
Aza	Azatioprina
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
GGT	Gama glutamiltranspeptidase

Resumo

Introdução. Hepatite B oculta é caracterizada pela presença do HBV-DNA em pacientes que não expressam o antígeno B de superfície (HBsAg) e é relatada com maior frequência em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV). Nesse estudo avaliamos a prevalência de hepatite B oculta em transplantados renais infectados ou não pelo HCV e avaliamos a função hepática nos diferentes grupos.

Material e métodos. Amostras de soro de 101 pacientes transplantados renais foram avaliadas para testes de função hepática, marcadores sorológicos e reação de polimerização em cadeia (PCR) para o HBV-DNA. Todos os pacientes eram HBsAg negativos e havia 51 pacientes anti-HCV reagentes e 50 pacientes não reagentes. A pesquisa do HBV-DNA foi feita por técnica de PCR aninhado para os genes S e “core”.

Resultados. A pesquisa do gene S do HBV-DNA resultou positiva em 2 pacientes, sendo um do grupo anti-HCV reagente e o outro do grupo não reagente. A pesquisa do gene da região do “core” foi positiva em um paciente do grupo anti-HCV não reagente. A análise demonstrou que os pacientes do grupo anti-HCV reagente apresentam maior tempo de tratamento dialítico ($50,8 \pm 34,6$ e $32,02 \pm 20,87$; $p < 0,001$). Da mesma forma o grupo anti-HCV reagente apresentou valores mais elevados de aminotransferases: ALT: $34,5 \pm 26,7$ x $20,9 \pm 10,0$; ($P < 0,001$); AST: $31,7 \pm 17,7$ x $24,9 \pm 14,9$; ($P < 0,05$); gama glutamiltranspeptidase : $66,1 \pm 82,4$ x $33,4 \pm 44,6$; ($P < 0,02$) e fosfatase alcalina : $307,9 \pm 397,7$ x $186,9 \pm 63,4$; ($P < 0,04$). Os níveis de ciclosporina sérica também mais elevados também foram encontrados no grupo anti-HCV reagente $170,9 \pm 69,8$ and $135,0 \pm 48,1$ respectivamente ($P < 0,02$). No modelo de análise multivariada evidenciou-se que apenas a presença de infecção pelo HCV é determinante das alterações nas provas de função hepática.

Conclusão. Hepatite B oculta foi um achado infreqüente na nossa população de pacientes transplantados renais, não tendo sido encontrada diferença na sua prevalência em pacientes infectados ou não pelo HCV. Pacientes anti-HCV reagentes apresentam alterações significativas das provas de função hepática e dos níveis sanguíneos de ciclosporina.

Introdução

A frequência da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) vem decrescendo nos pacientes em tratamento dialítico crônico ao longo do tempo (1). Isto provavelmente se deva, pelo menos em parte, às medidas de isolamento e de precaução universal, impostas pela legislação, e pela disponibilidade de vacinas contra o HBV, disponíveis no sistema público de saúde, assim como a vacinação compulsória dos pacientes em diálise crônica. Entretanto, no Brasil, ainda existe elevada incidência de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) em pacientes em hemodiálise crônica. Desta forma, é significativamente elevado o risco de novos pacientes nesta modalidade de tratamento virem a ser infectados pelo HCV (2, 3).

O diagnóstico da infecção pelo HBV é habitualmente estabelecido pela presença no soro de seu antígeno de superfície (HBsAg). Após a infecção, a presença deste e de outros marcadores sorológicos denota diferentes estados que vão desde a cura, passando pela imunidade e até a cronificação da infecção.

Recentemente, foi descrito na literatura um tipo particular de infecção pelo HBV no qual detecta-se a presença do DNA viral em pacientes sem HBsAg detectável pelos métodos sorológicos convencionais. Esta caracteriza a chamada hepatite B oculta, onde habitualmente os pacientes apresentam baixas cargas virais, em geral menores que 10^4 cópias/ml, o que possivelmente explique a falha dos métodos sorológicos convencionais em detectar o HBsAg (4-6). É interessante notar que diversos estudos sugerem que a hepatite B oculta seja mais frequente em pacientes infectados pelo HCV (5, 7-10). No entanto, as implicações clínicas da infecção oculta pelo HBV em pacientes HCV reagentes ainda não estão bem definidas. Dados da literatura suportam situações distintas como a não influência da hepatite B oculta na evolução clínica da doença hepática (9) e a presença do HBV-DNA em pacientes HCV reagentes com carcinoma hepatocelular (HCC). Entretanto, não se evidenciou um papel

carcinogênico do HBV (11) até a ocorrência de replicação viral mais acelerada (12), havendo também a sugestão de que em pacientes com hepatite B oculta co-infectados pelo HCV existiria menor resposta a terapia com interferon alfa, progressão mais rápida para a cirrose hepática e maior tendência ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (5, 13-15).

Pacientes transplantados renais são muitas vezes infectados pelo HBV e/ou pelo HCV em decorrência de suas exposições epidemiológicas prévias, seja na diálise, transfusões ou no procedimento do transplante. Nesta população, o curso da doença hepática viral pelos vírus B ou C isolados é controverso, no entanto está bem estabelecido que a co-infecção pelos vírus B e C determina prognóstico desfavorável (13, 15, 16).

Parte da variabilidade nos desfechos de sobrevida encontrados nos estudos com pacientes transplantados renais com hepatite C pode ser devida à presença de hepatite B oculta, o que nos levou a executar este estudo visando determinar a prevalência desta condição em nossa população de pacientes transplantados renais.

Pacientes e Métodos

Amostras e dados clínicos e laboratoriais de 101 pacientes transplantados renais HBsAg negativos (enzimaimunoensaio, Berhing, NY, USA), provenientes do ambulatório de transplante renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, foram coletados e analisados. Entre os pacientes, havia 51 anti-HCV positivos e 50 pacientes anti-HCV negativos, todos analisados por teste ELISA de terceira geração (enzimaimunoensaio, Abbot, Kyalami, África do Sul). As amostras de plasma para posterior extração de DNA e PCR foram congeladas a temperatura de -80°C .

Os critérios de inclusão no estudo foram ser transplantado renal, não apresentar marcadores sorológicos de infecção pelo HBV (HBsAg), e concordar com os termos do consentimento

informado. Aos pacientes incluídos foi aplicado o protocolo de pesquisa que constou dos seguintes itens: idade, sexo, raça, tempo de tratamento hemodialítico, transplante(s) prévio(s), tempo de duração do enxerto, tipo de doador, número de transfusões, número de gestações, regime de imunossupressão, rejeição aguda prévia e uso de OKT3. Adicionalmente, os seguintes exames foram incluídos na investigação: anti-HCV, HBsAg, anti-HBc IgM, anti-HBs, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, plaquetas, uréia, creatinina, alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina, tempo de protrombina, proteínas totais, albumina, bilirrubinas totais e frações. Todos os pacientes concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento informado. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, acreditado pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Ministério da Saúde e registrado no Escritório para a Proteção de Humanos em Pesquisa (Office for Human Research Protections – OHRP-USDHHS), Comitê Revisor Institucional (Institutional Review Board) – IRB 00000921.

Extração do DNA e Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA foi extraído de 200 μ l de plasma usando-se o kit de extração de DNA QIAGEN (Qiagen InC, Chatswoth, CA, USA). O DNA extraído foi estocado a -20°C para a posterior PCR. As PCRs para os genes S e “Core” (19) do HBV foram realizadas em duas etapas de amplificação, conforme previamente descrito (19). Na primeira foram feitos 35 ciclos sendo: desnaturação a 95°C (45 segundos), anelamento a 48°C (45 segundos), extensão a 72°C (1 minuto); e após o último ciclo 10 minutos a 72°C . A segunda etapa, foi idêntica à primeira, exceto pela adição de cinco ciclos com o passo de anelamento a 37°C (45 segundos). Utilizou-se o termociclador modelo PTC (MJ-Research Inc., Watertown, MA, EUA). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, evidenciados com brometo de etídeo por transiluminação com luz ultra-violeta e

fotografados pelo software de captura de imagens Kodak Digital Science[®] (Kodak, Rochester, NY, USA). As seqüências dos iniciadores (“primers”) utilizados neste estudo foram obtidas na literatura e estão descritas a seguir (17,18).

Gene S. Primeira etapa:

Sense: 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'

Antisense: 5'-TACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG-3'

Segunda etapa:

Sense: 5'-TAGTAACTGAGCCARGAGAAAC-3'

Antisense: 5'-GTTGACAARAATCCTCACAATAC-3'

Para a região “core” foram usados os seguintes iniciadores:

Primeira etapa

Sense: 5'-GCGAAGCTTGAGGAATAAAGCCCCGTAAA3'

Antisense: 5'-GCGCTGCAGGAGTTGGGGAGGAGATTA3'

Segunda etapa

Sense: 5'-GCGAAGCTTAGATCTCTGGATGCTGGA3'

Antisense: 5'-GCGCTGCAGGAGGCTGTAGGCATAAAT3'

Controles positivos foram obtidos a partir de amostras de DNA de pacientes com hepatite B confirmada por diagnóstico sorológico.

Análise Estatística. Os dados foram apresentados como números absolutos e percentagens, médias e desvios-padrões, tendo sido utilizados os seguintes testes: teste t não pareado, qui-quadrado e análise multivariada utilizando como variável dependente a ALT e as independentes: HCV, uso de ciclosporina (CyA) e uso de azatioprina (AZA), com o objetivo de definir qual

dessas variáveis influenciaria nas provas de função hepática. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

Resultados

Foram estudados 101 pacientes, sendo 51 pacientes do grupo anti-HCV reagente e 50 pacientes no grupo anti-HCV não reagente. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto as médias das idades, tempo de duração do transplante atual e número de transfusões. Houve uma pequena predominância de pacientes do sexo masculino (53,5%) em relação ao feminino, sem diferenças entre os grupos. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa no tempo prévio em diálise, que foi maior no grupo HCV reagente, enquanto que a azatioprina foi menos utilizada neste grupo (Tabela 1).

Aqui Tabela 1

Na análise dos dados laboratoriais nos dois grupos encontrou-se diferenças significativas nas provas que refletem dano hepático, com elevação de ALT, AST, GGT e fosfatase alcalina, e diminuição das proteínas totais no grupo anti-HCV reagente. Com relação ao nível sanguíneo de ciclosporina (CyA) também encontrou-se diferenças significativas, tendo o grupo anti-HCV reagente apresentando níveis mais elevados. Os níveis de hematócrito, leucócitos, plaquetas, uréia, creatinina, tempo de protrombina, albumina e bilirrubinas não apresentaram diferenças com significância estatística entre os grupos (Tabela 2). A análise dos marcadores sorológicos revelou resultados semelhantes nos dois grupos. Encontramos dois pacientes anti-HBc IgM reagentes no grupo de pacientes anti-HCV reagentes e um paciente no grupo anti-HCV não

reagente ($P=0,35$). Anticorpos anti-HBs, foram detectados em 22 pacientes do grupo anti-HCV reagente e em 19 pacientes do grupo anti-HCV não reagente ($P=0,37$).

Aqui Tabela 2

Na análise multivariada utilizou-se como variável dependente o nível de ALT e como variáveis independentes anti-HCV, uso de azatioprina e o nível sanguíneo de CyA. Foi demonstrado que somente a presença do anti-HCV influencia de forma significativa os níveis de ALT (Tabela 3).

Aqui Tabela 3

Na análise da presença de marcadores prévios de exposição ao HBV os grupos apresentaram resultados semelhantes. Vinte e seis pacientes do grupo anti-HCV reagente possuíam algum tipo de marcador sorológico para HBV (anti-HBs ou anti Hbc-IgM), enquanto 29 pacientes do grupo anti-HCV não reagente apresentavam algum destes marcadores.

Na análise do DNA viral foi encontrado DNA da região “core” em apenas um paciente anti-HCV negativo e em nenhum dos pacientes anti-HCV positivos. A pesquisa do gene S revelou positividade em dois pacientes, aquele portador do gene “core” e um segundo paciente pertencente ao grupo anti-HCV reagente. A proporção de gene S foi estimada para o total de pacientes e para os subgrupos. Para cada situação foram calculados o erro de estimação e o intervalo de confiança, considerando um nível de confiança de 95%, conforme demonstrado na Tabela 4.

Aqui Tabela 4

Discussão

No presente estudo foram examinadas, com vistas a detecção de DNA do vírus da hepatite B, amostras de soro de 101 pacientes transplantados renais HBsAg negativos. Destes, 51 apresentavam anticorpos anti-HCV e 50 não os apresentavam, e a razão para esta divisão é a sugestão na literatura de que pacientes infectados pelo HCV apresentam prevalência muito maior de hepatite B oculta (5). A análise foi feita através da técnica de PCR “aninhado” (nested) para os genes S e “core” do HBV. O DNA viral do gene S foi detectado em 2% destes pacientes sendo um do grupo HCV reagente e um do grupo HCV não reagente. Já a presença do DNA viral do gene “core” foi detectada em apenas um paciente (1%).

Descreve-se na literatura uma maior prevalência de hepatite B oculta em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV). No entanto as taxas de prevalência são bastante variadas, observando-se maior prevalência em determinadas regiões geográficas, sendo a Ásia o local de maior prevalência (8, 19). Paralelo a este dado, em publicações recentes foi demonstrado que a associação entre a co-infecção pelo HBV em pacientes com hepatite C levaria estes pacientes a ter um risco maior para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, menor resposta a terapia com interferon alfa e maior progressão para a cirrose hepática (5, 20). Outro relatos sugerem que nos pacientes com hepatite B oculta possa ocorrer reativação da hepatite B, na sua forma clínica ou laboratorial convencional, sendo este fato especialmente verdadeiro em pacientes imunocomprometidos (13, 15). Por fim, supõe-se que o HBV possa ter seus genes ativados na presença de corticoterapia e possivelmente de outros imunossupressores (13).

Diversas tem sido as possibilidades aventadas para a não detecção dos marcadores convencionais de infecção pelo HBV em pacientes infectados pelo HCV. Entre as mais citadas são: (a) interferência entre HBV e HCV diminuindo a expressão do HBV; (b) o fato do sistema imune poder manter o vírus em estado latente ou quiescente por vários anos, conforme a

resposta imune o hospedeiro; (c) as mutações no vírus que podem levar a diminuição da produção de antígenos e a taxa de replicação viral; (d) integração do HBV no cromossoma do hospedeiro; (e) infecção do HBV em células mononucleares do sangue periférico, que funciona como um reservatório para o HBV, que permanece replicando nestas células, podendo ocorrer uma seleção de vírus mutantes, como eventualmente é visto após o transplante hepático (21).

A variação encontrada na prevalência da hepatite B oculta pode ser explicada por alguns fatores, entre eles são citadas diferenças das técnicas de biologia molecular empregadas para a detecção do DNA viral; flutuações na viremia que pode não ser detectável em um determinado momento; variações demográficas que reflitam diferentes exposições epidemiológicas (19). Em um estudo japonês de Uchida e cols. realizado com pacientes hepatopatas anti HCV reagentes (cirróticos, hepatite crônica e hepatite aguda) foi constatada uma prevalência de 87% de pacientes com hepatite B oculta (22), contrastando com 5,5% em estudo francês publicado por Porchon e colaboradores, também realizado em pacientes hepatopatas anti HCV reagentes (23).

O impacto da hepatite B oculta, em pacientes co-infectados pelo HCV, está por ser determinado. Tem sido descrita a possibilidade de maior progressão de dano hepático, evoluindo para cirrose ou carcinoma hepatocelular além de menor resposta terapêutica a terapêutica com interferon (5). Há também há estudos onde a co-infecção pelo HCV com hepatite B oculta não apresentou potencial hepatocarcinogênico (11). Kazemi-Shirazi e cols. em uma pesquisa para evidenciar o significado clínico da co-infecção pelo HBV não encontraram diferenças significativas entre valores de aminotransferases, atividade inflamatória, da doença hepática e evolução da fibrose hepática nos pacientes com ou sem co-infecção pelo HBV (8).

O impacto da infecção pelo HBV em pacientes transplantados renais vem a muito sendo estudado. De uma maneira geral pode-se constatar piora significativa na sobrevida de pacientes mais perceptível a partir do quinto ano pós-transplante (24). Os dados a respeito da infecção

pelo HCV produzem resultados menos consistentes, desde diminuições de sobrevida, em geral mais tardias, até ausência de impacto desta infecção (25,26). Em pacientes transplantados renais co-infectados diferentes estudos observacionais evidenciaram que a infecção concomitante pelo HCV e HBV produz redução significativa nas sobrevidas de pacientes e enxertos (27,28). Recentemente Correia e colaboradores demonstraram em um estudo com 10 anos de seguimento, que pacientes transplantados renais com co-infecção pelo HCV e HBV apresentam menor sobrevida de pacientes e de enxertos (16).

A variabilidade dos resultados de sobrevida observados nos pacientes transplantados renais com infecção pelo HCV poderia potencialmente ser devida a presença de infecção oculta, não detectada, pelo HBV. Esta possibilidade nos levou a delinear um estudo com o objetivo de avaliar a prevalência de hepatite B oculta em pacientes transplantados renais infectados ou não pelo vírus da hepatite C, e a repercussão clínico-laboratorial da infecção. Os resultados demonstraram baixa prevalência de hepatite B oculta em nosso meio (2%), diferente da maioria dos relatos em pacientes não submetidos a transplante renal, principalmente em algumas regiões como na Ásia, porém de acordo com alguns estudos em pacientes europeus realizados com pacientes hepatopatas (8). O presente trabalho é inédito em avaliar e estabelecer a prevalência de hepatite B oculta em uma população de pacientes transplantados renais. A diferença encontrada na prevalência do gene S em relação a maioria dos estudos não pode ser atribuída à técnica da PCR uma vez que esta foi executada de acordo com a técnica proposta, PCR aninhado, seguindo protocolo estabelecido (17) e com iniciadores descritos na literatura (17, 18). As razões para a diferença de prevalências possivelmente sejam várias, mas devem ser ressaltadas as diferenças nas exposições epidemiológicas ao HBV, o tipo de população estudada, hepatopatas versus transplantados renais e as diferenças nas vias de contaminação pelo HBV nestas populações. Por fim deve ser ressaltado que em alguns trabalhos em que se

detectou elevada prevalência de hepatite B oculta a pesquisa do DNA viral foi feita em tecido hepático, onde a PCR, possivelmente devido a maior carga viral, é mais eficiente (5).

Com relação ao achado do tempo de hemodiálise maior nos pacientes HCV reagentes, esse é um fato já descrito previamente com pacientes em hemodiálise crônica (7). Da mesma forma, repetindo um achado anterior em nossos pacientes, no presente estudo encontramos que pacientes anti HCV reagentes apresentam níveis de aminotransferases superiores aos encontrados nos pacientes não infectados. Adicionalmente os níveis de ciclosporina encontrados foram mais elevados nos pacientes infectados pelo HCV e o uso de azatioprina não influenciou de forma significativa as alterações hepáticas encontradas (29, 30).

Em resumo, no presente trabalho em pacientes transplantados renais a hepatite B oculta não foi um achado freqüente no nosso meio não tendo sido encontrada diferença na prevalência do HBV DNA em pacientes infectados ou não pelo vírus da hepatite C.

Referências

1. Ribeiro AR, Gonçalves LF. Complicações do Transplante Renal - Complicações Hepáticas. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP. Manual de Transplante Renal, 1ª edição, São Paulo, Editora Manole, 2004, p 265-274.
2. Cendoroglo Neto M, Draibe SA, Silva AE, Ferraz ML, Granato C, Pereira CA, et al. Incidence of and risk factors for hepatitis B virus and hepatitis C virus infection among haemodialysis and CAPD patients: evidence for environmental transmission. *Nephrol Dial Transplant*. 1995; 10: 240-6.
3. Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomao A, Correa-Oliveira R, et al. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 775-8.
4. Cabrerizo M, Bartolome J, De Sequera P, Caramelo C, Carreno V. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8: 1443-7.
5. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med*. 1999; 341: 22-6.
6. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, de Franchis R, et al. Quantification of Intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) in Patients With Chronic HBV Infection. *Hepatology* 2000; 1:507-512.
7. Karohl C, Manfro RC, Senger MB, Thomé FS, Gonçalves LFS, Rigatto M, et al.: Prevalência de Anticorpos Anti-Vírus da Hepatite C em Pacientes em Hemodiálise Crônica. *J Bras Nefrol* 17: 40-6, 1995.

8. Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2000; 33: 785-90.
9. Lee DS, Huh K, Lee EH, Lee DH, Hong KS, Sung YC. HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia: possibility of coinfection in these patients must be considered in HBV-high endemic area. *Gastroenterol Hepatol.* 1997; 12: 855-61.
10. Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, Pfeffel F, Sunder-Plassmann G, Petermann D, et al.. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 1995; 48: 1967-71.
11. Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Takayama T, et al. The significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma of patients with hepatitis C. *Cancer* 2000; 88: 2478-86.
12. Nirei K, Kaneko M, Moriyama M, Arakawa Y. The clinical features of chronic hepatitis C are not affected by the coexistence of hepatitis B virus DNA in patients negative for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 2000; 43: 95-101.
13. Bain VG. Hepatitis B in transplantation. *Transplant Infectious Disease* 2000; 2:153-165.
14. International Interferon-alfa Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon-alfa on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: retrospective cohort study. *Lancet* 1998; 351:1535-9.
15. Oldakowska-Jedynak M, Durlik M, Paczek L, Zielecka B, Juskowa J, Pawlak J, et al. Hepatocellular carcinoma development in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2000; 32:1363-4..
16. Correa JRM, Rocha F, Peres AA, Gonçalves LF, Manfro RC. Long-Term Impact of Hepatitis B and C Virus Infection in Kidney Transplantation Recipient's Survival. *Transplant Proc.* 2003, 35, 1076-77.

17. Durlík M, Gaciong Z, Soluch L, Rancewicz Z, Rowinska D, Kozłowska-Boszek B, et al. Clinical course of concomitant HBV and HCV infection in renal allograft recipients. *Ann Transplant.* 1996; 1: 11-2.
18. Valliammai T, Thyagarajan SP, Zuckerman JÁ, Harrison TJ. Precore and core mutations in HBV from individuals in India with chronic infection. *J Med Virol.* 1995; 45: 321-5.
19. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, et al. Serological pattern anti HBc alone: report on workshop. *J Med Virol.* 2000; 62: 437-455.
20. Hu K-Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat.* 2002; 9: 243-57.
21. Terrault AN, Wright LT. Viral Hepatitis A through G - Hepatitis B virus. In: Feldman M, Scharaschmidt BF, Sleisenger MH, Klein S - *Gastrointestinal and liver disease - Pathophysiology/ Diagnosis/ Management*, 6th ed., Vol. 2. Philadelphia, Pennsylvania, Editor W.B. Saunders, 1998, chapter 68, p 1129-43.
22. Uchida T, Kaneita Y, Gotoh K, Kanagawa H, Kouyama H, Kawanishi T, et al. Hepatitis C virus is frequently coinfecting with serum marker negative hepatitis B virus : probable replication promotion of the former by the latter as a demonstrated by in vitro cotransfection. *J Med Virol.* 1997; 52 :399-405.
23. Porchon C, Kremsdorf D, Pol S, Lunel-Fabianni F, Driss F, Opolon P, et al. Serum hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in non-A, non-B post-transfusional and sporadic chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1992; 16: 184-9.
24. Sengar DP, Couture RA, Lazarovits AI, Jindal SL. Long-term patient and renal allograft survival in HBsAg infection: a recent update. *Transplant Proc.* 1989; 21: 3358-9.

25. Gentil MA, Rocha JL, Rodriguez-Algarra G, Pereira P, Lopez R, Bernal G, et al. Impaired kidney transplant survival in patients with antibodies to hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 2455-60.
26. Morales JM, Campistol JM. Transplantation in the patient with hepatitis C. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11:1343-53.
27. Huang CC, Liaw YF, Lai MK, Chu SH, Chuang CK, Huang JY. The clinical outcome of hepatitis C virus antibody-positive renal allograft recipients. *Transplantation*. 1992; 53: 763-5.
28. Durlík M, Gaciong Z, Soluch L, Rancewicz Z, Rowinska D, Kozłowska-Boszkó B, et al. Clinical course of concomitant HBV and HCV infection in renal allograft recipients. *Ann Transplant*. 1996; 1: 11-2.
29. Manfro RC, Karohl C, GonçalvesLF, Senger MB, Thome FS, Prompt CA. Liver function tests in hepatitis C virus infected kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 1995; 27: 1821-2.
30. Wolffenbuttel L, Goncalves EA, Manfro RC, Goncalves LF. Elevated cyclosporine A trough levels in HCV positive kidney transplant recipients. *Rev Assoc Med Bras*. 2003; 49: 141-4.

Tabela 1. Dados demográficos nos grupos anti-HCV reagente e anti-HCV não reagente.

Variável		Valores (*)		P
		HCV Reagente (n=51)	HCV Não reagente (n=50)	
Idade		47,96 ± 9,95	44,40 ± 11,18	0,094
Sexo	M	30	24	0,138
	F	21	26	
Tipo de Doador	Cad	37	41	0,129
	VR	12	9	
Tempo de Hemodiálise (meses)		50,80 ± 34,64	32,02 ± 20,87	0,001
Tempo de Transplante (meses)		62,92 ± 51,73	49,94 ± 32,26	0,135
Uso de Azatioprina (sim/não)		31 (60,8%)	40 (80%)	0,017
Número de Transfusões (unidades)		2,87 ± 2,24	2,10 ± 1,05	0,101
Número de Gestações (unidades)		2,27 ± 1,80	2,45 ± 1,58	0,431
Rejeição Aguda (sim/não)		18 (35,3%)	25 (50%)	0,068

(*) Média ± Desvio Padrão

Tabela 2. Dados laboratoriais nos grupos anti-HCV reigente e anti-HCV não reigente.

Variável	Valores (*)		P
	HCV Reigente (n=50)	HCV Não reigente (n=50)	
Hematócrito (%)	38,34 ± 6,96	36,80 ± 7,57	0,293
Leucócitos (leuco/mcl)	6994 ± 2185	7221 ± 2951	0,662
Plaquetas (plaq/mcl)	211098 ± 64454	223640 ± 60732	0,317
Uréia (mg/dl)	79,00 ± 34,89	76,42 ± 41,80	0,737
Creatinina (mg/dl)	1,71 ± 0,88	1,70 ± 0,67	0,920
ALT (U/l)	34,49 ± 26,72	20,86 ± 9,99	0,001
AST (U/l)	31,71 ± 17,70	24,96 ± 14,95	0,041
GGT (U/l)	66,10 ± 82,48	33,40 ± 44,57	0,015
Fosfatase Alcalina (U/l)	307,90 ± 397,70	186,92 ± 66,39	0,036
Tempo de protombina (%)	89,08 ± 8,02	89,22 ± 7,62	0,928
Proteínas Totais (g/dl)	6,68 ± 0,62	6,92 ± 0,61	0,047
Albumina (g/dl)	4,14 ± 0,38	4,19 ± 0,43	0,481
Bilirrubinas totais (mg/dl)	0,94 ± 0,53	0,80 ± 0,25	0,084
Bilirrubina indireta (mg/dl)	0,68 ± 0,29	0,62 ± 0,21	0,190
Ciclosporinemia (ng/ml)	170,90 ± 69,80	135,03 ± 48,14	0,018

(*) Média ± Desvio Padrão; ALT = alanino aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; GGT = gama glutamil transpeptidase

Tabela 3. Modelo de análise multivariada para avaliação de alteração da alaninoaminotransferase.

Variáveis explicativas	F	P	Poder (%) (*)
Anti-HCV reagente	3,98	0,05	50,5
Uso de CyA	1,54	0,22	23,3
Uso de azatioprina	1,15	0,29	18,5
Anti-HCV reagente e uso de CyA	0,48	0,49	10,5
Anti-HCV reagente e uso de azatioprina	1,50	0,22	22,7
Uso de CyA e uso de azatioprina	0,34	0,56	8,9
Anti-HCV reagente + uso de CyA e uso de azatioprina	0,02	0,88	5,2

(*) Poder explicativo de cada variável independente relativamente aos efeitos na variável dependente (ALT). Calculado supondo um nível de significância de 5%.

Tabela 4. Prevalência de positividade do Gene S na hepatite B oculta.

Pacientes	Gene S		Total	Erro de Estimação (*)	
	Negativo	Positivo		Pontual	Intervalar (**)
Anti-HCV Reagente	50	1	51	1,96	[0; 5,77]
Anti-HCV Não Reagente	49	1	50	2,00	[0; 5,88]
Total	99	2	101	1,98	[0; 4,70]

(*) Valores em percentagens (**) Intervalo de Confiança de 95%

Occult Hepatitis B in renal transplant patients

Authors: Alessandro A Peres, Esther A Dias, Marisa Chesky, Luis F. Jobim , Luiz FS Gonçalves,
Roberto C Manfro.

Post Graduate Medical Sciences: Nephrology Program. School of Medicine. Universidade Federal
do Rio Grande do Sul.

Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003

Porto Alegre, RS. Brazil

Key-Words: Occult hepatitis B, Hepatitis C, Renal Transplantation.

Running Title: Hepatitis in renal transplantation

Address for correspondence:

Roberto C. Manfro MD

Division of Nephrology

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

Porto Alegre, RS. Brazil

90035-003

Fax: 55 51 3316-8121

Email: rmanfro@hcpa.ufrgs.br

Abbreviations

HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
Anti-HCV	Anti-HCV antibodies
HBsAg	Antigen of hepatitis B
CyA	Ciclosporina
Aza	Azatioprina
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
GGT	Gama glutamiltranspeptidase

Abstract

Background: Occult hepatitis B (HB) is characterized by the presence of HBV-DNA in patients who do not present HB surface antigen (HBsAg) detectable in sera. This condition is frequently described in patients with hepatitis C virus (HCV) infection and its clinical implications are uncertain. Since transplant patients were at risk for hepatitis B and/or C infection by blood transfusions, dialysis treatment and the transplant procedure itself we aimed to evaluate the prevalence of occult HB either with or without HCV infection.

Patients and Methods: One hundred and one HBsAg negative renal transplant patients were evaluated. Fifty-one were anti-HCV reagents (Elisa III). Sera was analyzed for the presence of the S and core genes of the HBV-DNA by a nested PCR technique. Serological markers of HBV infection, liver function testes and ciclosporine through levels were also analysed.

Results: The core gene of the HBV-DNA was identified in one HCV infected patient and in one anti-HCV negative who also presented the S gene (prevalence: 2% and 1% for each gene respectively). HCV infected patients presented longer pre-transplant dialysis time (50.8 ± 34.6 versus 32.0 ± 20.9 ; $p < 0.001$). Results of liver function tests were also increased in the HCV infected group: ALT: 34.5 ± 26.7 x 20.9 ± 10.0 ; ($P < 0.001$); AST: 31.7 ± 17.7 x 24.9 ± 14.9 ; ($P < 0.05$); GGT: 66.1 ± 82.4 x 33.4 ± 44.6 ; ($P < 0.02$) and alkaline phosphatase: 307.9 ± 397.7 x 186.9 ± 63.4 ; ($P < 0.04$). Ciclosporine through levels were also significantly higher in HCV infected patients 170.9 ± 69.8 and 135.0 ± 48.1 respectively ($P < 0.02$). Multivariate analysis revealed that only HCV infection was determinant of the increased results of the LFTs.

Conclusion: We found that occult hepatitis B is infrequent condition in our population of renal transplant patients and that HCV infection seems not to be a risk factor. In accordance with our previous work HCV we showed that infected renal transplant patients present evidence of liver

damage and altered metabolism evidenced by the elevated liver function testes a higher ciclosporine through levels.

Introduction

The frequency of hepatitis B virus (HBV) infection is decreasing overtime in chronic dialysis patients (1). This probably is due, at least in part, to the isolation and universal precaution measures, and to the availability of effective vaccines against HBV in the public health system, as well as to the compulsory vaccination policy of patients on chronic dialysis. However, in Brazil there is still a high frequency of hepatitis C virus (HCV) infection in these patients, as a consequence there is a significant risk of HCV contamination of uninfected patients (2,3).

The diagnosis of HBV infection is usually established by the presence of its surface antigen (HBsAg) in serum. After infection, the presence of this and other serologic markers denotes different status ranging from cure immunity and cure to chronic infection.

Recently, a particular type of HBV infection was described in the literature, in which the presence of viral DNA is detected in patients without HBsAg detectable by the usual serologic markers. This characterizes the so-called occult hepatitis B, in which the patients usually present low viral loads, less than 10^4 copies/ml, which may explain the failure of the serological methods to detect the HBsAg (4-6). Furthermore it is interesting to note that several studies suggest that occult hepatitis B is more frequent in HCV infected patients (5,7-10). However, the clinical implications of occult HBV infection in HCV-reagent patients are not well defined. Data from the literature indicate distinct situations, such as the non-influence of occult hepatitis B on the clinical evolution of the liver disease (9); the presence of HBV-DNA in HCV-reagent patients with hepatocellular carcinoma; although without showing a HBV related carcinogenic role (11) unless faster viral replication occurs (12). There are also the suggestions that patients with occult hepatitis B, co-infected by HCV, the response to alpha-interferon therapy is less

effective, a quicker progression to cirrhosis may occur as well as a higher chance of developing hepatocellular carcinoma (5,13-15).

Renal transplant patients are often infected by HBV and/or HCV as a result of their epidemiological exposures, either in dialysis, transfusions, or during the transplantation procedure itself. In this population, the course of the viral liver disease by isolated B or C viruses is controversial, however it has been clearly established that co-infection by virus B and C determines an unfavorable prognosis (13,15,16).

Part of the variability of survival outcomes found in studies performed on renal transplant patients who have hepatitis C could be due to the presence of occult hepatitis B. This hypothesis led us to carry out the present study aiming at determining the prevalence of this condition in our population of renal transplant patients.

Patients and Methods

One hundred and one HBsAg-negative (enzyme immunoassay, Bhering, NY, USA), renal transplant patients from the outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were evaluated. Among the patients there were 51 anti-HCV-positive and 50 anti-HCV-negative, all of them analyzed using a third generation ELISA (enzyme immunoassay, Abbot, Kyalami, South Africa). The plasma samples for later DNA extraction and PCR were frozen at -80°C .

The inclusion criteria in the study were, to have undergone renal transplantation, to not present serologic markers for HBV infection (HBsAg) and to agree with the informed consent terms. The patients included were submitted to the research protocol that included the following items: age, sex, race, time of dialytic treatment, previous transplantation(s), graft duration, type of donor, number of transfusions, number of pregnancies, immunosuppression regimen, previous acute rejection and use of OKT3. Laboratory data included were: anti-HCV, HBsAg, anti-HBc

IgM, anti-HBs, hematocrit, hemoglobin, total leukocytes, platelets, urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase, prothrombin time, total proteins, albumin, total bilirubins and fractions. All the patients agreed to participate in the study and signed the informed consent document. The study was approved by the Committee of Ethics in Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, accredited by the National Research Council of the Ministry of Health and signed at the Office for Human Research Protection – OHRP-USDHHS, Institutional Review Board – IRB 00000921.

DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA was extracted from 200 µl of plasma using the QIAGEN DNA extraction kit (Qiagen Inc, Chatswoth, CA, USA). The extracted DNA was stored at –20°C for later PCR. The PCRs for the S and Core genes of the HBV were performed in two amplification stages, as previously described (19). In the first one, 35 cycles were performed, as follows: denaturation at 95°C (45 seconds), annealing at 48°C (45 seconds), extension to 72°C (1 minute); 10 minutes at 72°C following the last cycle. The second stage was identical to the first, except for adding five cycles with the annealing step at 37°C (45 seconds). The PTC model thermocycler (MJ-Research Inc., Watertown, MA, EUA) was used for all PCRs. The products were analyzed by 2% agarose-ethidium bromide gel electrophoresis, evidenced by transillumination with ultra-violet light and photographed using the Kodak Digital Science® image capture software (Kodak, Rochester, NY, USA). The sequences of the initiators (primers) used in this study were obtained in previous works and are described below (17,18).

S region first stage:

Sense: 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'

Antisense: 5'-TACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG-3'

Second stage:

Sense: 5'-TAGTAAACTGAGCCARGAGAAAC-3'

Antisense: 5'-GTTGACAARAATCCTCACAATAC-3'

Core region first stage

Sense: 5'-GCGAAGCTTGAGGAATAAAGCCCCGTAAA3'

Antisense: 5'-GCGCTGCAGGAGTTGGGGAGGAGATTA3'

Second stage:

Sense: 5'-GCGAAGCTTAGATCTCTGGATGCTGGA3'

Antisense: 5'-GCGCTGCAGGAGGCTGTAGGCATAAAT3'

Positive controls were obtained based from DNA samples from patients with chronic hepatitis B.

Statistical Analysis. The data were presented as absolute numbers and percentages, means and standard-deviations. Non paired t tests and chi-square were used for statistical analyses. Multivariate analysis was performed to identify which of these variables influence the liver function tests. In the ALT was included as the dependent variable and anti-HCV, use of cyclosporine (CvA) and use of azathioprine (AZA) as independent variables. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

Results

All one hundred and one patients were evaluated. No significant differences were found among the groups as to mean ages, time of current transplantation and number of transfusions. There was a small predominance of male patients (53.5%), without any differences between the

groups. A statistically significant difference was found in the previous time on dialysis which was longer in the HCV-reagent group, while azathioprine was less used in this group (Table 1).

Here Table 1

Analyzing the laboratory data in the two groups, significant differences were found in the tests that demonstrate liver damage, with increased levels of ALT, AST, GGT and alkaline phosphatase and reduced total proteins in the anti-HCV reagent group. Cyclosporine blood through level was significantly higher in the anti-HCV reagent group. The hematocrit, leukocyte, platelet, urea, creatinine, prothrombin time, albumin and bilirubin levels did not present differences with a statistical significance between the groups (Table 2). Serologic marker analysis of HBV infection revealed similar results in both groups. We found two anti-HBc IgM reagent patients in the anti-HCV reagent group, and one patient in the anti-HCV non-reagent group ($p=0.35$). Anti-HBs antibodies were detected in 22 patients in the anti-HCV reagent group and in 19 patients in the anti-HCV non-reagent group ($p=0.37$).

Here Table 2

In the multivariate analysis it was demonstrated that only the presence of HCV infection significantly influences on the ALT levels (Table 3).

Here Table 3

Hepatitis B core region DNA was found in only a single anti-HCV non reagent patient, and in none of the anti-HCV positive recipients. The search for the S gene resulted positive in two patients, the one who was a core gene bearer and a second patient belonging to the anti-HCV reagent group. The proportion of S gene was estimated for the total number of patients and for the subgroups. For each situation, the estimation error and the confidence interval were calculated considering a 95% level of confidence, as demonstrated in Table 4.

Here Table 4

Discussion

In the present study, serum samples of 101 HBsAg-negative renal transplantation patients were examined aiming at the detection of the DNA of hepatitis B virus. Fifty-one patients presented anti-HCV antibodies and 50 did not, and the reason for this stratified analysis is the suggestion in the literature that HCV-infected patients present a much higher prevalence of occult hepatitis B (5). DNA analysis was performed by using a nested PCR technique for the S and core genes. Viral DNA of the S gene was detected in 2% of these patients, one from the HCV-reagent group and one from the HCV non-reagent group. On the other hand, the presence of the core gene viral DNA was detected in only one patient (1%).

In the literature, a higher prevalence of occult hepatitis B is described in patients with chronic HCV infection. However, the prevalence rates vary widely, a higher prevalence is observed in certain geographic regions, of which the highest is in Asia (8,19). Furthermore it was recently suggested that the association of HBV and HCV infections would put these patients at higher risk of developing hepatocellular carcinoma, with a lower response to interferon-alpha therapy and greater progression to cirrhosis (5, 20). Other reports suggest that

in patients with occult hepatitis B the virus may be reactivated in its clinical or conventional laboratory form, and this is especially true in immunocompromised hosts (13,15). It has also been suggested that HBV may have its genes activated by corticosteroid therapy and possibly other immunosuppressive agents (13).

Several possibilities have been suggested for the non-detection of the serological HBV infection markers in HCV-infected patients. The mostly often mentioned are: (a) interference between HBV and HCV diminishing HBV expression; (b) the fact that the immune system may maintain the virus in a latent or quiescent state for several years, depending on the host's immune response; (c) mutations in the virus which may lead to diminished antigen production and viral replication rate; (d) integration of HBV into the host's chromosome; (e) HBV infection in mononuclear cells of the peripheral blood which functions as a reservoir for the HBV that continues to replicate in these cells; a selection of mutant viruses may occur, as is sometimes seen following liver transplantation (21).

The variation found in the prevalence of occult hepatitis B may be accounted for by some factors, including differences in the molecular biology techniques used to detect viral DNA; viremia fluctuations that may not be detectable at a given time; demographic variations that will reflect different epidemiological exposures (19). In a Japanese study by Uchida et cols, performed with anti-HCV reagent patients with significant liver disease (cirrhosis, acute and chronic hepatitis), a prevalence of 87% of patients with occult hepatitis B was found (22), as opposed to 5.5% prevalence in a French study published by Porchon et cols, also performed with anti-HCV reagent liver patients (23).

The impact of occult hepatitis B in patients co-infected with HCV has not been determined. The possibility of faster progression of liver damage has been described, evolving to cirrhosis or hepatocellular carcinoma associated to a lower therapeutic response to alpha-interferon therapy

(5). There are also studies where co-infection between HCV and occult hepatitis B did not present a hepatocarcinogenic potential (11). Kazemi-Shirazi et al, in a study done to show the clinical significance of HBV co-infection did not find significant differences in the aminotransferase values, inflammatory activity of the liver and evolution of fibrosis of the liver in patients with or without HBV co-infection (8).

The impact of HBV infection in renal transplant recipients has long been studied. In general, a significant worsening of patient survival is found beginning by the fifth year post-transplantation (24). The data concerning HCV infection produce less consistent results, ranging from shorter survival, generally later, to absence of impact of this infection (25,26). In HBV and HCV co-infected patients, different observational studies found a significantly shorter survival of patients and grafts (27,28). Recently, Correia et cols demonstrated, in a 10-year follow up study, a shorter survival of patients and grafts in co-infected renal allograft recipients (16).

The variability of survival results observed in renal transplant patients with HCV infection could potentially be due to the presence of undetected occult HBV infection. This possibility led us to design a study with the purpose of evaluating the prevalence of occult hepatitis B in renal transplant patients, either infected or not by HCV as well as determining the clinical and laboratory repercussion of the infections. The results showed a low prevalence of occult hepatitis B (2%), not allowing the evaluation of the impact of the occult infection in the liver function tests. Our results differ significantly from most of the reports in the non renal transplant population, especially in some asian regions. However our results were in accordance with some european data in patients with liver disease (8). The present study is, to our knowledge, the first one evaluating and establishing the prevalence of occult hepatitis B in a population of renal transplant recipients. The differences found in the prevalence of the S gene as compared to most of the studies cannot be attributed to the PCR technique, since the latter was performed

according to the technique proposed, nested PCR, following the established protocol (17) and with the primers described in the literature (17,18). However there may be some reasons for the difference in prevalences. The most important include differences in epidemiological exposures to HBV, the type of population studied, liver patients versus renal transplantation patients and the differences in the HBV contamination pathways in these populations. Finally, it should be pointed out that in some studies in which a high prevalence of occult hepatitis B was detected, the study of viral DNA was performed on liver tissue, where the PCR is more efficient, possibly due to the higher viral load (5).

As to the finding of a longer time on dialysis in HCV-reagent patients, this has already been described previously in patients on chronic dialysis (7). Equally, repeating a previous finding in our patients, in the present study we find that anti-HCV reagent patients present aminotransferases levels higher than those found in non-infected patients. Furthermore, the cyclosporine levels found were higher in HCV infected patients and the use of azathioprine did not significantly influence the changes found in liver function (29,30).

Summarizing, in the present study on renal transplant patients in Brazil, occult hepatitis B was not a frequent finding, and no difference was found in the prevalence of HBV DNA in patients infected or not by hepatitis C virus.

References

1. Ribeiro AR, Gonçalves LF. Complicações do Transplante Renal - Complicações Hepáticas. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP. Manual de Transplante Renal, 1ª edição, São Paulo, Editora Manole, 2004, p 265-274.

2. Cendoroglo Neto M, Draibe SA, Silva AE, Ferraz ML, Granato C, Pereira CA, et al. Incidence of and risk factors for hepatitis B virus and hepatitis C virus infection among haemodialysis and CAPD patients: evidence for environmental transmission. *Nephrol Dial Transplant*. 1995; 10: 240-6.
3. Busek SU, Baba EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomao A, Correa-Oliveira R, et al. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 775-8.
4. Cabrerizo M, Bartolome J, De Sequera P, Caramelo C, Carreno V. Hepatitis B virus DNA in serum and blood cells of hepatitis B surface antigen-negative hemodialysis patients and staff. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8: 1443-7.
5. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med*. 1999; 341: 22-6.
6. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Villari D, de Franchis R, et al. Quantification of Intrahepatic Hepatitis B Virus (HBV) in Patients With Chronic HBV Infection. *Hepatology* 2000; 1:507-512.
7. Karohl C, Manfro RC, Senger MB, Thomé FS, Gonçalves LFS Rigatto M, et al.: Prevalência de Anticorpos Anti-Vírus da Hepatite C em Pacientes em Hemodiálise Crônica. *J Bras Nefrol* 17: 40-6, 1995.
8. Kazemi-Shirazi L, Petermann D, Muller C. Hepatitis B virus DNA in sera and liver tissue of HBsAg negative patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2000; 33: 785-90.
9. Lee DS, Huh K, Lee EH, Lee DH, Hong KS, Sung YC. HCV and HBV coexist in HBsAg-negative patients with HCV viraemia: possibility of coinfection in these patients

- must be considered in HBV-high endemic area. *Gastroenterol Hepatol.* 1997; 12: 855-61.
10. Oesterreicher C, Hammer J, Koch U, Pfeffel F, Sunder-Plassmann G, Petermann D, et al.. HBV and HCV genome in peripheral blood mononuclear cells in patients undergoing chronic hemodialysis. *Kidney Int.* 1995; 48: 1967-71.
 11. Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Takayama T, et al. The significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma of patients with hepatitis C. *Cancer* 2000; 88: 2478-86.
 12. Nirei K, Kaneko M, Moriyama M, Arakawa Y. The clinical features of chronic hepatitis C are not affected by the coexistence of hepatitis B virus DNA in patients negative for hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 2000; 43: 95-101.
 13. Bain VG. Hepatitis B in transplantation. *Transplant Infectious Disease* 2000; 2:153-165.
 14. International Interferon-alfa Hepatocellular Carcinoma Study Group. Effect of interferon-alfa on progression of cirrhosis to hepatocellular carcinoma: retrospective cohort study. *Lancet* 1998; 351:1535-9.
 15. Oldakowska-Jedynak M, Durlik M, Paczek L, Zielecka B, Juskowa J, Pawlak J, et al. Hepatocellular carcinoma development in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2000; 32:1363-4..
 16. Correa JRM, Rocha F, Peres AA, Gonçalves LF, Manfro RC. Long-Term Impact of Hepatitis B and C Virus Infection in Kidney Transplantation Recipient's Survival. *Transplant Proc.* 2003, 35, 1076-77.
 17. Durlik M, Gaciong Z, Soluch L, Rancewicz Z, Rowinska D, Kozłowska-Boszek B, et al. Clinical course of concomitant HBV and HCV infection in renal allograft recipients. *Ann Transplant.* 1996; 1: 11-2.

18. Valliammai T, Thyagarajan SP, Zuckerman JÁ, Harrison TJ. Precore and core mutations in HBV from individuals in India with chronic infection. *J Med Virol.* 1995; 45: 321-5.
19. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, et al. Serological pattern anti HBc alone: report on workshop. *J Med Virol.* 2000; 62: 437-455.
20. Hu K-Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat.* 2002; 9: 243-57.
21. Terrault AN, Wright LT. Viral Hepatitis A through G - Hepatitis B virus. In: Feldman M, Scharaschmidt BF, Sleisenger MH, Klein S - *Gastrointestinal and liver disease - Pathophysiology/ Diagnosis/ Management*, 6th ed., Vol. 2. Philadelphia, Pennsylvania, Editora W.B. Saunders, 1998, chapter 68, p 1129-43.
22. Uchida T, Kaneita Y, Gotoh K, Kanagawa H, Kouyama H, Kawanishi T, et al. Hepatitis C virus is frequently coinfecting with serum marker negative hepatitis B virus : probable replication promotion of the former by the latter as a demonstrated by in vitro cotransfection. *J Med Virol.* 1997; 52 :399-405.
23. Porchon C, Kremsdorf D, Pol S, Lunel-Fabianni F, Driss F, Opolon P, et al. Serum hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in non-A, non-B post-transfusional and sporadic chronic hepatitis. *J Hepatol.* 1992; 16: 184-9.
24. Sengar DP, Couture RA, Lazarovits AI, Jindal SL. Long-term patient and renal allograft survival in HBsAg infection: a recent update. *Transplant Proc.* 1989; 21: 3358-9.
25. Gentil MA, Rocha JL, Rodriguez-Algarra G, Pereira P, Lopez R, Bernal G, et al. Impaired kidney transplant survival in patients with antibodies to hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14: 2455-60.
26. Morales JM, Campistol JM. Transplantation in the patient with hepatitis C. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11:1343-53.

27. Huang CC, Liaw YF, Lai MK, Chu SH, Chuang CK, Huang JY. The clinical outcome of hepatitis C virus antibody-positive renal allograft recipients. *Transplantation*. 1992; 53: 763-5.
28. Durlik M, Gaciong Z, Soluch L, Rancewicz Z, Rowinska D, Kozłowska-Boszko B, et al. Clinical course of concomitant HBV and HCV infection in renal allograft recipients. *Ann Transplant*. 1996; 1: 11-2.
29. Manfro RC, Karohl C, Gonçalves LF, Senger MB, Thome FS, Prompt CA. Liver function tests in hepatitis C virus infected kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 1995; 27: 1821-2.
30. Wolffenbittel L, Goncalves EA, Manfro RC, Goncalves LF. Elevated cyclosporine A trough levels in HCV positive kidney transplant recipients. *Rev Assoc Med Bras*. 2003; 49: 141-4.

Table 1. Demographic data in the anti-HCV reagent and anti-HCV non-reagent groups

Variable		Values (*)		P
		HCV Reagent (n=51)	HCV Non-reagent (n=50)	
Age		47.96 + 9.95	44.40 + 11.18	0.094
Gender	Male	30	24	0.138
	Female	21	26	
Type of Donor	Cadaver	37	41	0.370
	Living	12	9	

Time on Dialysis (months)	50.80 + 34.64	32.02 + 20.87	0.001
Time since Transplant (months)	62.92 + 51.73	49.94 + 32.26	0.135
Use of Azathioprine (yes/no)	31 (60,8%)	40 (80%)	0.017
Number of Transfusions (units)	2.87 + 2.24	2.10 + 1.05	0.101
Number of Pregnancies (units)	2.27 + 1.80	2.45 + 1.58	0.431
Acute Rejection (yes/no)	18 (35,3%)	25 (50%)	0.068

(*) Mean + Standard Deviation or absolute

Table 2. Laboratory data in the anti-HCV reagent and anti-HCV non-reagent groups.

Variable	Values (*)		P
	HCV Reagent	HCV Non reagent	
Hematocrit (%)	38.34 + 6.96	36.80 + 7.57	0.293
Leukocytes (per mcl)	6994 + 2185	7221 + 2951	0.662
Platelets (per mcl)	211098 + 64454	223640 + 60732	0.317
Urea (mg/dl)	79.00 + 34.89	76.42 + 41.80	0.737
Creatinine (mg/dl)	1,71 + 0,88	1.70 + 0.67	0.920
ALT (U/l)	34.49 + 26.72	20.86 + 9.99	0.001
AST (U/l)	31.71 + 17.70	24.96 + 14.95	0.041
GGT (U/l)	66.10 + 82.48	33.40 + 44.57	0.015
Alkaline Phosphatase (I/U)	307.90 + 397.70	186.92 + 66.39	0.036
Prothrombin time (%)	89.08 + 8.02	89.22 + 7.62	0.928
Total Proteins (g/dl)	6.68 + 0.62	6.92 + 0.61	0.047
Albumin (g/dl)	4.14 + 0.38	4.19 + 0.43	0.481
Total bilirubins (mg/dl)	0.94 + 0.53	0.80 + 0.25	0.084
Indirect bilirubins (mg/dl)	0.68 + 0.29	0.62 + 0.21	0.190
Cyclosporinemia (ng/ml)	170.90 + 69.80	135.03 + 48.14	0.018

(*) Mean + Standard Deviation; ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; GGT = gamma glutamyl transpeptidase

Table 3. Multivariate analysis model to evaluate the alanine aminotransferase alteration.

Explanatory variables	F	P	Power (%) (*)
Anti-HCV reagent	3.98	0.5	50
Use of CyA	1.4	0.2	23
Use of azathioprine	1.5	0.9	18
Anti- HCV reagent and use of CyA	0.8	0.9	10
Anti- HCV reagent and use azathioprine	1.0	0.2	22
Use of CyA and of azathioprine	0.4	0.6	8
Anti- HCV reagent + use of CyA and use of azathioprine	0.2	0.8	5

(*) Explanatory power of each independent variable as related to effects on the dependent variable (ALT). Calculated assuming a 5% level of significance.

Table 4. Occult hepatitis B. Prevalence of S gene positivity.

Patients	S Gene		Total	Estimation Error (*)	
	Negative	Positive		Point	Interval (**)
Anti-HCV Reagent	50	1	51	1.96	[0; 5.77]
Anti-HCV Non-Reagent	49	1	50	2.00	[0; 5.88]
Total	99	2	101	1.98	[0; 4.70]

(*) Percentage values (**) 95% Confidence Interval