



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL - PGBIOEXP
ANITA SPERANDIO PORTO

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA HEPATITE DELTA EM RONDÔNIA:

Caracterização imuno-histoquímica do antígeno Delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

Orientador: Juan Miguel Vilallobos Salcedo

Porto Velho-RO
2016

Anita Sperandio Porto

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA HEPATITE DELTA EM RONDÔNIA:

Caracterização imuno-histoquímica do antígeno Delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

Orientador: Prof. Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP) da Universidade Federal de Rondônia – UNIR para defesa, a fim de obter o título de Mestre em Biologia Experimental.

Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Porto Velho
2016

**FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Porto, Anita Sperandio.

P853e

Estudo histopatológico da hepatite delta em Rondônia: caracterização imuno-histoquímica do antígeno delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no ambulatório de hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM. / Anita Sperandio Porto, Porto Velho, 2016.

145f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Juan Miguel Vilallobos Salcedo

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

1. Hepatite Delta. 2. Histopatologia. 3. Imuno-histoquímica. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.36-002

Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905

ANITA SPERANDIO PORTO

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA HEPATITE DELTA EM RONDÔNIA:

Caracterização imuno-histoquímica do antígeno Delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre, em sessão pública realizada em 1º de abril de 2016.

Banca examinadora

Dr. Juan Miguel Vilallobos Salcedo
Presidente da Banca Examinadora
Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental
Universidade Federal de Rondônia

Dra. Deusilene Souza Vieira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental
Universidade Federal de Rondônia

Dra. Thamy Yamashita Shibayama
Departamento de Medicina
Universidade Federal de Rondônia

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação
primeiramente à Deus, por mais esta oportunidade de evolução,
à meus pais pela dedicação e amor incondicional,
a meus irmãos, pelo apoio e companhia insubstituíveis,
aos meus orientadores pela paciência e incentivo constantes.
Muito obrigada!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, causa primeira de todas as coisas.

Aos meus pais, Beno e Marli e irmãos, Alice, Cassiano, Vladimir, Aline, Beno e Alana, meus amados companheiros de jornada.

Ao meu orientador Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo pelo apoio, paciência inigualável e entusiasmo contagiante.

Ao meu coorientador, Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, agradeço a oportunidade de aprendizado em hepatite delta, a gentileza na realização das imuno-histoquímicas e na análise microscópica de todas as amostras histopatológicas e imuno-histoquímicas deste trabalho.

À Marta, Tininha e Thiago, pela boa disposição em preparar e padronizar as reações imuno-histoquímicas.

Ao Dr. Zilton Araújo Andrade, do Laboratório de Patologia Experimental da Fiocruz Salvador, pelo auxílio nas análises histológicas e oportunidade de aprendizado.

À toda equipe do Ambulatório de Hepatites Virais e pesquisadores do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM) pela contribuição com exames bioquímicos, sorológicos e genotípicos, em especial a Dra. Deusilene Souza Vieira, do Laboratório de Virologia do CEPEM.

À Renata Santos Rodrigues, querida amiga e servidora do CEPEM, que me auxiliou muito no projeto de pesquisa e formatação desta dissertação.

À Sra. Maria Leide Pimentel, secretária do CEPEM, e acesso aos prontuários.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

À todos os professores que durante minha vida dedicaram seu tempo à minha formação, muito obrigada.

EPIGRAFE

“Não há fé inabalável senão aquela
que pode encarar a razão face a face
em todas as épocas da humanidade.”

Hippolyte Léon Denizard Rivail

RESUMO

Estima-se que cerca de 18 milhões de pessoas se encontram infectadas pelo HDV entre os 350 milhões de portadores crônicos do HBV no mundo. Investigações epidemiológicas na década de 1980 mostraram que a infecção pelo HDV é endêmica em todo o mundo, com taxas de prevalência variando entre as regiões. Atualmente, estão descritos oito genótipos, sendo que o tipo III foi localizado somente na Região Amazônica venezuelana, colombiana, peruana, equatoriana, boliviana e brasileira, sendo provavelmente originário de populações indígenas. É considerado o mais diferente geneticamente, além de ser o mais patogênico e sintomático, sendo responsável por formas graves e fulminantes de hepatite, com alta mortalidade, especialmente em crianças. Favorece a evolução para a cronicidade e rápida evolução para a cirrose hepática em pacientes jovens, bem como para o Carcinoma Hepatocelular (CHC). O estado de portador crônico do HBV (HBsAg positivo) constitui-se no principal fator epidemiológico para a propagação do HDV. Esta pesquisa justifica-se por ser a Hepatite Delta pouco conhecida e muito pouco discutida no Brasil e no exterior, sendo considerada por muitos pesquisadores como uma das doenças infecciosas mais negligenciadas, apesar da sua tendência a evoluir de forma grave. O objetivo deste estudo foi realizar uma descrição detalhada das características histopatológicas e imuno-histoquímicas. Além disso, foi possível correlacionar estes achados histológicos e de imuno-histoquímica com os aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e genotípicos. Selecionamos 24 casos de pacientes portadores exclusivamente de coinfeção por HBV/HDV, em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites Virais do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia, utilizando critérios de inclusão e exclusão. Os pacientes foram avaliados de maio de 2011 a maio de 2015, sendo submetidos a exames de rotina hematológicos, bioquímicos, sorológicos, além de biópsia hepática com estudo histopatológico e imuno-histoquímico. Foram feitas genotipagem para HBV e HDV por PCR-RT, com determinação de cargas virais de parte dos casos. Nos resultados, foi observado predomínio do genótipo III do HDV associado ao F do HBV, levando a casos de hepatite com atividade inflamatória acentuada e fibrose moderada a acentuada em adultos jovens, cursando ainda com elevação das transaminases proporcional à carga viral e ao grau histológico. Degeneração hidrópica importante, corpos apoptóticos frequentes, fibrose perissinusoidal importante principalmente em zona 3, infiltrado inflamatório rico em linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, linfocitose perissinusoidal e atividade lobular são achados inespecíficos, porém exacerbados nesta casuística. A distribuição do HDAg nos hepatócitos, por imuno-histoquímica, foi descontínua e esparsa, em todas as amostras, o que sugere que não há infecção célula a célula. O padrão de expressão em faixa observado nos casos HBsAg, por imuno-histoquímica, esteve relacionado com maior atividade inflamatória e maior grau de fibrose. A imuno-histoquímica para HBcAg evidenciou replicação do HBV em pacientes com sorologia HBeAg (-), o que sugere que este marcador, nos pacientes coinfectados HBV/HDV, não seja a melhor forma de avaliar a atividade replicativa do HBV.

Palavras-chaves: Hepatite Delta; HDV; anti-HDV; histopatologia; imuno-histoquímica; Rondônia.

ABSTRACT

It is estimated that about 18 million people are infected with HDV among the 350 million chronic carriers of HBV in the world. Epidemiological investigations in the 1980's showed that HDV infection is endemic throughout the world, with prevalence rates vary among the regions.

Currently, eight genotypes are described, and type III was found only in the Venezuelan Amazon region, Colombian, Peruvian, Ecuadorian, Bolivian and Brazilian, it is probably originating from indigenous populations. It is considered the more different genetically, and is the most pathogenic and symptomatic of all, accounting for severe and fulminant forms of hepatitis with high mortality, especially in children. Still favors the evolution to chronicity and rapid progression to liver cirrhosis in young patients and for hepatocellular carcinoma (HCC). The chronic carrier state of HBV (HBsAg positive) constitutes the main epidemiological factor in the spread of HDV. This research is justified because it is the Hepatitis Delta little known and little discussed in Brazil and abroad, and is considered by many researchers as one of the most neglected infectious diseases, despite its tendency to evolve in a serious way. The objective of this study was to conduct a detailed description of the histopathological and immunohistochemical characteristics, with control cases, of liver samples of patients with exclusive HBV infection, with same grade histopathological in an attempt to find histological features that assist in the diagnosis and histopathological grading of Delta hepatitis, since such data are scarce in the literature. Moreover, it was possible to correlate these histological findings and immunohistochemistry with clinical, epidemiological, laboratory and genotypic. We selected 24 cases of patients exclusively of HBV infection / HDV followed at Viral Hepatitis Clinic of the Center for Research in Tropical Medicine in Rondônia, using inclusion and exclusion criteria. Patients were assessed from May 2011 to May 2015 and submitted to routine tests hematological, biochemical, serologic, and liver biopsy with histopathological and immunohistochemical study. Genotyping were made for HBV and HDV by RT-PCR, to determine viral load of the cases. On the results, it was observed predominance of HDV genotype III associated with the HBV genotype F, leading to cases of hepatitis with marked inflammatory activity and moderate to pronounced fibrosis in young adults, still coursing with rising proportion transaminases, viral load and the histological grade. Important hepatocyte ballooning, frequent apoptotic bodies, moderate to marked perisinusoidal fibrosis, especially in zone 3, inflammatory infiltrate rich in lymphocytes, plasma cells and eosinophils, perisinusoidal lymphocytosis and lobular activity are found but exacerbated in this series. The distribution of the HDAg in hepatocytes by immunohistochemistry, was discontinuous and scattered in all samples, suggesting that no cell to cell infection. The range in expression pattern observed in HBsAg cases, immunohistochemistry, was associated with increased inflammatory activity and higher degree of fibrosis. Immunohistochemistry revealed to HBcAg replication of HBV in patients with serological HBeAg (-), suggesting that this marker in patients coinfecting HBV / HDV is not the best way to evaluate the activity of replicative HBV.

Keywords: Hepatitis Delta; HDV; anti- HDV; histopathology; immunohistochemistry; Rondônia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas desta pesquisa.	35
Tabela 2.	Perfil genotípico da digestão com Sma I e Xho I para um fragmento de 406pb correspondente ao HDAg.	36
Tabela 3.	Forma padronizada para a semiquantificação de variáveis histológicas.	41
Tabela 4.	Distribuição por faixa etária dos pacientes incluídos no estudo.	46
Tabela 5.	Algumas características sociodemográficas dos casos estudados	48
Tabela 6.	Distribuição quanto à presença de fatores de risco de infecção pelo HBV/HDV, entre os casos avaliados.	49
Tabela 7.	Distribuição dos principais sinais e sintomas de hepatite crônica observados nos pacientes incluídos no estudo.	50
Tabela 8.	Distribuição dos principais achados ultrassonográficos sugestivos ou indicativos de hepatite crônica e doenças das vias biliares observados nos pacientes incluídos no estudo.	50
Tabela 9.	Valores médios dos principais marcadores bioquímicos e hematológicos avaliados.	51
Tabela 10.	Avaliação dos casos deste estudo quanto à soroprevalência.	52
Tabela 11.	Avaliação histológica pela Classificação Metavir de acordo com a faixa etária.	55
Tabela 12.	Características morfológicas dos casos estudados, por ordem decrescente de frequência.	56
Tabela 13.	Distribuição por faixa etária dos casos de Genótipo III.	73

Tabela 14.	Distribuição por faixa etária dos casos de HBV.	73
Tabela 15.	Estudo das cargas virais e log do HBV e HDV.	75
Tabela 16.	Exames hematológicos e bioquímicos desta pesquisa x dados de outros trabalhos	81
Tabela 17.	Marcadores sorológicos desta pesquisa x dados de outros trabalhos.	82
Tabela 18.	Comparação dos linfócitos no tecido hepático x ALT x plaquetas.	84
Tabela 19.	Fibrose x Apoptose nos casos deste estudo.	86
Tabela 20.	Correlação da Fibrose com a Hepatite de Interface (Necrose em saca-bocado).	87
Tabela 21.	Relação dos achados imuno-histoquímicos para HDAg com o grau de atividade inflamatória, necrose em saca-bocado e atividade lobular.	90
Tabela 22.	Relação dos achados imuno-histoquímicos do HBsAg com a atividade inflamatória, necrose em saca-bocados e atividade lobular.	92
Tabela 23.	Relação dos achados imuno-histoquímicos do HBsAg com a fibrose hepática.	92
Tabela 24.	Relação dos achados imuno-histoquímicos do HBcAg com o Metavir.	93
Tabela 25.	Correlação dos genótipos de HBV e HDV com o Metavir.	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A. Microscopia eletrônica do vírus Delta, feita por Mario Rizzetto e colaboradores (FONSECA, 2002). B. Representação esquemática da partícula do HDV com envoltório do HBV (HBsAg). Disponível em: <https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=v%C3%A9rus+delta+da+hepatite&lang=3>. Acesso em 10 de novembro de 2015. 2
- Figura 2.** Representação esquemática do HDV e seu ciclo de replicação no hepatócito. Adaptado de HUGHES et al., 2011. 3
- Figura 3.** Principais áreas de distribuição do HDV no mundo. Os números representam os genótipos por cada região, sendo o número destacado o de maior prevalência. Adaptado de PASCARELLA & NEGRO, 2011. 7
- Figura 4.** Comparação entre as características clínicas da infecção pelo HDV em grupos de coinfeção e superinfecção. Adaptado de HSIEH et al., 2006. 10
- Figura 5.** Comparação do curso do HDV na coinfeção e na superinfecção, em pacientes com HBV/HDV. Adaptado de GRABOWSKY & WEDEMEYER, 2010. 10
- Figura 6.** Fatores de risco na coinfeção aguda (HBV/HDV) e de superinfecção pelo HDV em portadores de HBV. Adaptado de FONSECA, 2002. 11
- Figura 7.** Padrões Sorológicos dos tipos de infecção pelo HDV. Níveis de expressão do antígeno, DNA ou RNA IgM e IgG para ambos HDV e HBV e ALT (Adaptado de PASCARELLA & NEGRO, 2010). 12
- Figura 8.** Marcadores etiológicos do vírus delta e seus significados. Adaptado de Fonseca, 2002. 16
- Figura 9.** Fluxograma para o diagnóstico da infecção aguda pelo HDV 17

(+) positivo; (-) negativo (FONSECA, 2002)

- Figura 10.** Perfil sorológico da superinfecção aguda pelo HDV em diferentes padrões sorológicos de portadores do HBV (FONSECA, 2002). 18
- Figura 11.** Microfotografia de uma célula em mórula, achado característico da hepatite Delta aguda (H&E; aumento original 400X) (BRAGA JUNIOR, 2005). 19
- Figura 12.** Microfotografia de uma área de necrose submaciça, comprometendo zonas 1, 2 e 3 de Rappaport, em um caso de hepatite delta fulminante (H&E, aumento original 40x). BRAGA JUNIOR, 2005. 20
- Figura 13.** Microfotografia mostrando a expressão acentuada do antígeno Delta em núcleo e citoplasma de hepatócitos de pacientes com infecção crônica pelo VHB e VHD, em caso de hepatite de Lábrea (BRAGA JUNIOR, 2005) 21
- Figura 14.** Fluxograma resumido da metodologia deste estudo. 27
- Figura 15.** Diagrama de progressão para a fibrose na hepatite crônica. F1: Fibrose portal; F2: Septos fibrosos curtos com poucos septos finos porta-porta; F3: Transição para a cirrose, com septos porta-porta, áreas de regeneração com esboço nodular, em algumas áreas da biópsia por agulha; F4: Cirrose estabelecida. BATTS-LUDWIG, 1995, adaptado. 39
- Figura 16.** Algoritmo da Classificação Metavir para avaliação da atividade inflamatória. PMN= “Piecemeal necrosis” (Necrose em saca-bocado ou hepatite de interface), sendo 0=nenhuma; 1=discreta; 2=moderada; 3=acentuada. LN= Necrose lobular, sendo 0=nenhuma; 1=discreta; 2=moderada; 3=acentuada. LN= Necrose lobular. (The Metavir Cooperative Study Group. Hepatology, 1996; 24: 289-293) 39
- Figura 17.** Diagrama de atividade necroinflamatória. A0-A2: Graus de atividade de A0 a A2. Em A3: Necrose confluyente, na forma de necrose em ponte, presente somente na atividade grau 3 (A3). BATTS-LUDWIG, 1995, adaptado. 40

Figura 18.	Distribuição da população estudada em relação ao gênero.	45
Figura 19.	Distribuição dos casos segundo a naturalidade.	46
Figura 20.	Distribuição dos casos com naturalidade em áreas hiperendêmicas.	47
Figura 21.	Distribuição dos casos segundo a procedência.	47
Figura 22.	Diagnósticos Histopatológicos desta casuística, por ordem de Metavir.	53
Figura 23.	Tipos de células inflamatórias observadas por ordem decrescente de frequência.	57
Figura 24.	Microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acentuado com formação de um acúmulo linfóide sem centro germinativo (seta) (H&E, 200 x).	58
Figura 25.	Microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acentuado com moderado número de plasmócitos (seta maior). Presença ainda de corpúsculo de Councilman ou corpo apoptótico (seta menor) e balonização citoplasmática (cabeça de seta) (H&E, 200 x).	58
Figura 26.	Microfotografia mostrando numerosos eosinófilos periportais (H&E, 200x).	59
Figura 27.	Microfotografia mostrando intensa balonização citoplasmática (H&E, 200 x).	60
Figura 28.	Microfotografia mostrando esteatose macro e microgoticular em faixa e septos fibrosos permeados por infiltrado mononuclear predominantemente linfocítico (H&E, 100 x).	61
Figura 29.	Microfotografia mostrando grânulos grosseiros em quantidade moderada, intracitoplasmáticos, difusamente distribuídos (Perls, 200 x).	61
Figura 30.	Microfotografia mostrando hepatócitos em vidro fosco (H&E, 200 x).	62
Figura 31.	Microfotografia mostrando inflamação acentuada, com áreas de necrose em “saca-bocado” (setas) (H&E,100 x).	63
Figura 32.	Microfotografia mostrando células apoptóticas com eosinofilia e picnose, periportais e mediozonais (setas) (H&E, 200x).	64

- Figura 33.** Microfotografia mostrando septos fibrosos portais e porta-porta, bem demarcados em vermelho (seta), esboçando nódulos de regeneração (Picrosirius, 100x). 64
- Figura 34.** Microfotografia mostrando septos fibrosos portais importante (seta), sem septos porta-porta. Metavir: A3F1 (Picrosirius, 40x). 65
- Figura 35.** Microfotografia mostrando septos fibrosos bem demarcados em vermelho, em zonas 1, 2 e 3, esboçando nódulos de regeneração (setas). Note a fibrose perissinusoidal difusa. Metavir: A3F3. (Picrosirius, 100x). 66
- Figura 36.** Microfotografia mostrando septos fibrosos porta a porta (ponta de seta) e duplicidade de cordões hepatocitários (seta). Metavir: A2F3 (Reticulina, 200x). 67
- Figura 37.** Microfotografia mostrando pseudorrosetas de regeneração (setas) (H&E, 200x). 67
- Figura 38.** Casos positivos para os marcadores imuno-histoquímicos analisados. 68
- Figura 39.** Microfotografia mostrando expressão do antígeno Delta no núcleo e citoplasma dos hepatócitos (seta). Técnica de imuno-histoquímica para HDAg, 400x. 69
- Figura 40.** Microfotografia mostrando expressão do antígeno Delta no núcleo e citoplasma dos hepatócitos (A) e exclusivamente nuclear (B). Técnica de imuno-histoquímica para HDAg, 200x (A e B). 69
- Figura 41.** Microfotografia mostrando expressão do antígeno Delta (setas) predominantemente no citoplasma dos hepatócitos e em raros núcleos. Técnica de imuno-histoquímica para HDAg, 200x. 70
- Figura 42.** Microfotografia mostrando expressão do antígeno HBsAg no citoplasma dos hepatócitos, em padrão de faixa (A), (+++). Preservação dos espaços-porta (B) e apresenta marcação forte (C) e fraca de hepatócitos (D). Técnica de imuno- 71

	histoquímica para HBsAg, 40x (A) e 200 x (B, C, D).	
Figura 43.	Microfotografia mostrando expressão em marrom do HBsAg no citoplasma dos hepatócitos (+++).Técnica de imuno-histoquímica para HBsAg, 40x (A) e 200 x (B).	71
Figura 44.	Microfotografia mostrando expressão do HBcAg no citoplasma (+++) dos hepatócitos. Técnica de imuno-histoquímica para HBcAg, 40x (A) e 200 x (B).	72
Figura 45.	Microfotografia mostrando expressão do antígeno HBcAg no núcleo de hepatócito (seta). Único caso com expressão nuclear do HBcAg. Técnica de imuno-histoquímica para HBcAg, 200 x.	72
Figura 46.	Distribuição dos casos de genótipo F do HBV segundo a faixa etária, em anos.	74
Figura 47.	Distribuição dos casos de genótipo A do HBV segundo a faixa etária, em anos.	74
Figura 48.	Coeficientes de Correlação de Pearson acima da diagonal, Histogramas na Diagonal e Diagramas de Dispersão abaixo da Diagonal.	76
Figura 49.	Gráfico mostrando a intersecção de imunoexpressão do HBsAg, HBcAg e HDV do HBsAg, HBcAg e HDV nos casos deste estudo.	89
Figura 50.	Coeficientes de Correlação de Pearson acima da diagonal, Histogramas na Diagonal e Diagramas de Dispersão abaixo da Diagonal.	98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Grau de atividade inflamatória
ANA	Anticorpo Antinuclear
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIH	Autorização de Internação Hospitalar
ALT/TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
AML	Anticorpo antimúsculo liso
Anti-HAV IgM	Anticorpo contra capsídeo do vírus da Hepatite A, infecção aguda ou recente.
Anti-HBc Total	Anticorpo contra o core do vírus da hepatite B
Anti-HBc IgM	Anticorpo contra o core do vírus da hepatite B, recente.
Anti-HBe	Anticorpo contra o antígeno “e” do HBV. Marcador que indica um bom prognóstico na fase aguda da hepatite B.
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HCV	Anticorpo contra vírus da hepatite C
Anti-HDV	Anticorpo contra Vírus da Hepatite D ou Delta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST/TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
CDC	Centers for Disease Control (CDC)
CEMETRON	Centro de Medicina Tropical de Rondônia
CEPEM	Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia
CHC	Carcinoma Hepatocelular
cm	Centímetro
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAB	Diaminobenzidina
EBV	Epstein Barr Vírus
F	Grau de fibrose
g	Gramma
G	Gauge
GGT	Gama Glutamil Transferase

HCV ou VHC	Vírus da Hepatite C
HbeAg	Antígeno “e” do vírus da Hepatite B. Indica replicação viral
HbcAg	Antígeno do core do vírus da Hepatite B
HBsAg	Antígeno de Superfície do vírus da Hepatite B
HBV ou VHB	Vírus da Hepatite B
HBV-DNA	Ácido Desoxirribonucleico do vírus da Hepatite B
HDV ou VHD	Vírus da Hepatite D ou Delta
HDV-RNA	Ácido Ribonucleico do Vírus da Hepatite D ou Delta
HDAg	Antígeno do vírus D
H&E	Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Km²	Quilômetros quadrados
LKM-1	Anticorpos antimicrosossomais hepáticos/renais do tipo 1
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm³	Milímetro cúbico
Min	Minuto
NBR	Denominação de norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RT	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
Peg IFN-α	Interferon peguilado alfa
rpm	Rotações por minuto
RO	Rondônia
S-HBsAg	Proteína curta do antígeno de superfície do HBV
M-HBsAg	Proteína média do antígeno de superfície do HBV
L-HBsAg	Proteína longa do antígeno de superfície do HBV
RNA	Ácido Ribonucleico
SUS	Sistema Único de Saúde

TAP	Tempo de Ativação da Protrombina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
UI/L	Unidades internacionais por litro
U/L	Unidades por litro
°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HISTÓRIA E ESTRUTURA DO VÍRUS DELTA.....	1
1.2 PATOGÊNESE DO VÍRUS DELTA.....	4
1.3 EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DELTA.....	5
1.3.1 Hepatite Delta no Mundo.....	5
1.3.2 Hepatite Delta no Brasil.....	7
1.3.2.1 Hepatite Delta na Amazônia.....	8
1.4 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA.....	9
1.5 DIAGNÓSTICO DA HEPATITE DELTA.....	14
1.6 SOROLOGIA PARA HDV.....	15
1.7 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	18
1.8 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA HDV.....	20
1.9 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE HDV.....	21
1.9.1 Genotipagem do HDV.....	22
1.10 PREVENÇÃO DA HEPATITE DELTA.....	23
1.11 TRATAMENTO DA HEPATITE DELTA.....	24
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 MODELO DE ESTUDO.....	27
4.2 LOCAL DO ESTUDO	27
4.3 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	28
4.3.1 Critérios de inclusão	28
4.3.2 Critérios de exclusão	28

4.4 CONSULTA E EXAMES INICIAIS	30
4.5 BIÓPSIA HEPÁTICA	31
4.6 TÉCNICAS LABORATORIAIS	31
4.6.1 Técnicas Bioquímicas e Hematológicas	31
4.6.2 Técnicas Sorológicas	32
4.6.3 Técnica Histopatológicas.....	32
4.6.4 Técnica de Imuno-histoquímica	33
4.6.5 Técnicas Moleculares.....	35
4.6.5.1 Técnica de determinação do genótipo do HDV	35
4.6.5.2 Técnica de quantificação do HDV	36
4.6.5.3 Técnica de determinação do genótipo do HBV	37
4.6.5.4 Técnica de quantificação do HBV	37
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	38
4.7.1 Análise Histopatológica pela Classificação Metavir.....	38
4.7.2 Análise de reações e danos morfológicos.....	40
4.7.3 Caracterização do infiltrado inflamatório.....	41
4.7.4 Caracterização das lesões celulares reversíveis.....	42
4.7.5 Caracterização das lesões celulares irreversíveis.....	42
4.7.6 Caracterização da regeneração celular.....	42
4.7.7 Caracterização da proliferação ductular e reação ductular.....	43
4.7.8 Caracterização de dano vascular.....	43
4.8 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	43
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
5. RESULTADOS	45
5.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO.....	45
5.1.1 Aspectos demográficos.....	45
5.1.2 Antecedentes pessoais, familiares e fatores de risco.....	48
5.2 PERFIL CLÍNICO E ULTRASSONOGRÁFICO.....	49
5.3 PERFIL BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO.....	51
5.4 PERFIL SOROLÓGICO.....	51
5.5 PERFIL HISTOPATOLÓGICO.....	53
5.5.1 Classificação Histopatológica Metavir.....	53

5.5.2 Caracterização de Reações e Danos Morfológicos.....	55
5.5.2.1 Caracterização e Quantificação do infiltrado inflamatório.....	56
5.5.2.2 Avaliação das lesões celulares reversíveis.....	59
5.5.2.3 Avaliação das lesões celulares irreversíveis e fibrose	62
5.5.2.4 Avaliação dos padrões de fibrose.....	64
5.5.2.5 Avaliação da regeneração celular	66
5.5.2.6 Avaliação do dano vascular.....	68
5.6 PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO.....	68
5.6.1 Perfil imuno-histoquímico do Antígeno Delta (HDAg).....	69
5.6.2 Perfil imuno-histoquímico do HBsAg.....	70
5.6.3 Perfil imuno-histoquímico do HBcAg.....	72
5.7 PERFIL DA BIOLOGIA MOLECULAR.....	73
5.7.1 Genotipagem.....	73
5.7.1.1 Genotipagem do HDV.....	73
5.7.1.2 Genotipagem do HBV.....	73
5.7.2 Determinação da Carga Viral.....	75
5.7.2.1 Quantificação do HDV	76
5.7.2.2 Quantificação do HBV.....	76
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO.....	96
8. REFERÊNCIAS.....	98
9. APÊNDICES.....	117
10. ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA E ESTRUTURA DO VÍRUS DELTA

O vírus da hepatite D ou Delta (HDV), do gênero Deltavírus, família Deltaviridae, é um RNA vírus descoberto por Mario Rizzetto e colaboradores nos anos 1970, quando detectou novos antígenos nucleares em pacientes com uma forma grave de hepatite B crônica (RIZZETTO et col., 1977), sendo o mais patogênico e infeccioso dentre os vírus hepatotrópicos humanos (FONSECA, 2009), grande causa de mortalidade e transplante hepático (HSIEH et al., 2006).

O antígeno Delta obteve o status de vírus em 1983, com o nome oficial de vírus da Hepatite Delta. Contudo, o termo hepatite por vírus D é preferido, embora o termo “delta” seja ainda bastante utilizado. A singularidade do vírus foi confirmada em 1986, após clonagem e sequenciamento do seu genoma (HSIEH, 2006; WANG et al., 1986)

O HDV é uma partícula esférica de 36-43nm, contendo uma estrutura central de ácido ribonucleico circundado por proteínas do HBV e lipídios do hospedeiro. A estrutura central (19nm) é composta de um complexo genoma de RNA do HDV com cerca de 70 moléculas de HDAg em suas formas curta e longa (RYU et al., 1993).

O envelope é composto por cerca de 100 cópias de três proteínas do envelope do HBV: a curta (S-HBsAg), a média (M-HBsAg) e a longa (L-HBsAg), na proporção aproximada de 95:5:1 (PASCARELLA & NEGRO, 2010; BONINO et al., 1986). Foi comprovado que a S-HBsAg é suficiente para replicação do RNA viral e que a L-HBsAg é necessária para garantir a infectividade. A média não tem função de replicação, nem de infectividade (PASCARELLA & NEGRO, 2011; SUREAU et al., 1994).

O genoma do HDV é constituído por aproximadamente 1700 nucleotídeos. Existem dois antígenos (HDAg) do vírus delta: O S-HDAg (pequeno) (24kDa) e o L-HDAg (longo) (27KDa) (WEDEMEYER, 2011). O S-HDAg é essencial para replicação (SMEDILE e RIZZETO, 2011) e aceleração da síntese genômica

(WEDEMEYER, 2011), enquanto o L-HDAg é essencial para a agregação e interação do virion HDV com o HBsAg (SMEDILE e RIZZETO, 2011). Ele inibe a síntese de RNA, mas é essencial para a morfogênese do virion (WEDEMEYER, 2011). Várias mudanças pós-transcricionais são fundamentais na função deste antígeno: fosforilação, acetilação, metilação e prenilação modificam as funções biológicas deste antígeno, guiando o ciclo biológico do HDV (SMEDILE e RIZZETO, 2011). Figura 1.

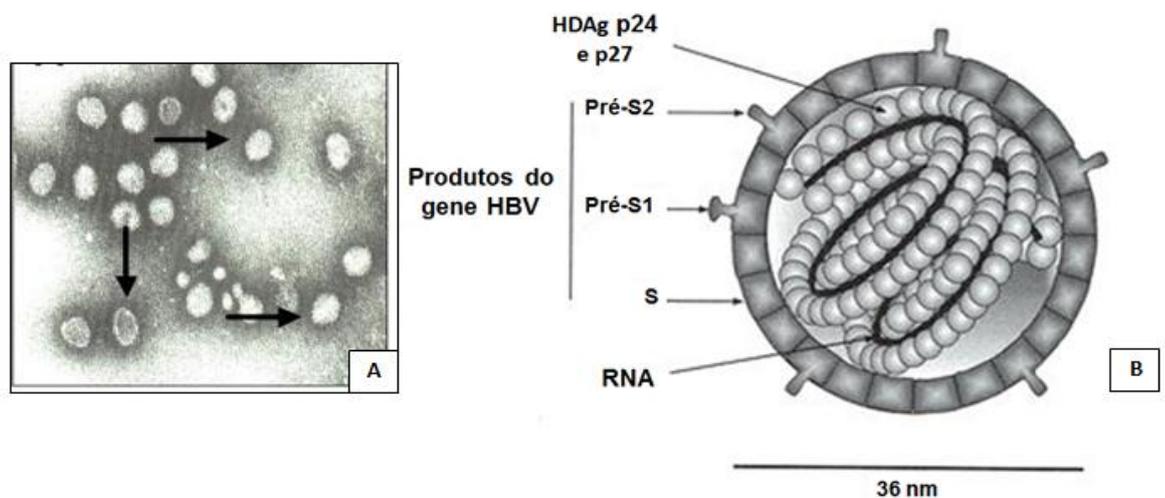


Figura 1. A. Microscopia eletrônica do vírus Delta, feita por Mario Rizzetto e colaboradores (FONSECA, 2002). B. Representação esquemática da partícula do HDV com envoltório do HBV (HBsAg) Disponível em: https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=v%C3%ADrus+delta+da+hepatite&lang=3. Acesso em 10 de novembro de 2015.

Três diferentes RNA's se acumulam durante a replicação: o genômico (~300.000 cópias), o antigenômico (~30.000 cópias) e o RNA mensageiro (~600 cópias). O RNA genômico é formado por uma única fita de RNA circular, composto de 1672 a 1697 nucleotídeos, dependendo da conformação do RNA secundário (RADJEF et al., 2004). Ele é o menor e o único RNA circular entre os vírus de animais, sendo esta característica estrutural e forma de replicação observada apenas em viróides e virusóides de plantas (WANG et al., 1986).

O RNA antigenômico é o complemento exato do genoma, sendo que sua replicação ocorre através da síntese de RNA diretamente de molde RNA, sem qualquer intermediário de DNA (CHEN et al., 1986). Dessa forma, o RNA genômico

do HDV é capaz de se clivar codificando uma única proteína estrutural, o antígeno da hepatite Delta (HDAg) a partir de um RNA antigenômico. (ALVARADO-MORA et al., 2013). Na Figura 2, está representado o ciclo de vida do HDV, mostrando o receptor na membrana do hepatócito.

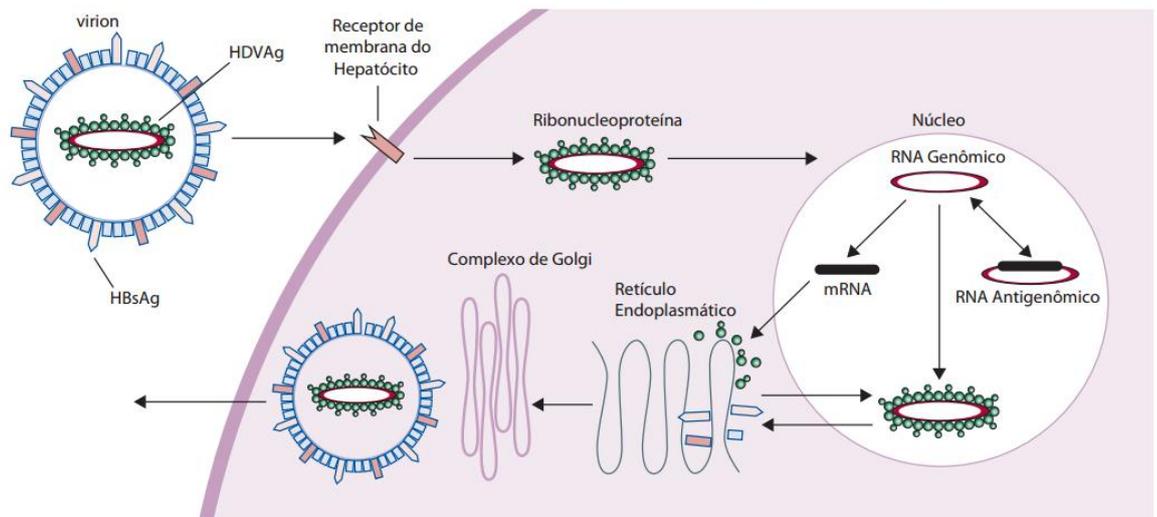


Figura 2. Representação esquemática do HDV e seu ciclo de replicação no hepatócito. (1) O virion entra nos hepatócitos através de uma interação entre o L-HBsAg e o receptor de membrana na célula hospedeira, chamado NTPC; (2) o virion entra na célula e perdem o revestimento; (3) a Ribonucleoproteína é encaminhada para o núcleo; (4) RNA genômico é transcrito no núcleo para formar RNA antigenômico, que forma o modelo para replicação de novos transcritos do genoma circular, e o RNAm, que contém a zona aberta de de leitura; (5) o RNAm é exportado para o citoplasma, onde é traduzido no retículo endoplasmático para formar novas moléculas de HDAg; (6) as novas moléculas de antígeno voltam para o núcleo onde o S-HDAg suporta a replicação do genoma, e onde ambas as formas do HDAg estão associados com novo RNA genômico transcrito, para formar novas ribonucleoproteínas; (7) Ribonucleoproteínas são exportadas para o citoplasma, onde L-HDAg facilita a associação com proteínas do envelope de HBV no retículo endoplasmático, para formar novas partículas virais; (8) estas partículas passam através de um compartimento intermediário; (9) e são exportadas do hepatócito através da rede trans-Golgi para reinfectar novas células. (Adaptado de HUGHES et al., 2011.)

De composição híbrida e defectiva, o HDV apresenta-se biologicamente como o único agente satélite e subviral humano que depende exclusivamente da função ajuda promovida pelo DNA do vírus da hepatite B (HBV-DNA) (FONSECA, 1993), que tem como uma das suas principais funções oferecer ao HDV partículas de HBsAg. Estas partículas serviriam de invólucro ao HDV, protegendo desta maneira sua integridade física (FONSECA, 2009; FONSECA, 2002) e funções de transmissão, infectividade, penetração e replicação exclusiva nos hepatócitos (FONSECA, 1993), impedindo a hidrólise do HDV-RNA (FONSECA, 2009;

FONSECA, 2002). Um estudo recente mostrou que o HDV é capaz de se replicar mesmo na ausência de replicação do HBV (FREITAS et al., 2014).

HDV não é um vírus hepatotrópico autônomo. Apesar de sua replicação ocorrer exclusivamente nos hepatócitos em seres humanos, estudos *in vivo* e *in vitro* realizados injetando RNA viral na cauda de ratos têm demonstrado que não somente as células do fígado, mas outras células de mamíferos, como as musculares, podem autonomicamente suportar a síntese de HDV (SMEDILE & RIZZETTO, 2011).

O HDV apresenta similaridades com os viróides de plantas, por isso foi proposto que ele possa ter se originado de um patógeno infeccioso de RNA do reino vegetal (SMEDILE e RIZZETTO, 2011). Estudos genéticos e sequenciais do genoma do HDV revelaram, caracteristicamente, uma alta heterogeneidade deste vírus, com várias sequências isoladas, tendo sido identificados até o ano 1993 três genótipos do HDV, diferenciados e denominados de tipo I, II (IIa, IIb) e III (CASEY et al., 1993). Em 2001, estudos resultantes da análise do genoma do vírus em africanos sugeriram a existência de mais três genótipos do HDV (RADJEF et al., 2001). Em 2004, foi confirmada a existência de um sétimo genótipo viral (RADJEF et al., 2004) e LE GAL et al., em 2006, descreveu um oitavo genótipo, que foi isolado de pacientes de origem africana que vivem na França (LE GAL et al., 2006; WEDEMEYER, 2011). O HDV III é conhecido como o genótipo mais distante de uma raiz comum africana e o responsável pela maioria dos casos severos e fulminantes (BRAGA et al., 2014).

1.2 PATOGÊNESE DO VÍRUS DELTA

Conhecimentos sobre a patogênese do HDV são ainda muito limitados (WEDEMEYER, 2010). Observações clínicas indicam que a Hepatite Delta é primordialmente um processo imune-mediado, pois foi evidenciado que os linfócitos T CD4 são mais numerosos naqueles pacientes com coinfeção HBV/HDV, do que HBV/HCV (WEDEMEYER e MANNIS, 2006). Fenômenos autoimunes também parecem contribuir para a destruição dos hepatócitos (SMEDILE et al., 2002). O

mais comum parece ser a presença do autoanticorpo LKM-3, dirigido contra a uridina-difosfato-glucuronil-transferase (PHILIPP et al., 1994). Contudo, em alguns casos observa-se que há um efeito citopático viral direto. (WEDEMEYER E MANN, 2010). O L-HDAg parece ativar o fator de crescimento transformante β , que pode estimular a transição epitélio-mesênquima e fibrogênese (SHIH et al., 2012), o que pode explicar a rápida evolução para fibrose nos casos de infecção pelo HDV.

Basicamente, a patogênese do HDV envolve principalmente a inibição da sinalização do Interferon- α (IFN- α), ativação de linfócitos T HDV específicos resposta de citocinas e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator sinalizador nuclear kappa B, juntamente com modificações induzidas nas células infectadas. (ABBAS et al., 2013).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DELTA

1.3.1 Hepatite Delta no mundo

Cerca de 550 milhões estão cronicamente infectadas pelos vírus da hepatite, representando 9% da população mundial. Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HDV dentre os 350-400 milhões de portadores crônicos do HBV no mundo (LEMOINE et al., 2013; PASCARELLA & NEGRO, 2011; WEDEMEYER, 2011; FONSECA, 1993). Investigações epidemiológicas na década de 1980 mostraram que a infecção pelo HDV é endêmica em todo o mundo, com taxas de prevalência variando entre as regiões (SMEDILE e RIZZETTO, 2011).

A infecção pelo HDV é mais prevalente no mediterrâneo, meio leste europeu, centro e norte da Ásia, oeste e centro da África, Amazônia brasileira, venezuelana e colombiana e certas ilhas do pacífico (PASCARELLA & NEGRO, 2011), sendo observada em menor número entre usuários de drogas endovenosas e hemofílicos (BRAGA et al., 2014; PARANÁ et al., 2006) nos Estados Unidos e Europa, indígenas da América do Sul, grupos étnicos na África e Turquia e nativos da Groenlândia (BRAGA et al., 2014), Taiwan, China e Índia (PASCARELLA & NEGRO, 2011).

O declínio progressivo que vem ocorrendo no número de casos de infecção pelo HDV deve-se ao controle da infecção pelo HBV por meio da vacinação, implementada na década de 1980 e atualmente utilizada em 181 países (ROMANÓ et al., 2015). Na Itália, por exemplo, diminuiu de 24,6%, em 1983, para 8,3% em 1997 (GAETA et al., 2000), mudança também observada em outros países, como Turquia (DEGERTEKIN et al., 2006) e Espanha (NAVASCUÉS et al., 1995).

Contudo, os indicadores demográficos europeus atuais vêm registrando um aumento do número de infectados pelo HDV na Europa, devido a um grupo de imigrantes provenientes de áreas endêmicas (WEDEMEYER, 2011), principalmente a África e a Turquia (RIZZETTO, 2009), e de um grupo de pessoas locais que provavelmente adquiriram Hepatite Delta nos anos 1970-1980, mas que teve detecção sorológica recentemente (SMEDILE & RIZZETTO, 2011).

Em países desenvolvidos, as principais populações de risco são usuários de drogas ilícitas e pessoas expostas a sangue e hemoderivados (FONSECA, 1986; WEISFUSE et al., 1989). Já em países em desenvolvimento, muitas infecções ocorrem no âmbito familiar, facilitada pela pouca higiene e compartilhamento de objetos de uso pessoal. (HUGHES et al., 2011; PASCARELLA & NEGRO, 2010; POLISH et al., 1993).

Cada genótipo do HDV apresenta diferente distribuição geográfica e doenças hepáticas associadas (figura 3), sendo o subtipo IIa e o tipo III considerados os mais patogênicos (CASEY et al., 1993). O genótipo I é o mais frequentemente encontrado em todo o mundo, especialmente na Europa, meio leste, América do Norte e África. Em contraste, o genótipo II é principalmente prevalente no extremo leste (WEDEMEYER, 2010), apesar de, surpreendentemente, a infecção pelo HDV ser rara na grande população de portadores crônicos de HBsAg do sudeste da Ásia e da China (CRAWFORD & LIU, 2010).

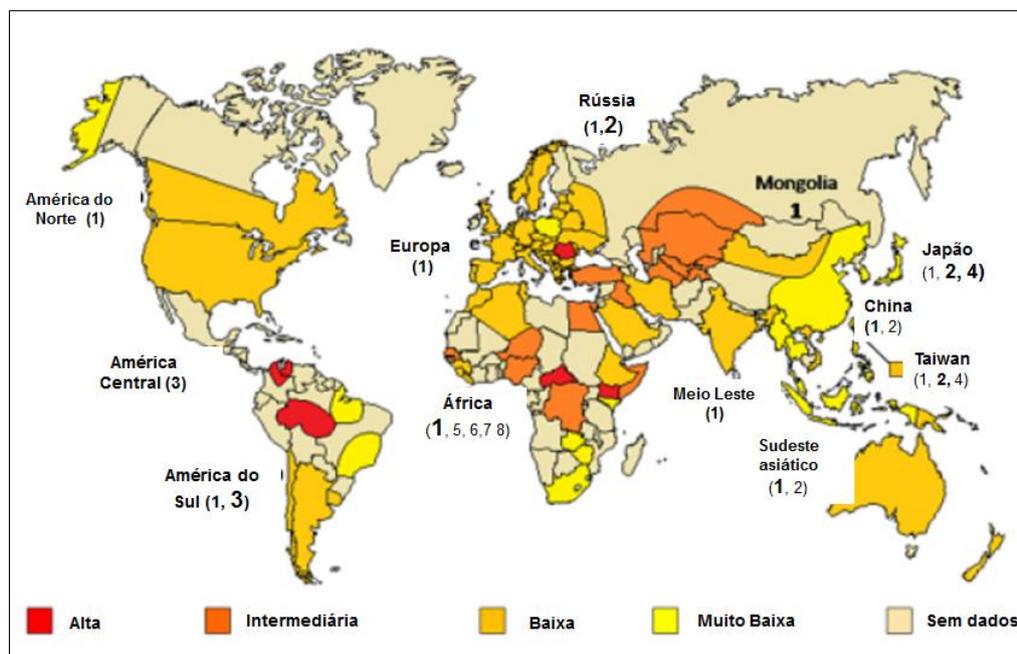


Figura 3. Principais áreas de distribuição do HDV no mundo. Os números representam os genótipos por cada região, sendo o número destacado o de maior prevalência. Adaptado de PASCARELLA & NEGRO, 2011.

O tipo III foi localizado somente na região amazônica (WEDEMEYER, 2010), é considerado o mais diferente geneticamente. Além de ser o mais patogênico de todos (CASEY et al., 1996), mostrou também ser o mais sintomático (PARANÁ et al., 2006). Entre populações autóctones da América, estudos relatam altas taxas de prevalência de infecção e doença pelo HBV e HDV na Amazônia venezuelana, colombiana, peruana, equatoriana, boliviana e brasileira (BRAGA, 2014).

1.3.2 Hepatite Delta no Brasil

Segundo dados preliminares do Ministério da Saúde, entre 1999 e 2010, foram confirmados 1.812 casos de hepatite Delta, com concentração de 76,3% na região Norte. Os Estados do Acre e Amazonas agregam a maior casuística acumulada e notificada no período, 555 e 625 casos, respectivamente (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2011). A infecção não foi detectada nas regiões Sudeste, Nordeste e na Amazônia Oriental (Portal da Saúde, 2010; PARANÁ et al., 2006).

1.3.2.1 Hepatite Delta na Amazônia

A Amazônia é considerada um dos locais de maior prevalência da coinfeção HBV/HDV no mundo (BRAGA et al., 2012; FONSECA, 1988). Aproximadamente 32,5% são do gênero masculino e 67,5% do gênero feminino, sem diferença significativa de incidência de genótipo por sexo ou raça (PARANÁ et al., 2006). Nela predominam os genótipos I (55%) e o III (45%), este último responsável pelas formas graves de hepatite (FONSECA, 2009; PARANÁ et al., 2006). O genótipo III é endêmico na região amazônica e provavelmente originou-se em populações indígenas. O genótipo I parece ter sido introduzido na população durante o ciclo da borracha (PARANÁ et al., 2006). Pacientes infectados por este genótipo são mais velhos (média etária de 45,1 anos), enquanto os pacientes portadores do genótipo III são mais jovens (média etária de 32,8 anos) (PARANÁ et al., 2006).

Em áreas endêmicas de hepatite B, a infecção pelo HDV representa grave problema de saúde pública (FONSECA, 1993; BRAGA et al., 2001), determinando hepatite fulminante, além de piorar a evolução da hepatite crônica, potencializando a rápida progressão para cirrose hepática, fatos estes comumente observados na Amazônia ocidental brasileira (BRAGA et al., 2001).

O estado de portador crônico do HBV (HBsAg positivo) constitui-se no principal fator epidemiológico para a propagação do HDV, o que ocorre, por exemplo, entre as populações nativas da Amazônia brasileira, peruana e venezuelana e em determinadas regiões do continente africano (FONSECA, 1993).

A influência marcante do HDV na morbidade e mortalidade desta população é facilitada pela intensa circulação do HBV em idades precoces, com conseqüente risco elevado de desenvolvimento de estado de portador crônico, estando o HDV fortemente associado a surtos familiares de hepatite fulminante e casos de doenças crônicas do fígado em indivíduos com menos de vinte anos de idade (FONSECA et al., 1994).

Acredita-se que interações complexas, particulares e ainda desconhecidas da região, entre o ambiente, o agente e o hospedeiro e condições ambientais, sociais, culturais, além de fatores genéticos em sua população, contribuam para a circulação

viral do HDV e possam ser determinantes da gravidade da infecção e da manutenção da transmissão (BRAGA, 2014; FONSECA, 1993).

Em determinadas áreas do norte da América do Sul, a exemplo da Amazônia brasileira e venezuelana, a transmissão do HDV parece ocorrer por exposição inaparente, principalmente relacionada com efrações da pele por picadas de insetos ou através das mucosas. Também existem evidências de transmissão sexual (KORSMAN et al., 2014; FONSECA, 1993).

1.4 HISTÓRIA NATURAL DA DOENÇA

A Hepatite Delta é reconhecida por produzir uma forma grave de hepatite. A hepatite aguda ocorre após um período de incubação de cerca de 45 a 180 dias (MYLLEY et al., 1982). O homem é o reservatório natural, mas chimpanzés e *Marmota monax* infectados pelo vírus B também podem ser infectados pelo HDV (FONSECA, 1993).

Apresenta duas fases: Pré-ictérica e Ictérica: A fase pré-ictérica é caracterizada por muitos sintomas inespecíficos como fadiga, letargia, anorexia ou náusea e pelo padrão de marcadores bioquímicos, como elevação da atividade da AST e da ALT (PASCARELLA & NEGRO, 2010).

A fase ictérica, que nem sempre é observada, é caracterizada por elevação dos níveis séricos de bilirrubinas (PASCARELLA & NEGRO, 2010). Apenas 20% dos casos evoluem com icterícia e em aproximadamente 0,2% destes a doença assume caráter fulminante, com alta letalidade (MYLLEY et al., 1982).

Há três formas de infecção pelo HDV: Coinfecção aguda HBV/HDV (infecção simultânea), superinfecção aguda HBV/HDV (infecção pelo HDV de um indivíduo cronicamente infectado pelo HBV) e a infecção crônica HBV/HDV (PASCARELLA & NEGRO, 2010), conforme figura 4.

	COINFEÇÃO	SUPERINFEÇÃO
Resultado da infecção pelo HBV	Aguda: Recuperação <i>clearance</i> sorológico	Crônica: Infecção geralmente persistente
Marcadores HBsAg	Positivo, inicial e transitório	Positivo e persistente
Anti-HBc IgM	Positivo	Negativo
Anti-HBs	Positivo na fase de recuperação	Negativo
Resultado da infecção pelo HDV	Aguda: Recuperação com <i>clearance</i> sorológico (5% evoluem para a cronicidade)	Aguda ou crônica: Geralmente persistente (80% progridem para a cronicidade).
Marcadores HDAg sérico	Inicial e de curta duração	Inicial e transitório, não detectável tardiamente.
HDAg hepático	Positivo e transitório	Positivo, pode ser negativo em estágio tardio.
HDV-RNA sérico	Positivo, inicial e transitório	Positivo, inicial e persistente.
Anti-HDV	Fase aguda tardia, baixos títulos	Aumenta rapidamente, altos títulos.
Anti-HDV IgM	Positivo, pentamérico transitório	Aumenta rapidamente, altos títulos, monomérico.

Figura 4. Comparação entre as características clínicas da infecção pelo HDV em grupos de coinfeção e superinfecção. Adaptado de HSIEH et al., 2006.

A coinfeção HBV/HDV resulta em hepatite B/D aguda, que é clinicamente indistinguível da hepatite B aguda clássica. A eliminação do HBV leva a eliminação também do HDV (CRAWFORD & LIU, 2010). Assim, a coinfeção aguda HBV/HDV leva a completa recuperação em mais de 90% dos casos (Figura 5), mas pode cursar com hepatite aguda grave, com risco de curso fulminante (RIZZETTO, 2000).

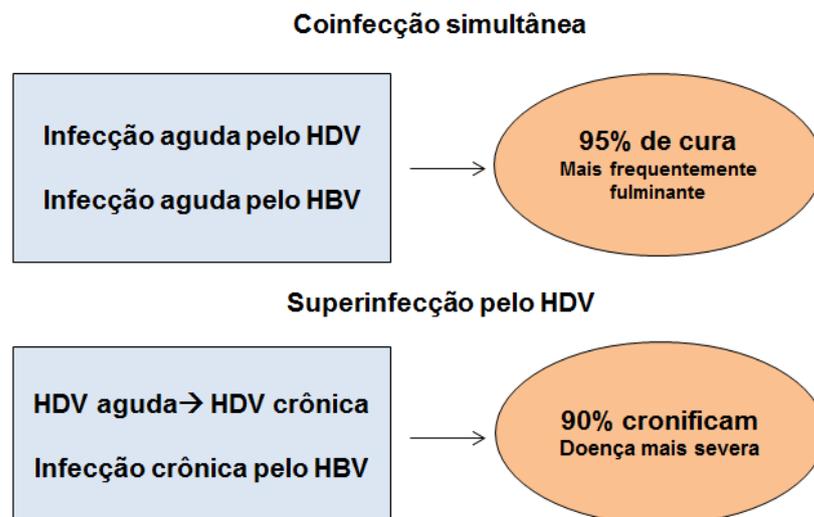


Figura 5. Comparação do curso do HDV na coinfeção e na superinfecção, em pacientes com HBV/HDV. Adaptado de GRABOWSKY & WEDEMEYER, 2010.

Na figura 6, estão listados os fatores de risco para coinfeção e superinfecção:

Coinfeção aguda HBV/HDV	Superinfecção HBV/HDV
<ul style="list-style-type: none"> • Transfusões de sangue e hemoderivados; • Usuários de drogas injetáveis; • Tatuagens; • Ato cirúrgico em áreas endêmicas; • Profissionais da saúde; • Promiscuidade sexual e • Transmissão vertical (sempre relacionada à infectividade pelo HBV). 	<ul style="list-style-type: none"> • Usuário de drogas injetáveis; • Prisioneiros; • Hemofílicos; • Pacientes hemodializados; • Pacientes institucionalizados; • Profissionais de saúde; • Homossexuais; • Prostitutas; • Residentes em áreas endêmicas; • Contato familiar e • Neonatos.

Figura 6. Fatores de risco na coinfeção aguda (HBV/HDV) e de superinfecção pelo HDV em portadores de HBV. Adaptado de FONSECA, 2002.

Os níveis de ALT e AST são persistentemente elevados na maioria dos pacientes (PASCARELLA e NEGRO, 2010). Muitos estudos têm demonstrado que a infecção por HDV está associada com doença hepática grave e progressiva. Em Turin, 41% dos 75 pacientes com HBV/HDV sem cirrose na biópsia inicial desenvolveram cirrose dentro de 2 a 6 anos de seguimento (SMEDILE & RIZZETTO, 2011).

O *clearance* do HDV ocorre espontaneamente em uma minoria dos pacientes HBsAg crônicos com superinfecção HBV/HDV (RIZZETTO, 2000; WEDEMEYER, 2011), já que o HDV encontra nos hepatócitos uma antigenemia pré-existente do HBV, condição ideal para uma multiplicação de maneira explosiva, com dano hepático maior (SMEDILE et al., 1982).

A superinfecção por HDV em um portador crônico do HBsAg pode se manifestar como hepatite aguda severa em portador de HBV previamente não

reconhecido ou como exacerbação da hepatite crônica preexistente. A superinfecção pelo HDV pode ser dividida em três fases:

- Fase aguda, com replicação ativa do HDV e supressão do HBV com altos níveis de ALT;
- Fase crônica, que cursa com diminuição do HDV e reativação do HBV com níveis moderados de ALT;
- Fase tardia, com desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular, causado pela replicação de ambos os vírus ou resulta em remissão, com marcada redução de HBV e HDV (CRAWFORD & LIU, 2010; WU et al., 1995, a).

A forma fulminante, que pode ocorrer especialmente em situação de superinfecção, é mais frequentemente observada na Hepatite Delta do que na Hepatite B isolada (SMEDILE et al., 1982) e se caracteriza por uma necrose maciça de hepatócitos, que leva à falência hepática e morte em 80% dos pacientes, a menos que um transplante de urgência seja realizado (PASCARELLA & NEGRO, 2010). Abaixo, os padrões sorológicos dos tipos de infecção pelo HDV. Figura 7.

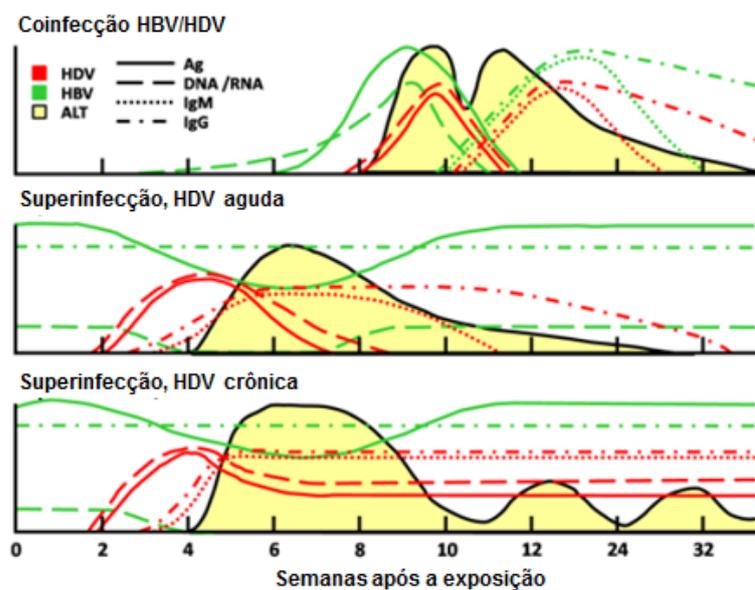


Figura 7. Padrões Sorológicos dos tipos de infecção pelo HDV. Níveis de expressão do antígeno, DNA ou RNA IgM e IgG para ambos HDV e HBV e ALT (adaptado de PASCARELLA & NEGRO, 2010).

No Amazonas, uma forma fulminante de Hepatite Delta, acometendo principalmente crianças, foi documentada e ficou conhecida como Febre Negra de Lábrea (BOSHELL, 1965), e foi responsável por casos fatais de hepatite, associada à degeneração gordurosa aguda difusa nos hepatócitos (degeneração moruliforme) e necrose coagulativa maciça. Estas alterações teciduais provavelmente decorrem de uma ação citopática do HDV (ANDRADE et al., 1992), podendo estar associadas também, ao genótipo de HBV e HDV (CRISPIM et al., 2014)

A infecção crônica pelo HDV leva a doença hepática mais grave do que a monoinfecção pelo HBV e está associada com aceleração do desenvolvimento da fibrose e aumento do risco de Hepatocarcinoma, além de descompensação precoce da cirrose (WEDEMEYER, 2010; RIZZETTO, 2009; UZUNALOMOGLU et al., 2001; RIZZETTO, 2000; FATTOVICH, 1987). A cirrose desenvolve-se em mais de 70% dos casos, 15% dos quais em um a dois anos, e pode manter-se estável durante anos (ROSINA et al., 1999).

O Carcinoma Hepatocelular (CHC), que antes era considerado um evento raro no decurso da doença pelo HDV, desenvolveu-se em 42% dos doentes com cirrose por HDV na Grécia, em 12 anos de seguimento (HADZIYANNIS, 1997).

A replicação do HDV está associada a um aumento na acetilação da histona H3, o que leva a um aumento da expressão do gene Clustering que, além de garantir a sobrevivência e infectividade do HDV, tem significativo papel na carcinogênese (LIAO et al., 2009).

Os mecanismos de transmissão do HDV são os mesmos do HBV: Via parenteral, contato com sangue contaminado, efrações da pele, relações sexuais e raramente a transmissão perinatal (FONSECA, 1993), com diferenças de formas de transmissão de acordo com o local. Na Itália, os principais fatores de risco têm sido atribuídos à promiscuidade sexual, tratamentos de beleza e uso de drogas injetáveis (MELE et al., 2007). Um estudo mostrou uma alta prevalência de Hepatite Delta em um coorte com usuários de drogas intravenosas, com 50% dos casos HBsAg positivo, em pacientes anti-HIV-positivo (KUCIRKA et al., 2010).

Na América do Sul, principalmente na Venezuela, a presença constante de soluções de continuidade da pele ocasionadas pelo *Sarcoptes scabiei* (escabiose) ou provocados por insetos, facilitariam a transmissão do HDV (HADLER et al., 1984).

Na Amazônia brasileira, especificamente na Amazônia Ocidental, o hábito cultural de seus habitantes de compartilharem em família utensílios de uso doméstico (copos, talheres, etc.) e objetos de higiene pessoal (escovas de dente, lâminas de barbear, etc.) pode favorecer a disseminação do vírus D (FONSECA, 1993), como favorece a do HBV.

Uma pesquisa realizada no Acre mostrou que a transmissão intrafamiliar do HBV é observada quando há pelo menos um portador crônico do HBV na família e uso compartilhado de escovas de dente entre os contatos domiciliares. Além disso, a análise do genótipo confirmou transmissão intrafamiliar. (LOBATO et al., 2006)

Com relação entre a infecção pelo HDV e o grupo etário, tem-se observado uma maior prevalência em crianças e jovens, na Amazônia brasileira. A idade média nesta região atinge 23,2 anos de idade, chamando a atenção ao grupo de pacientes com cirrose hepática pelo HDV, cuja faixa etária média é de 25,7 anos (FONSECA, 1993).

1.5 DIAGNÓSTICO DA HEPATITE DELTA

A Hepatite Delta deve ser investigada sempre que um paciente com infecção crônica pelo vírus da Hepatite B (HBV) apresentar doença fulminante ou progressiva, sendo esta progressão mais rápida do normal (FARCI, 2003), e em todos os portadores do HBV que habitam em região endêmica desta Hepatite, como é a Região da Amazônica Ocidental.

O diagnóstico laboratorial envolve exames específicos, como marcadores sorológicos, exames de biologia molecular e histopatológico (biópsia hepática). Dentre os exames gerais que auxiliam na caracterização da doença, o hemograma

completo, ALT/TGP, AST/TGO, Bilirrubina total e frações, proteínas séricas, fosfatase alcalina, ferro sérico e ultrassonografia de abdome são solicitados para todos os pacientes com suspeita clínica de hepatite.

As aminotransferases (ALT/TGP e AST/TGO) são marcadores sensíveis de lesão do parênquima hepático, porém não são específicas para nenhum tipo de hepatite. A elevação da ALT/TGP geralmente é maior que da AST/TGO e já é encontrada durante o período prodrômico, Níveis mais elevados de ALT/TGP quando presentes não guardam correlação direta com a gravidade da doença (Manual de hepatites virais do Ministério da Saúde, 2005).

Dentre os específicos, para se confirmar o diagnóstico de HDV podem ser realizados: Exame sorológico, o estudo histopatológico e imuno-histoquímico para HDAg no fragmento hepático e métodos moleculares (hibridização, PCR, PCR-RT), para a detecção de HDV-RNA sérico (PASCARELLA & NEGRO, 2010).

1.6 SOROLOGIA PARA HDV

Muitos consensos sugerem que todos os pacientes com HbsAg-positivo devem ser testados para anticorpos anti-HDV (European Association for the Study of the Liver, 2009) (Figura 8).

A interpretação dos marcadores sorológicos é feita da seguinte forma:

- HDAg: Existe controvérsia sobre a utilidade deste marcador na detecção de hepatite delta. Segundo alguns autores, a antigenemia permite o diagnóstico em amostras de soro obtidas durante a primeira semana da doença. Para outros, o HDAg é marcador inconstantemente detectado no soro, especialmente na superinfecção (Resolução SES- MG Nº 2019/2009).

<p>HDAg</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marcador sorológico de infecção aguda precoce • 26% na coinfeção aguda (HBV/HDV) • Marcador de tecido hepático: Fase aguda, fulminante e crônica <p>Anti-HDV IgM</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marcador de infecção aguda • Transitório e limitado nas formas agudas • Reativo por longo tempo (formas crônicas) • 78% positivo nas hepatites crônicas • Altos títulos: Infecção ativa persistente • Marcador excelente, induzindo doença • Marcador na resposta antiviral (tratamento) <p>Anti-HDV IgG</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aparecimento tardio nas formas agudas • Altos títulos ($>10^3$) na cronicidade • Altos títulos ($>10^3$), replicação viral • Associado ao anti-HBs e/ou anti-HBc, infecção passada <p>HDV-RNA</p> <ul style="list-style-type: none"> • Expressão intra-hepática do HDAg • Marcador de replicação na fase aguda • Marcador de replicação na fase crônica • Utilizado como controle de tratamento
--

Figura 8. Marcadores etiológicos do vírus delta e seus significados. Adaptado de Fonseca, 2002.

- **Anti-HDV IgM:** Este anticorpo aparece na fase aguda da doença. Serve para o diagnóstico e para monitorizar os pacientes submetidos à terapia com Interferon, uma vez que desaparecem quando a doença é erradicada e persistem na doença ativa. Constituem os marcadores mais estáveis e são detectados antes do anti-HDV IgG. Os níveis de anti-HDV IgM estão relacionados com o grau histológico de atividade inflamatória e com a atividade bioquímica da doença (AST e ALT) (WRANKE et al. 2014). Existe forte correlação entre o anti-HDV IgM, a presença de HDV-RNA no soro e de HDAg no núcleo dos hepatócitos.
- **Anti-HDV IgG:** Este anticorpo é marcador de infecção passada e imunidade, aparecendo no soro em torno de 12 semanas. Altos títulos são detectados ($>10^3$) na cronicidade e na replicação viral. Anti-HDV IgG associado ao anti-HBs e anti-HBc indicam infecção passada, com cura.

- Elevação persistente ou intermitente de ALT/AST (exceto nos casos de ALT normal com doença hepática avançada) (Resolução SES- MG Nº 2019/2009).
Figura 9.

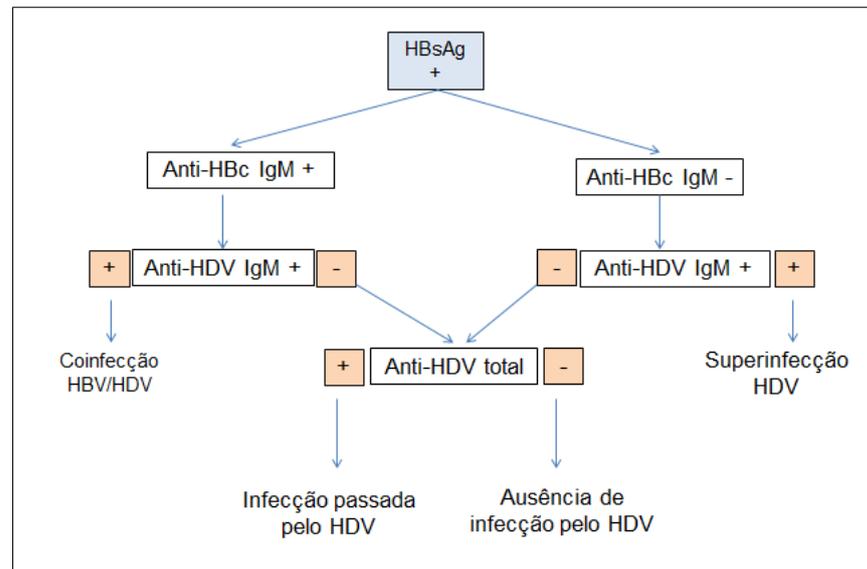


Figura 9. Fluxograma para o diagnóstico da infecção aguda pelo HDV (+) positivo; (-) negativo. (FONSECA, 2002).

A Hepatite Delta deve ser confirmada por detecção do HDV-RNA. Contudo, anticorpos anti-HDV podem não ser identificados após a recuperação da infecção. (WEDEMEYER, 2011). A presença do HDAg no soro é um fato incomum nas formas crônicas de Hepatite Delta, enquanto nas formas agudas e fulminantes este antígeno foi detectado em 35% e 20%, respectivamente (FONSECA, 1993). A persistência da fração IgM do anti-HDV no soro dos pacientes que desenvolvem uma forma aguda, indica uma tendência à cronicidade, com evolução para cirrose (ARAGONA et al., 1987).

Nas formas crônicas de hepatite D, o diagnóstico sorológico baseia-se na detecção da fração IgM do anti-HDV ou se a IgG do anti-HDV alcançar altos títulos (1 título > 1/100.000) e na confirmação da presença do HDAg no tecido hepático (NEGRO e RIZZETTO, 1995). O HDV-RNA persistentemente positivo no soro no estágio agudo de infecção indica a progressão para a cronicidade em portadores do HBsAg com infecção aguda D (FONSECA, 1993). A quantificação do HDV-RNA é

oferecida por alguns laboratórios. Contudo, não há evidências de que os níveis de HDV-RNA se correlacionem com qualquer marcador clínico de atividade ou com o estágio de doença hepática (ZACHOU et al., 2006).

Se os testes sorológicos para HDV-RNA forem positivos, estão indicados a graduação e o estadiamento da doença hepática, além do monitoramento para Carcinoma Hepatocelular. Além disso, deve-se também considerar a possibilidade de terapia antiviral que depende da quantificação do HDV-RNA para ser utilizada (WEDEMEYER, 2011). Na figura 10, verificam-se os perfis sorológicos nas diversas fases da infecção:

Superinfecção aguda pelo VHD em portadores do VHB	
<i>Perfil tipo 1 (fase inicial de infecção do VHD):</i>	
a)	Perfil sorológico do VHB (HBsAg, HBeAg ou anti-HBe, anti-HBc IgG)
b)	Perfil sorológico do VHD (HDAg, HDV-RNA)
<i>Perfil tipo 2 (fase tardia de infecção pelo VHD):</i>	
a)	Perfil sorológico do VHB (HBsAg, HBeAg ou anti-HBe, anti-HBc IgG)
b)	Perfil sorológico do VHD (Anti-HD IgG, anti-HD IgM, HDV-RNA)
<i>Perfil tipo 3</i>	
a)	Perfil sorológico do VHB (HBsAg, anti-HBc IgG)
b)	Perfil sorológico do VHD (Anti-HD IgG, anti-HD IgM, HDV-RNA)
<i>Perfil tipo 4 (atípico)</i>	
a)	Perfil sorológico do VHB (HBsAg indetectável temporariamente*, anti-HBs)
b)	Perfil sorológico do VHD (HDAg, HDV-RNA)
* Supressão temporária do HBsAg (soro) na superinfecção aguda pelo VHD	

Figura 10. Perfil sorológico da superinfecção aguda pelo HDV em diferentes padrões sorológicos de portadores do HBV (FONSECA, 2002).

1.7 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Se a infecção é confirmada por métodos sorológicos, o próximo passo é avaliar o grau e estágio da doença hepática, por meio do estudo histopatológico, para determinar se o paciente irá se beneficiar de um potencial tratamento (PASCARELLA & NEGRO, 2010; WEDEMEYER & MANNIS, 2010).

O exame histopatológico do tecido hepático mostra necrose celular e inflamação em diversos graus. Mesmo experimentos *in vitro* têm demonstrado efeito

citopático direto do HDV. Alterações *in vivo*, como a presença de vários auto-anticorpos no soro de pacientes, sugere dano hepático mediado pelo sistema imunológico. As alterações patológicas são limitadas ao fígado (PASCARELLA e NEGRO, 2010) e a detecção de HDAg nos hepatócitos é possível em somente 50% dos pacientes cronicamente infectados, por 10 anos ou mais (WU et al., 1995).

O aspecto histológico da infecção simultânea HBV/HDV mostrou ser mais severa do que a infecção isolada pelo HBV, em infecção experimental em chimpanzés (DIENE et al., 1990). A superinfecção HBV/HDV acarreta alterações histológicas mais severas do que as observadas em qualquer outro tipo de hepatite viral (DIENES et al., 1990). Como a replicação de HBV é fortemente reprimida pela presença de HDV, acredita-se que o dano hepático induzido pelo HDV é maior do que aquele causado exclusivamente pelo HBV (PASCARELLA e NEGRO, 2010).

Na forma fulminante de hepatite D, de ocorrência nos países tropicais, observou-se no tecido hepático uma marcante esteatose microvesicular (HEPCENTRO, 2010; DESMET e ROSAI, 2004, CASEY et al., 1993) (também conhecida como célula em mórula e degeneração moruliforme) (DESMET & ROSAI, 2004; SNOVER, 1992). Posteriormente, observou-se que tal achado não é exclusivo da superinfecção pelo HDV, tendo sido evidenciado também em outras formas fulminantes de hepatite além de HBV/HDV, como nas hepatites A, B e C (BRAGA et al., 2001) (Figura 11).

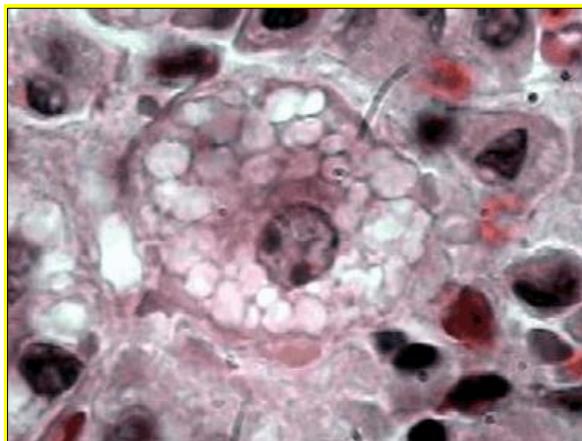


Figura 11. Microfotografia de uma célula em mórula, achado característico da hepatite Delta aguda, H&E, 400X (BRAGA JUNIOR, 2005).

Outro achado das formas agudas e fulminantes de Hepatite Delta é a necrose granulomatosa eosinofílica, induzida por ação citotóxica direta do vírus (FONSECA, 1993; CASEY et al., 1993) (Figura 12). Tanto em modelos animais de chimpanzés quanto em pacientes com quadro de Hepatite Delta Crônica, estudos histológicos têm revelado a presença de infiltrado mononuclear intralobular e alterações eosinofílicas no citoplasma dos hepatócitos, os quais levam à formação de corpúsculos de Councilman (GOVINDARAJAN, S et al., 1986).

Assim, o encontro do HDAg em tecido hepático constitui um elemento auxiliar no diagnóstico das diversas formas clínicas de Hepatite Delta (FONSECA, 1993) identificando-se o antígeno por meio de técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência, tanto no núcleo quanto no citoplasma dos hepatócitos (FONSECA, 2009; FONSECA, 1993).

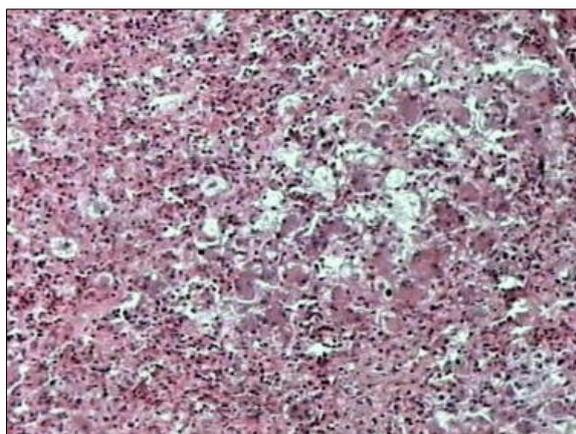


Figura 12. Microfotografia de uma área de necrose submaciça, comprometendo zonas 1, 2 e 3 de Rappaport, em um caso de hepatite Delta fulminante, H&E, 40x (BRAGA JUNIOR, 2005).

1.8 EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA HDV

A observação da expressão do HDAg no tecido hepático, por meio da imunohistoquímica, permite o diagnóstico das diversas formas de apresentação clínica de Hepatite Delta (FONSECA, 2002; RIZZETTO et al., 1983).

Um resultado positivo para a presença de anticorpos anti-HDV, não é necessariamente indício de doença ativa, visto que o HDV-RNA pode desaparecer, indicando recuperação da infecção e, em longo prazo, os anticorpos anti-HDV

também podem desaparecer (WEDEMEYER & MANNNS, 2010). O vírus localiza-se preferencialmente no núcleo dos hepatócitos e pode, ocasionalmente, ser observado no citoplasma, em fases mais avançadas da doença (FONSECA, 2002; BIANCHI & GUDAT, 1994). TAVANEZ et al. (2002) mostrou por meio de técnicas de imunofluorescência, hibridização *in situ*, histopatológico, imuno-histoquímica e cultura celular, que ribonucleoproteínas do HDV mudam continuamente entre o núcleo e o citoplasma.

Na ausência de HDV-RNA, ambas as formas do antígeno delta são retidos no núcleo, enquanto que na ausência do HDAg, o HDV-RNA é detectado predominantemente no citoplasma. Os autores sugeriram ainda que o RNA do HDV exporta as partículas para o citoplasma, enquanto o HDAg reimporta para o núcleo. Figura 13.

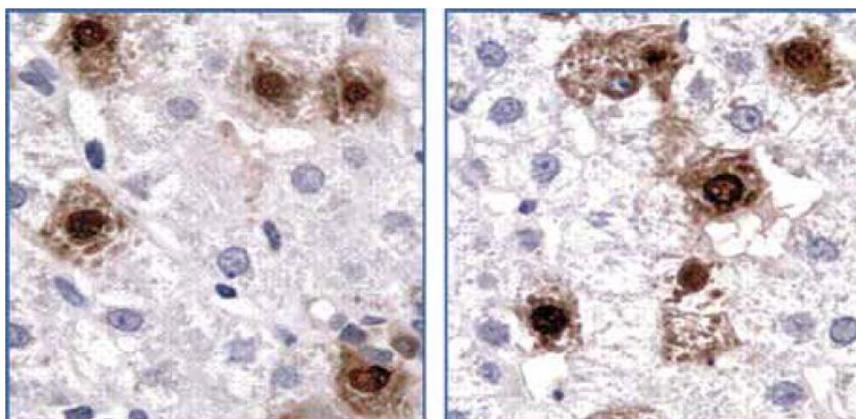


Figura 13. Microfotografia mostrando a expressão acentuada do antígeno Delta em núcleo e citoplasma de hepatócitos de pacientes com infecção crônica pelo HBV e HDV, em caso de hepatite de Lábrea (BRAGA JUNIOR, 2005).

1.9 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE HDV

O advento de técnicas moleculares tem fornecido ferramentas altamente sensíveis para diagnosticar a infecção HDV. A detecção de RNA de HDV por reação em cadeia da polimerase (PCR) é atualmente o mais confiável método de diagnóstico. Este teste molecular supera as limitações da detecção direta de HDAg em soro, por ensaio imunoenzimático ou radioimunoensaio devido ao seqüestro de

antígeno em imunocomplexos por altos títulos de anticorpos circulantes (SMEDILE et al., 2002).

O seu papel tem sido fundamental não só na fase inicial da infecção, antes da soroconversão de anticorpos, mas também para estudar os eventos moleculares durante a hepatite aguda e crônica. A PCR também mostrou ser uma ferramenta sensível para monitorar a eficácia de agentes antivirais, uma vez que pode detectar 10 a 100 cópias do genoma viral no soro (SMEDILE et al., 2002), além de servir para indicar se há falha terapêutica.

Mesmo em fase mais precoce de infecção, pode ser feito o isolamento de partículas de RNA viral contidas no soro, utilizando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (CASEY et al., 1996). A detecção do HDV-RNA tem importância no diagnóstico da Hepatite Crônica pelo HDV e sua presença indica alta infectividade (NEGRO & RIZZETTO, 1995).

1.9.1 Genotipagem do HDV

A genotipagem do HDV é realizada por alguns laboratórios de pesquisa, e pode auxiliar na identificação de pacientes com alto risco de vir a desenvolver doença hepática grave (SU et al., 2006).

Devido à variabilidade do genoma do HDV e à falta de padronização do HDV-RNA, o teste de HDV-RNA pode ser falso-negativo ou o nível de HDV-RNA pode estar abaixo do limite de detecção, em casos de doença flutuante. Nestes casos, o teste HDV-RNA deve ser repetido e, se possível, o anti-HDV IgM deve ser medido (WEDEMEYER & MANNIS, 2010). Os níveis de HDV-RNA não estão associados com a graduação e estadiamento da doença hepática (ZACHOU et al., 2009).

Estudos mostram que na Amazônia ocidental a combinação HBV/F-HDV/3, ditas cepas originárias do Novo Mundo (CASEY et al, 1996) não é invariavelmente patogênica, mas aumenta o risco de desenvolver doença hepática, por razões ainda desconhecidas (CRISPIM et al., 2014)

Sugere-se que a evolução e o prognóstico da infecção pelo HDV dependem essencialmente do genótipo viral (CASEY et al., 1993). Um melhor conhecimento do ciclo de vida do vírus bem como de sua patogênese irá certamente auxiliar na identificação de novas abordagens terapêuticas (PASCARELLA & NEGRO, 2010).

1.10 PREVENÇÃO DA HEPATITE DELTA

Ao contrário do HBV, a triagem de sangue e produtos sanguíneos para HDV é considerada desnecessária, porque HDV não pode se replicar na ausência de HBsAg (HSIEH et al., 2006). Um estudo utilizando modelo camundongo sugeriu que as vacinas de DNA contra HDV podem induzir resposta imune celular significativa, com uma preferência por células Th1, para impedir HDV superinfecção (Huang et al., 2000).

A transmissão em idade precoce leva a um grande número de portadores crônicos, com maior possibilidade de evoluir para cirrose hepática antes dos 30 anos e maior risco de desenvolver CHC. A base da prevenção da Hepatite Delta é a prevenção da Hepatite B.

A partir de 1991 e 1992 o "Advisory Committee on Immunization Practices" do "Centers for Disease Control (CDC)" e o "Committee on Infectious Diseases" da Academia Americana de Pediatria passaram a recomendar a vacinação para crianças e adolescentes contra a hepatite B. Sabe-se que a única maneira prática de interromper a transmissão do HBV consiste na vacinação de todos os indivíduos antes da exposição ao vírus, o que coloca a população infantil como o alvo principal desta estratégia.

Atualmente, a recomendação é de vacinar todos os indivíduos antes da exposição o que significa vacinar todas as crianças e adolescentes e todos os seguintes grupos de risco: Pessoas que trabalham na área de saúde, pacientes em hemodiálise, pacientes hemofílicos, pessoas que fazem uso de drogas injetáveis, homossexuais ou bissexuais com múltiplos parceiros, heterossexuais masculinos ou femininos com múltiplos parceiros, indivíduos institucionalizados, contatos domiciliares ou parceiros sexuais de indivíduos HBsAg positivos, incluindo contatos

familiares de crianças adotadas HBsAg positivas e viajantes para áreas endêmicas. Assim, a implantação de rigorosas medidas de controle por meio de vacinação para HBV o mais precoce possível é necessária. (SAÚDE TOTAL, 2015)

1.11 TRATAMENTO DA HEPATITE DELTA

A infecção crônica HBV/HDV é talvez a mais intrigante e difícil de tratar entre as hepatites virais humanas, além de ser umas das mais negligenciadas doenças no mundo (BRAGA et al., 2014). A gravidade dos quadros fulminantes da hepatite crônica pelo HDV e a singularidade do HDV tornam esta doença um alvo difícil para a terapia antiviral (RIZZETTO et al., 1997).

O PCR é o método mais adequado para avaliar a replicação viral no sangue, avaliando a eficácia do tratamento. Valores acima de 100.000 cópias/mL são indicativos de replicação, enquanto que indivíduos com valores abaixo desse valor são considerados portadores inativos. (HEPCENTRO, 2015)

Apenas o Interferon-alfa (IFN- α) e o Interferon peguilado (Peg IFN- α) mostraram-se benéficos no tratamento da Hepatite Delta. Outros medicamentos não mostraram qualquer benefício neste tipo de hepatite (FARCI, 2003).

O Peg IFN- α é um tipo de interferon modificado, com novas características farmacológicas, como a de poder ser aplicado apenas uma vez por semana, mantendo constante seu nível no sangue, sendo por isso o mais utilizado atualmente (Hepcentro, 2015). Comparando os tipos de Peg IFN- α , um estudo recente não evidenciou diferença significativa entre o Peg IFN- α 2a e Peg IFN α 2b para a redução da taxa de resposta virológica (BAHCECIOGLU, 2015).

Apesar dos avanços no tratamento, como uma dose semanal do medicamento, o Peg IFN- α é ainda insuficiente para curar a maioria dos pacientes crônicos da hepatite Delta: Em um estudo prospectivo, apenas 21% dos pacientes apresentaram negatividade do HDV-RNA e 26% apresentaram resposta bioquímica

(NIRO et al., 2006). O genótipo parece influenciar na resposta ao tratamento, já que o HDV de genótipo I, por exemplo, apresenta uma resposta reduzida ao Peg IFN- α (KORSMAN et al., 2014).

Em suma, os tratamentos atuais incluem Peg IFN- α e transplante de fígado, tendo este último possibilidade de cura. Mais estudos são necessários para desenvolver melhores estratégias de tratamento para esta doença desafiadora (ALVARADO-MORA et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A Hepatite D é pouco conhecida e muito pouco discutida no Brasil e no exterior, apesar de sua importância e tendência a comportamento agressivo, especialmente na região amazônica ocidental. Além disso, literatura médica mundial apresenta poucos dados a respeito da avaliação e graduação histológica e imuno-histoquímica das biópsias hepáticas provenientes de pacientes portadores do vírus Delta. Em geral, os achados histopatológicos são descritos como inespecíficos e o estudo imuno-histoquímico, pouco utilizado. Portanto, faz-se necessário um estudo descritivo e comparativo de casos de coinfeção HBV/HDV, com casos de infecção exclusiva pelo HBV, no intuito de preencher esta lacuna na história natural do vírus Delta. Poderão existir benefícios futuros no tratamento de pacientes com hepatite D, na dependência dos resultados deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar as características histopatológicas de pacientes portadores de Hepatite Delta, em acompanhamento no Ambulatório Especializado de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia- CEPEM.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o infiltrado inflamatório, grau de fibrose e depósito de ferro intra-hepatocitário, por meio de coloração de rotina (H&E) e colorações especiais (Tricrômio de Gomori, Picrosírus, Reticulina, PAS, Perls e Orceína);
- Descrever os achados imuno-histoquímicos, quanto a presença de HDAg, HBsAg e HBcAg;
- Correlacionar os resultados obtidos com achados clínicos, ultrassonográficos e laboratoriais de rotina (bioquímicas e sorológicas)
- Correlacionar os achados histológicos com os genótipos do HBV e HDV encontrados nesta casuística.

4. METODOLOGIA

4.1 MODELO DE ESTUDO

Trata-se de estudo prospectivo, descritivo e por amostragem, de uma série de casos de pacientes com diagnóstico de hepatite crônica da demanda espontânea, no período de maio de 2011 a maio de 2015, cujas etapas estão resumidas na Figura 14.

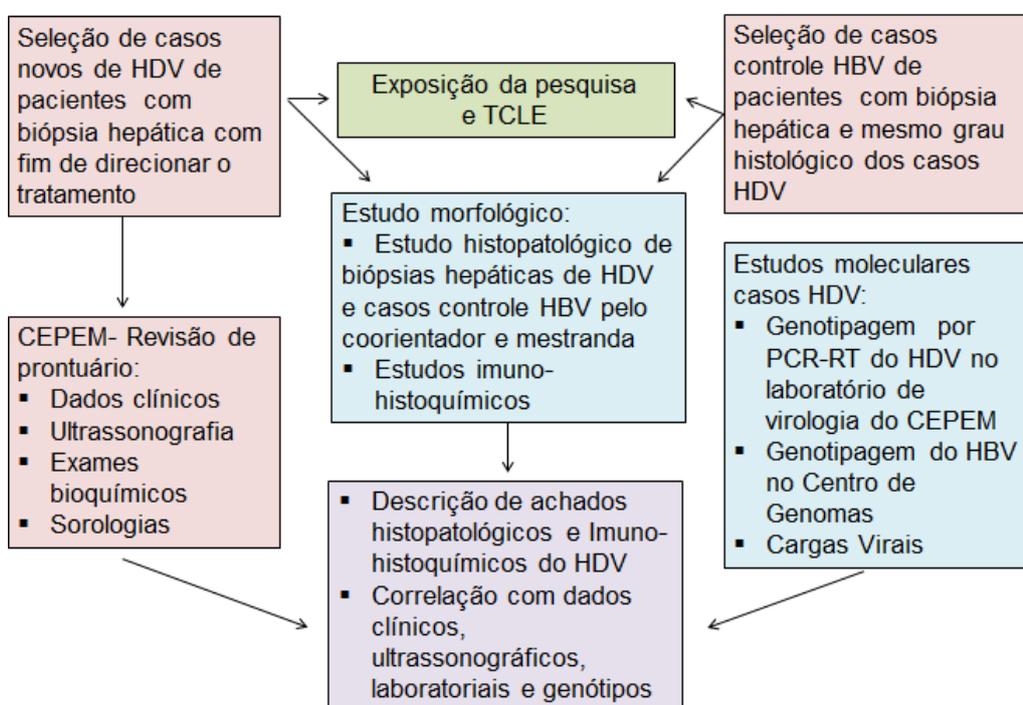


Figura 14. Fluxograma resumido da metodologia deste estudo.

4.2 LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado com pacientes no Ambulatório Especializado de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia- CEPEM, localizado na cidade de Porto Velho, Estado de Rondônia.

4.3 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Até o momento, encontram-se cadastrados no Ambulatório de Hepatites Virais 6.498 pacientes, dos quais 180 são portadores de Hepatite Delta e estão em tratamento cerca de 40 pacientes. Foram selecionados 24 casos novos, pré-tratamento e que precisavam do estudo histopatológico para direcionar a terapêutica, para a realização desta pesquisa.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão nesta pesquisa:

- Pacientes de ambos os sexos, maiores ou iguais a 18 anos e menores ou iguais a 59 anos;
- Evidência sorológica de infecção pelo HBV (HbsAg positivo) e pelo HDV (anti-HDV positivo e HDV-RNA positivo);
- Qualquer genótipo de HBV e HDV;
- Pacientes cursando com elevação flutuante ou persistente de aminotransferases em pelo menos duas ocasiões nos últimos 3 meses;
- Doença hepática compensada;
- Pacientes que tenham assinado o Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I), conforme preconizado pela Resolução nº 466/12 do CNS, de 12/12/2012.

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram considerados critérios de exclusão desta pesquisa:

- Pacientes menores de 18 ou com mais de 59 anos;
- Pacientes grávidas;
- Pacientes indígenas e demais grupos vulneráveis, conforme a Resolução nº 466/12 do CNS;
- Pacientes em uso de Interferon Peguilado nos últimos 6 meses;

- Pacientes submetidos a terapias antineoplásicas ou imunomoduladoras nos últimos 5 anos antes do início do estudo;
- Pacientes com anti-HAV IgM positivo;
- Pacientes com coinfeção pelo HIV e/ou coinfeção pelo HCV;
- Pacientes com doenças autoimunes;
- Pacientes portador de doença alcoólica hepática e/ou exposição a toxinas;
- Pacientes com consumo etílico maior que 60g/dia;
- Pacientes com história de cirrose hepática descompensada;
- Pacientes com qualquer outra doença descompensada em curso;
- Pacientes hemofílicos;
- Pacientes com doença tireoidiana descompensada;
- Pacientes com distúrbios psiquiátricos considerados graves (avaliação psiquiátrica)
- Pacientes com insuficiência renal crônica, apresentando creatinina $> 1,5$ vezes e limite superior da normalidade e/ou *clearance* $< 40\text{mL}$.
- Pacientes leucopênicos e neutropênicos, com leucócitos $> 1.500/\text{mm}^3$ com polimorfonucleares < 1500 células/ mm^3 ;
- Pacientes com alterações nos fatores de coagulação, com plaquetas $< 90.000/\text{mm}^3$;
- Pacientes portadores de anemia (hemoglobina $< 11\text{g}\%$);
- Hipoalbuminemia;
- Pacientes com hiperglicemia $> 150\text{mg}\%$ ou Diabetes Mellitus descompensado;
- Pacientes portadores de insuficiência renal crônica;
- Pacientes portadores de neoplasia maligna de qualquer tipo, exceto Carcinoma Basocelular, pois não gera metástases;
- Pacientes com história de perda da acuidade visual e/ou retinopatia grave;
- Pacientes que tenham usado droga endovenosa e/ou inalatória, nos últimos 3 (três) meses que precederam aos exames;
- Pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de outras patologias que possuam características histológicas que se sobreponham aos da hepatite por HBV/HDV;
- Pacientes com história ou evidência clínica de outras doenças hepáticas concomitantes;

- Pacientes com outras doenças que impeçam cumprir o protocolo estabelecido e
- Pacientes que não forneceram consentimento informado para obedecer às exigências éticas do estudo.

4.4 CONSULTA E EXAMES INICIAIS

Foram utilizadas informações contidas no prontuário, para selecionar aqueles que poderão se beneficiar com o tratamento posterior à biópsia, dependendo do resultado do histopatológico: Indivíduos com infecção crônica (presença de marcadores de virais) que apresentam sinais histológicos de atividade da doença (inflamação, com ou sem fibrose hepática) podem ou não apresentar sintomas na dependência do grau de dano hepático (deposição de fibrose) já estabelecido.

Quando apresentam marcador sorológico de replicação, apresentam maior propensão para uma evolução desfavorável, com desenvolvimento de cirrose e suas complicações. Eventualmente, a infecção crônica só é diagnosticada quando a pessoa já apresenta sinais e sintomas de doença hepática avançada, daí a importância de se avaliar o grau da doença através do estudo histopatológico.

Após consulta de rotina no CEPEM, no Ambulatório de Hepatites, os pacientes foram encaminhados para realização dos exames de imagem, bioquímicos e sorológicos, rotineiramente solicitados para avaliar se o paciente apresentava ou não indicação para realização de biópsia.

Depois de feitos os exames, o paciente foi submetido à nova consulta médica, na qual foram avaliados os resultados dos exames supracitados. Nesta consulta, no Ambulatório de Hepatites do CEPEM, foram selecionados pelo médico assistente os casos em que era necessário o resultado da biópsia para direcionar o tratamento.

4.5 BIÓPSIA HEPÁTICA

A biópsia hepática percutânea é um método de se obter um pequeno fragmento de parênquima hepático. Sua simplicidade, segurança e rapidez permitem sua realização em nível ambulatorial. A prática da punção hepática percutânea tem sido bastante difundida para diagnosticar, propor terapêutica, avaliar resultados de tratamento e fazer acompanhamento após transplante em várias doenças hepáticas difusas (STOTLAND, 1996).

A coleta das amostras hepáticas foi realizada dentro da rotina existente no Ambulatório de Hepatites. Como a patologia hepática a ser estudada nesta pesquisa acomete difusamente o parênquima hepático se optou pela realização de biópsia percutânea por agulha grossa, às cegas, correntemente usada em grandes centros para a mesma finalidade (Guidelines on the use of Liver Biopsy in Clinical Practice, 2004).

As amostras foram acondicionadas em formol 10% e encaminhadas para as etapas de preparo histotécnico e microscopia, na Fiocruz de Salvador, Bahia, conforme preconizado pelo Programa Nacional de Hepatites e complementação com estudo imuno-histoquímico. Após sua utilização, as biópsias emblocadas em parafina foram arquivadas e poderão ser utilizadas em pesquisas posteriores.

4.6 TÉCNICAS LABORATORIAIS

Para esta pesquisa, foram utilizados exames de análises clínicas (hematológicos e bioquímicos), sorologias virais, exame anatomopatológico, exame imuno-histoquímico, estudo genotípico para HBV e HDV e respectivas cargas virais.

4.6.1 Técnicas bioquímicas e hematológicas

Foram analisados os exames solicitados de rotina a todos os pacientes em acompanhamento no ambulatório de hepatites, cuja parte técnica foi realizada no laboratório da instituição, quais sejam: Função hepática (TGO/AST, TGP/ALT, GGT,

bilirrubina direta e indireta), coagulograma (plaquetas, TAP), proteínas totais e frações, função renal (uréia e creatinina), ácido úrico, glicemia de jejum, fosfatase alcalina, ferro sérico, perfil lipídico (colesterol total, frações e triglicerídeos) e hemograma completo.

4.6.2 Técnicas sorológicas

Foram analisados os exames solicitados de rotina a todos os pacientes em acompanhamento no ambulatório de hepatites, cuja parte técnica foi realizada no laboratório da instituição, quais sejam: HBsAg, Anti-Hbs, Anti-HBc total, anti-HBc IgM, anti-HBe, HBeAg, anti-HDV, anti-HCV, anti-HAV e anti-HIV 1 e 2.

Foram obtidos 10 ml de sangue total que foi armazenado em tubo seco (sem adição de anticoagulantes) do tipo Vacuteiner®, para exames bioquímicos e sorológicos. Os tubos contendo as amostras foram acondicionadas em banho-maria por um período médio de 20 minutos para estimular a retração do coágulo e, em seguida, passaram por centrifugação específica a 2500 rpm por 15 minutos para que fosse obtido o soro, que foi transferido para outro tubo de estocagem do tipo Eppendorf® e devidamente armazenado no freezer a -20°C até o momento do uso, em exames de detecção de marcadores sorológicos do HBV e HDV. Após sua utilização o soro foi armazenado em freezer a -70°C e, poderá ser utilizado em pesquisas posteriores.

4.6.3 Técnicas Histopatológicas

A técnica histopatológica consistiu de cortes histológicos seriados, corados com a coloração de rotina (hematoxilina e eosina), complementada com cortes corados separadamente pelas seguintes colorações especiais. As técnicas de coloração especial já estão bem estabelecidas, conforme as rotinas do *Armed Forces Institute of Pathology* (LUNA, 1968), sendo os utilizados nesta pesquisa: Hematoxilina e Eosina (H&E), Reticulina de Gomori, PAS com e sem diastase, Picrosirius, Perls e Orceína. São as seguintes:

- PAS (Ácido Periódico de Schiff): No fígado, demonstra o glicogênio, em grânulos, no interior dos hepatócitos e realça a placa limitante nas hepatites crônicas com atividade periportal.
- PAS com diastase: Identifica grânulos de alfa-1-antritripsina no citoplasma dos hepatócitos em pacientes com deficiência da enzima, segundo padrão genotípico PiZZ. Quando existe a deficiência, observa-se grânulos ou glóbulos PAS positivos resistentes à ação da diastase. Isto significa que eles não são constituídos por glicogênio, que é normalmente encontrado no fígado e que são digeridos pela ação da diastase, não permanecendo no tecido em que se usa esta enzima (CRAWFORD & LIU, 2010; DESMET, 2010).
- Reticulina de Gomori: Corante a base de prata, identifica os depósitos de colágeno tipo III (reticulina), corando-as de preto, realçando a arquitetura hepática. As fibras reticulares dão suporte estrutural e elasticidade aos órgãos parenquimatosos.
- Picrosirius: Empregado, principalmente, para análise morfométrica da fibrose nas doenças hepáticas crônicas. A base de Sirius Red e ácido pícrico, este corante identifica fibras colágenas tipo I e tipo III, sob luz polarizada e é importante na avaliação do grau e idade da fibrose (MONTES E JUNQUEIRA, 1991).
- Perls: Identifica depósitos de pigmento férrico em hepatócitos (na hemocromatose primária, na doença hepática alcoólica, na porfiria cutânea tarda, na hepatite C crônica) ou nas células de Kúpffer (sobrecarga férrica secundária) (DESMET, 2010).

4.6.4 Técnica de imuno-histoquímica

Foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica indireta, que consiste na utilização de um anticorpo primário específico para uma determinada proteína e para o anticorpo secundário, uma antiimunoglobulina marcada que reconhece o anticorpo

primário. O corte de tecido é incubado com o anticorpo específico para determinada proteína. Depois de lavado, é incubado com o imunocombinado, que vai se ligar ao anticorpo primário. Em seguida, há a observação por microscopia adequada, dependendo do marcador utilizado.

As amostras distendidas em lâminas silanizadas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool crescente. Quando necessário, foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6, em banho Maria por 30 minutos. Os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio por 20 minutos (bloqueio de peroxidase endógena) e com protein block (Dako®) por 30 minutos para diminuir a probabilidade de marcações de fundo inespecíficas (“background”).

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário em temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente com anticorpo secundário previamente conjugado com a peroxidase HRP. A visualização da reação foi feita utilizando a diaminobenzidina (DAB) da Dako®.

A reação foi acompanhada no microscópico até a revelação, quando produto final da reação apresentou coloração acastanhada, devido à precipitação em determinada região celular em que ocorreu a ligação do antígeno com o anticorpo primário (núcleo, citoplasma ou ambos). Neste momento, foi interrompida a reação retirando-se o anticorpo, lavando as lâminas com água destilada.

Elas foram então mantidas recobertas com água destilada até a contracoloração com hematoxilina de Harris, desidratação em etanol crescente e montagem com Entellan®. Os anticorpos utilizados estão listados na Tabela 1.

Foi utilizado microscópio Axio Skop 2, Carl Zeiss Vision GmbH, com sistema AxioVision 3.1 e microscópio Olympus CX 31, com câmera Canon EOS Rebel SL1, para captura e digitalização das imagens microscópicas de reações imuno-histoquímicas.

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas desta pesquisa.

Proteína	Catálogo	Origem	Recuperação Antigênica	Diluição
Antígeno de superfície do HBV (HBsAg)	Dako® Código B0560	Cabra	Não	1:15000
Antígeno do core do HBV (HBcAg)	Dako® Código em B0586	Coelho	Não	1:250
Antígeno Delta (HDAg)	Instituto Inerm (doação do Dr. Raimundo Paraná, UFBA)	Coelho	Tampão citrato 10mM pH6,0 em banho Maria 90°C por 30 minutos.	1:500

4.6.5 Técnicas Moleculares

4.6.5.1 Técnica de determinação do genótipo do HDV

Extração do RNA do HDV

A extração do RNA HDV foi realizada com o *KitQIAamp®Viral RNA Mini* (Qiagen, Alemanha), utilizando 200 µL de soro, de acordo com as instruções do fabricante através do protocolo spin Viral RNA QIAamp. Após a extração o RNA HDV extraído foi transformada em cDNA e a outra fração foi armazenada a -80 °C.

Transcrição Reversa (RT)

Para a produção de um DNA complementar (cDNA) a partir do RNA HDV foi utilizada uma transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa *Moloney murine leukemia vírus* (M-MLV) (Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA), seguindo instrução do fabricante.

Genotipagem do HDV

Para a caracterização do genótipo do HDV foi utilizado uma Nested-PCR, contendo 10 µL de cDNA em 40 µL de PCR mix com 25 pmol de primers 853IU (5' - CGG ATG CCC AGG TCG GAC C- 3') e 1302OD (5' -GGA TTC ACC GAC AAG

GAG AG- 3') descritos anteriormente em literatura (CASEY et al.,1993; ZHANG et al., 2006) que amplificam um fragmento de 406pb do genoma do HDV correspondente a uma porção do antígeno Delta na primeira PCR. A nested-PCR foi realizada contendo 5 µL do produto da primeira PCR e 45 µL de PCR mix com 25 pmol de primers HDV-E nt) 5'-GAGATGCCATGCCGACCCGAAGAG-3' e HDV-A (nt) 5 -GAAGGAAGGCCCTCGAGAACAAGA-3', mantendo mesmas condições de ciclagem de temperatura (GOMES-GOUVÊA et al., 2008). O resultado das ampliações foi detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Para a determinação do genótipo foi utilizada a técnica RFLP. Foram digeridos 15 µL de *amplicons* no mix de digestão contendo 10U de *Sma*I (Invitrogen®, USA), 1x do tampão da enzima em volume final de 20 uL, posteriormente foi incubada a 30 °C, overnight. Também foram digerido 15 µL de *amplicons* no mix de digestão contendo 10U de *Xho*I (Invitrogen®, USA), 1x do tampão da enzima em volume final de 20 uL e em seguida incubada a 37 °C, overnight. Os fragmentos resultantes da restrição serão analisados por eletroforese em gel de agarose 3% (tabela 2).

Tabela 2. Perfil genotípico da digestão com *Sma*I e *Xho*I para um fragmento de 406pb correspondente ao HDV.

	Tamanho do fragmento da restrição enzimática	
	SMA I (pb)	Xho I (pb)
Genótipo I	225+ 181	388+18
Genótipo II	406 (Não digerido)	85+303+18
Genótipo III	306+135	24+382

(Fonte: MIRSHAFIEE, ARCH IRANIAN MED, 2009. Modificado)

4.6.5.2 Técnica de Quantificação do HDV

Foi realizada por HDV RT-qPCR, no Laboratório de Virologia da FIOCRUZ-RO, seguindo protocolo padronizado por Botelho-Souza, 2014, b.

4.6.5.3 Técnica de Determinação do genótipo do HBV

Para extração de DNA viral a partir de 200 µL de soro, foi usado QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as normas do fabricante. O DNA precipitado foi suspenso em 200 µL de tampão de eluição e armazenado a -20°C até o uso. Para evitar resultado falso-positivo, rigorosos procedimentos propostos para as técnicas de amplificação do ácido nucleico de diagnóstico foram seguidas (KWOK, 1989).

Inicialmente, para a genotipagem do HBV, no Laboratório de Virologia do CEPEM foram utilizados primers específicos seguido de PCR, utilizando-se o protocolo de Santos et al, 2010, para amplificar um fragmento de 741pb do gene S/POL. O DNA amplificado foi purificado com a enzima ExoSap® (GE Healthcare). Posteriormente, as amostras foram enviadas para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento do Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-Bahia, em Salvador.

Para análise das sequências, a qualidade de cada eletroferograma foi avaliada utilizando o software Phred-Phrap (Ewing, 1998) as sequências consenso foram obtidas por alinhamento de ambas as fitas sequenciadas utilizando CAP3 software, disponível em <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>.

As sequências obtidas neste estudo foram genotipadas por reconstruções filogenéticas utilizando sequências referência de cada genótipo do HBV obtido a partir de sequências compreendendo regiões parcialmente codificadoras do gene S / POL, posteriormente foram alinhadas usando Clustal X software (Thompson, 1997) e editado no software SE-AL, disponível em <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>>.

4.6.5.4 Técnica de quantificação do HBV

A quantificação do HBV foi realizada no Centro de Genomas, em São Paulo/SP, por intermédio do convênio daquela instituição com o Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM, utilizando o método PCR em Tempo

Real (“Real Time PCR”)-Taqman. Este teste é utilizado para o monitoramento do tratamento da hepatite B.

A faixa dinâmica de quantificação do Kit é de 1.000.000.000 UI/mL. Contudo, um teste com resultado indetectável não exclui a presença da infecção, pois uma grande quantidade de pessoas pode apresentar infecção crônica sem viremia detectável (MITSUNAGA et al. 2002; LINDH et al., 2001; WEBER et al., 2001).

4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

4.7.1 Análise Histopatológica pela Classificação Metavir

A análise microscópica foi feita pelo coorientador e por esta pós-graduanda, de modo duplo cego, que avaliaram as alterações morfológicas segundo conceitos já bem estabelecidos na literatura (RUGGE et al., 1983; GAYOTTO & ALVES, 2001), no Laboratório de Patologia da Fundação Oswaldo Cruz de Salvador, Bahia.

Foi utilizada na avaliação dos casos desta pesquisa a Classificação Metavir, que avalia a necrose em saca bocado (PMN), necrose lobular (LN) e a atividade inflamatória (A). O Metavir foi primeiro desenvolvido especificamente para pacientes portadores do HCV e é um sistema de classificação semiquantitativo, baseado na avaliação do grau de atividade inflamatória e de fibrose (Vide anexo IV).

A fibrose é avaliada numa escala de 5 pontos no qual 0 é usado para casos sem fibrose; 1 para fibrose portal sem septos; 2 para fibrose com poucos septos porta-porta; 3 para expansão fibrosa portal com numerosos septos, sem cirrose e 4 para fibrose acentuada, caracterizando a cirrose. Essa quantificação permite uma melhor avaliação do grau de fibrose, em comparação a outros protocolos (BEDOSSA & POYNARD, 1996) (Figura 15).

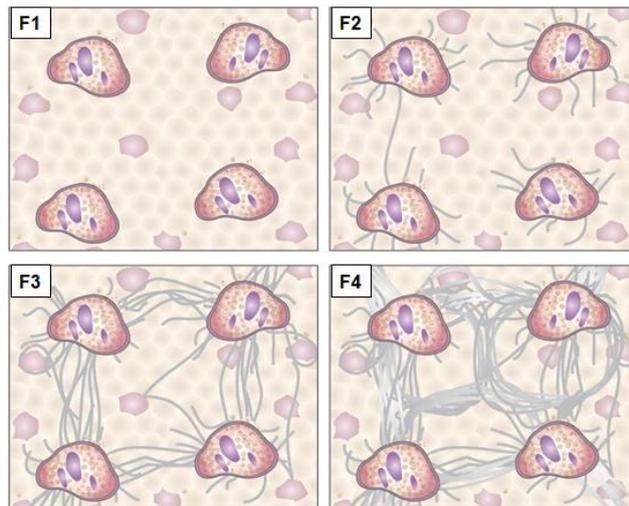


Figura 15. Diagrama de progressão para a fibrose na hepatite crônica. F1: Fibrose portal; F2: Septos fibrosos curtos com poucos septos finos porta-porta; F3: Transição para a cirrose, com septos porta-porta, áreas de regeneração com esboço nodular, em algumas áreas da biópsia por agulha; F4: Cirrose estabelecida. BATTIS-LUDWIG, 1995, adaptado.

A atividade inflamatória é graduada de acordo com a intensidade necroinflamatória (A0 = sem atividade, A1 = atividade leve, A2 = atividade moderada, A3 = atividade severa). (BEDOSSA & POYNARD, 1996). Figura 16.

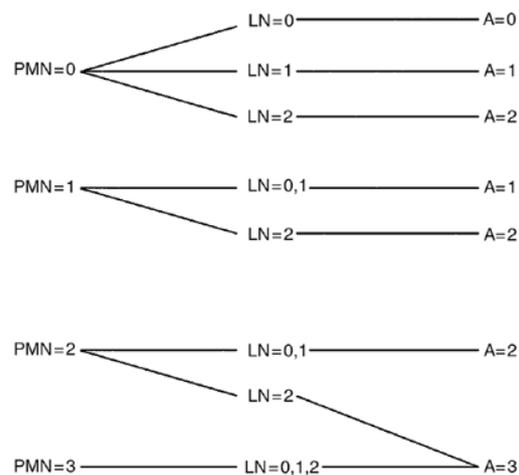


Figura 16. Algoritmo da Classificação Metavir para avaliação da atividade inflamatória. PMN= "Piecemeal necrosis" (Necrose em saca-bocado ou hepatite de interface), sendo 0=nenhuma; 1=discreta; 2=moderada; 3=acentuada. LN= Necrose lobular, sendo 0=nenhuma; 1=discreta; 2=moderada; 3=acentuada. LN= Necrose lobular. (The Metavir Cooperative Study Group. Hepatology, 1996; 24: 289-293)

Abaixo, representação das apresentações morfológicas dos graus de atividade inflamatória segundo o Metavir. Figura 17.

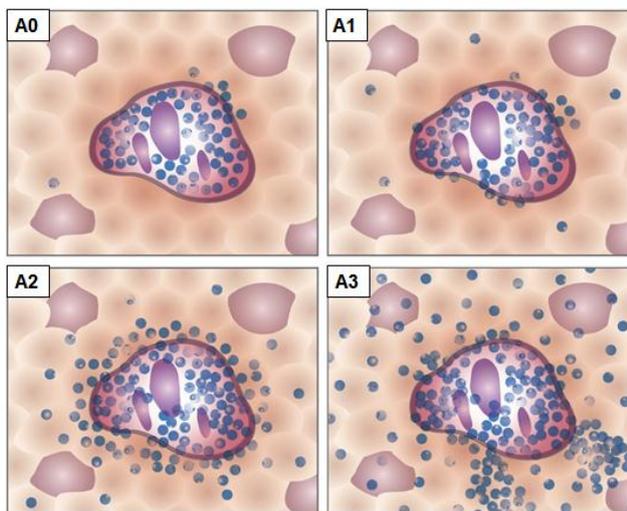


Figura 17. Diagrama de atividade necroinflamatória. A0-A2: Graus de atividade de A0 a A2. Em A3: Necrose confluyente, na forma de necrose em ponte, presente somente na atividade grau 3 (A3). BATTIS-LUDWIG, 1995, adaptado.

A documentação das microfotografias dos cortes histológicos e imunohistoquímica foi realizada utilizando-se o microscópio Axio Skop 2, Carl Zeiss Vision GmbH, com sistema AxioVision 3.1 para captura e digitalização das imagens microscópicas e salvas no formato jpg.

4.7.2 Análise de reações e danos morfológicos

Além da classificação Metavir, os casos foram analisados com base em achados histopatológicos de hepatopatias abaixo, sendo também semiquantificadas (conforme Tabela 3), localização (portal, periportal, perissinusoidal, em torno da veia centrolobular e lobular, quando em todo o lóbulo).

Também se utilizou para a avaliação de algumas alterações morfológicas a classificação em zonas de Rappaport (zonas, I, II ou III de Rappaport), que representam as três porções da estrutura lobular do fígado que podem sofrer necrose devido ao processo inflamatório. Quando necessário foi especificado o padrão de distribuição nos cortes histológicos de tecido hepático (focal, difuso ou em faixa):

- Caracterização e semiquantificação do infiltrado inflamatório
- Lesões celulares reversíveis

- Lesões irreversíveis
- Padrões de fibrose
- Regeneração celular
- Dano vascular

Tabela 3. Forma padronizada para a semiquantificação de variáveis histológicas

Símbolo	Interpretação
-	Ausente
+	Exígua/Discreta: presente em pequena quantidade de células ou em pequena área (1 a 25%)
++	Moderada: presente em um número moderado de células ou em até metade das superfícies de corte examinadas (>25 a 50%) Acentuada/Abundante/Numerosas: presente em numerosas
+++	células ou em mais da metade das superfícies de corte examinadas (> 50%)

4.7.3 Caracterização do infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório varia quanto a constituição e distribuição. Diversas células mediadoras de inflamação podem ser vistas em doenças hepáticas. A presença ou ausência de células inflamatórias e, quando presentes, sua semiquantificação, podem fornecer informações importantes quanto aos mecanismos implicados e sua etiologia.

O infiltrado leucocitário foi discriminado de acordo com o tipo celular (linfócitos, histiócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos), intensidade (discreta, moderada ou acentuada) e local de distribuição (se periportal, lobular, e/ou intrassinusoidal, se com ou sem “spill-over”), conforme a tabela 3, de semiquantificação de variáveis morfológicas acima.

Define-se “Spill-over” como o extravasamento de linfócitos para a interface parênquima-mesênquima do espaço porta, não caracterizando a presença de

necrose em saca-bocados. Avaliada também a presença de hipertrofia e/ou de hiperplasia dos macrófagos especializados do fígado, as células de Küpffer.

4.7.4 Caracterização das lesões células reversíveis

É a avaliação da degeneração hidrópica, acúmulos celulares, como lipídios na esteatose e na degeneração moruliforme, depósito de ferro, colestase e depósito de HBsAg (hepatócitos em vidro fosco). Vide em detalhes no Anexo VII.

4.7.5 Avaliação das lesões celulares irreversíveis e fibrose

As lesões celulares irreversíveis são a necrose hepatocitária e a apoptose. A diferença primordial entre elas é que a necrose leva a uma ruptura nuclear e citoplasmática, com infiltrado inflamatório, enquanto a apoptose é a morte de células isoladas, sem extravasamento do e, portanto, sem inflamação ao redor das células mortas. Histologicamente, elas são menores, com citoplasma denso e eosinofílico e núcleo picnótico e são também conhecidas como corpúsculo de Councilman. Foram semiquantificadas e classificadas quanto à localização. Vide em detalhes no Anexo VIII.

4.7.6 Caracterização da regeneração Celular

A regeneração hepatocitária ocorre após a lesão com morte celular e é feita pelos hepatócitos que resistem a um processo inflamatório necrótico ou são provenientes de células-tronco da medula óssea. Eles proliferam formando nódulos de regeneração, circundados por fibrose.

É caracterizada morfológicamente ora pela presença de hepatócitos com núcleos aumentados de volume, com contornos irregulares, nucléolos evidentes, binucleações, multinucleações (consideramos multinucleação quando observados três ou mais núcleos por hepatócito), ora pela existência de duplicidade de cordões hepatocitários, ora ainda pela transformação pseudoacinar, caracterizada por vários hepatócitos volumosos concentrados, formando estruturas pseudoacinares ou

pseudorrosetas, centralizadas por canálculos pouco dilatados, localizados no interior dos lóbulos hepáticos. Para esta finalidade foi utilizada a coloração reticulina, que realça as fibras de colágeno tipo III.

4.7.7 Caracterização da proliferação ductular e reação ductular

Caracterizada pela proliferação de ductulos, predominantemente na zona marginal do espaço-porta (ROSKAMS et al., 2004). Ocorre raramente, pois apesar de as hepatites possuírem infiltrado portal, poucas vezes é vista agressão aos ductos biliares, achado que pode ser indicativo de severa agressão aos hepatócitos, especialmente com necrose confluyente ou maciça, com “metaplasia ductal” ou como “reação ductular” (Hepcentro, 2015). Também pode ser causada por alguma doença biliar específica como colangite esclerosante, cirrose biliar primária, dentre outras (ROSKAMS et al., 2004).

4.7.8 Caracterização do Dano Vascular

A avaliação dos vasos sanguíneos hepáticos e da resposta parenquimatosa às lesões vasculares também foi avaliada. As lesões hepáticas com dano vascular podem ser causadas por processos degenerativos, necróticos e regenerativos dos hepatócitos, como por exemplo: Obstrução vascular, flebite de veias portais e/ou centro-lobulares, proliferação arterial, atrofia e aproximação de estruturas portais e/ou veias centro-lobulares, devido à necrose com posterior fibrose e retração tecidual.

4.8 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Baseia-se na avaliação dos anticorpos para detecção de antígenos nucleares, citoplasmáticos ou de membranas, através de microscópio óptico. Para este trabalho, foram utilizados: anti-HBs, anti-HBc e anti-HDAg.

4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram registrados em um banco de dados (Microsoft Excel 2010). Análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se métodos padrões de análise. A análise dos dados foi iniciada com descrição estatística simples e testes de significância empregados para validar essas proporções encontradas. Foram calculadas proporções, médias, medianas, desvio padrão e testes de significância para variáveis numéricas.

4.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa será realizada de acordo com os princípios éticos estipulados pela Assembleia Médica Mundial de 1975, do Ministério da Saúde (Resolução nº 466/12 do CNS, de 12/12/2012) e Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia, folha de rosto SISNEP nº 400783, Certificado de Apresentação para Apreciação Ética CAAE nº 0002.0.046.000-11, de 17/06/11.

5. RESULTADOS

Nas condições em que foi realizado este trabalho, os resultados da análise de dados de 24 casos novos são os que se seguem. Os dados brutos estão descritos nos Apêndices de I a XIX.

5.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO

5.1.1 Aspectos demográficos

Quanto ao gênero, houve predomínio do sexo masculino, representando 54,16 % da população estudada (Figura 18).

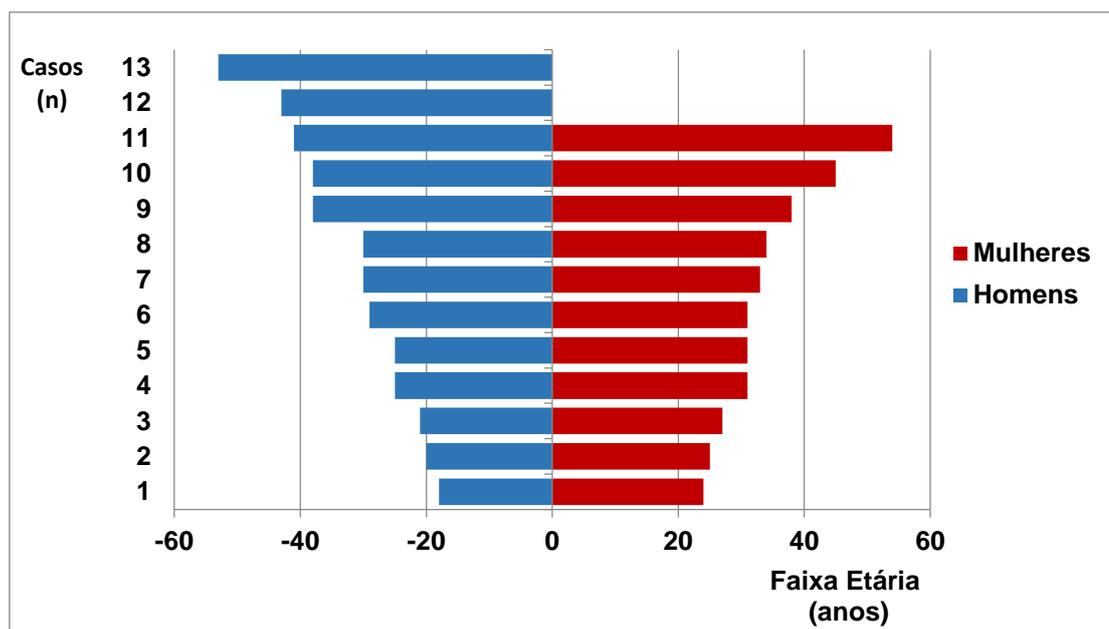


Figura 18. Distribuição da população estudada em relação ao gênero.

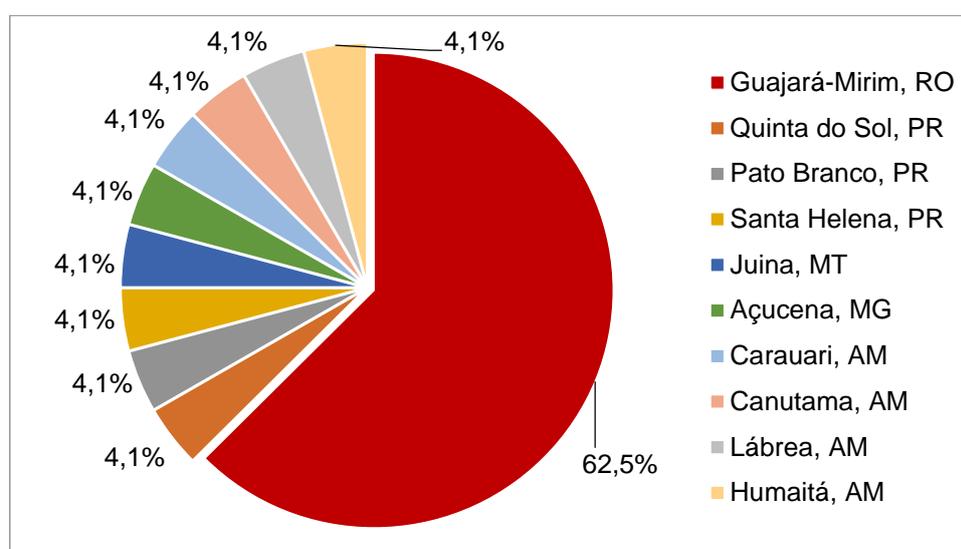
A idade média foi de 32,6 anos. Houve um predomínio da faixa etária entre os 25 e os 30 anos, 7 casos (29,1%), seguido dos casos na faixa etária dos 31 aos 36 anos, 5 casos (20,8%). Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição por faixa etária dos pacientes incluídos no estudo.

Idade	n	%
18-24	4	16,6
25-30	7	29,1
31-36	5	20,8
37-42	4	16,6
43-48	2	8,3
49-54	2	8,3
Total	24	100

Média: 32,6; DP: 25,4; Mediana: 31

Na figura 19, está a caracterização da população estudada quanto a naturalidade, sendo observado um predomínio de pacientes oriundo de Guajará-Mirim, RO.

**Figura 19.** Distribuição dos casos segundo a naturalidade.

Analisando as cidades dos 24 pacientes estudados, verificamos que 19 (79,1%), nasceram em área conhecida endêmica: Carauari (no Rio Juruá), Canutama e Lábrea (no Rio Purus) e Humaitá (no Rio Madeira), todas no Estado do Amazonas e Guajará-Mirim (Rio Mamoré), no Estado de Rondônia, com 15 casos (78,9 %) dos casos de áreas hiperendêmicas. Figura 20.

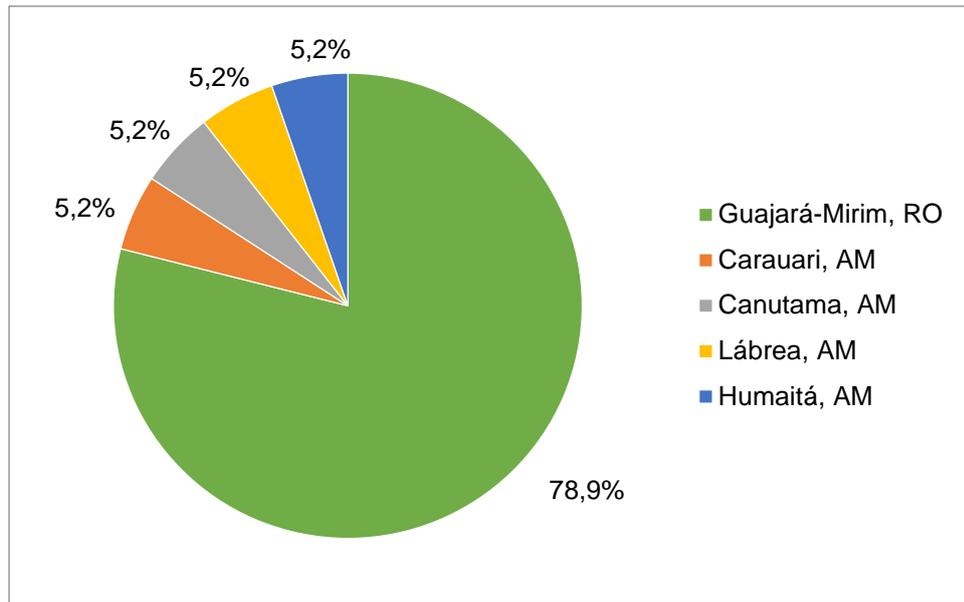


Figura 20. Distribuição dos casos com naturalidade em áreas hiperendêmicas.

Quanto à procedência, dos 15 pacientes naturais de Guajará-Mirim, todos residem neste município. O caso de Canutama e o de Lábrea residem em Lábrea, AM. O caso de Carauari, AM, reside em Mirante da Serra, RO. Figura 21.

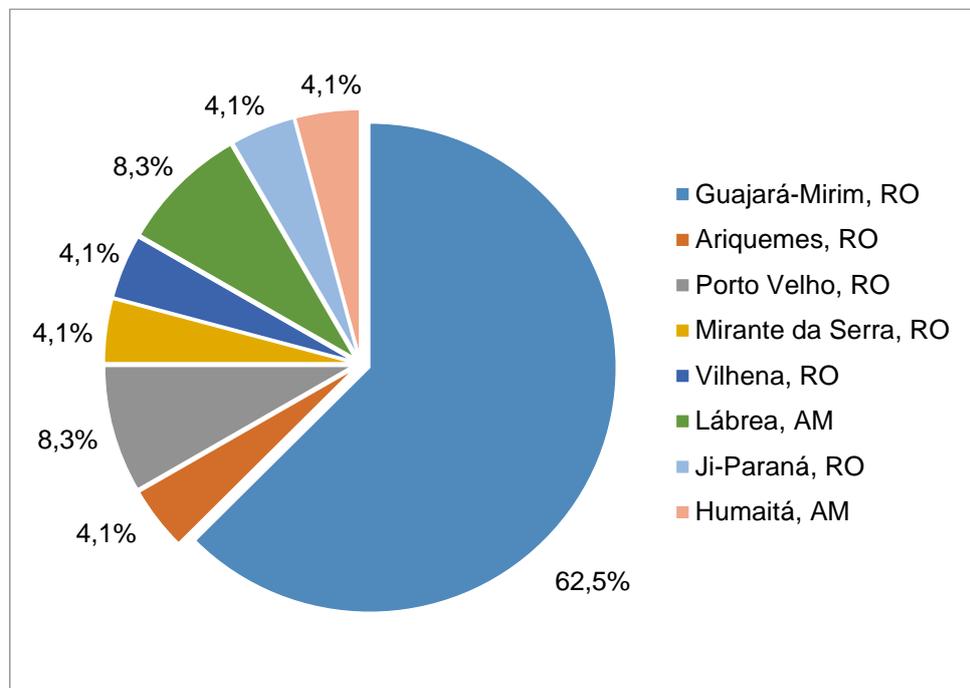


Figura 21. Distribuição dos casos segundo a procedência.

Quanto às características sociodemográficas, verifica-se que 10 casos (41,6%) eram alfabetizados e 2 casos (8,3%) eram analfabetos. Apenas 1 caso (4,1%) possuía nível superior. Com relação ao estado civil, 19 casos (79,1%) eram casados. A maioria era agricultor (45,8%). Tabela 5.

Tabela 5. Algumas características sociodemográficas dos casos estudados

Característica	n	%
Escolaridade		
Analfabeto	2	8,3
Alfabetizado*	5	20,8
Ensino fundamental**	1	4,1
Ensino médio**	3	12,5
Ensino superior**	1	4,1
Ignorado	12	50
Estado civil		
Solteiro	4	16,6
Casado	19	79,1
Ignorado	1	4,16
Profissão		
Agente administrativo	1	4,1
Agricultor	11	45,8
Ajudante geral	1	4,1
Babá	1	4,1
Comerciante	1	4,1
Dona de casa	1	4,1
Estudante	3	12,5
Pastor	1	4,1
Pecador	1	4,1
Professor	1	4,1
Militar	1	4,1
Ignorado	1	4,1
	24	100,0

* Nível de estudo não especificado; ** completo ou incompleto.

5.1.2 Antecedentes pessoais, familiares e fatores de risco

Revisando os prontuários dessa casuística, foi possível identificar fatores de risco clássicos de infecção pelo HBV/HDV, como: história de doenças sexualmente transmissíveis, passado de transfusão de sangue e/ou hemoderivados, antecedentes de cirurgias, uso de drogas, compartilhamento de objetos pessoais, casos da doença em familiares de primeiro grau, dentre outros. Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição quanto à presença de fatores de risco de infecção pelo HBV/HDV, entre os casos avaliados.

Fator de Risco	N	%
Relato de Hepatite	13	54,1
Hepatite na família	14	58,3
Malária	13	54,1
Esquistossomose	0	0
Exodontia e/ou tratamento dentário	8	33,3
Internação	5	20,8
Contato com doentes	8	33,3
Antecedente de Cirurgia	5	20,8
Hemotransfusão	2	8,3
Hemoglobinopatia	0	0
Tatuagem	1	4,1
Vacinas*	22	91,6
Injeção por curiosos	5	20,8
Tóxicos injetáveis	0	0
Etilismo	8	33,3
Tabagismo	1	4,1
Relato de DST	0	0
Promiscuidade sexual	0	0

* Calendário vacinal sem cobertura para Hepatite B.

5.2 PERFIL CLÍNICO E ULTRASSONOGRÁFICO

Dos 24 pacientes acompanhados, 5 (20,8%), apresentavam sinais de hepatite crônica, sendo 3 dos 5 sintomáticos (12,5%). Os sintomas mais comumente observados foram emagrecimento (12,5%), anorexia, astenia, aversão ao cigarro e mialgia (8,3%, cada um destes).

Os sinais de hepatopatia crônica mais relatados ao exame físico foram as telangiectasias e/ou as aranhas vasculares na pele do abdome, correspondendo a com 8,3%. Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição dos principais sinais e sintomas de hepatite crônica observados nos pacientes incluídos no estudo.

Sinais/sintomas	n	%
Anorexia	2	8,3
Astenia	2	8,3
Aversão ao cigarro	2	8,3
Baço palpável	1	4,1
Colúria	1	4,1
Emagrecimento	3	12,5
Epistaxe	1	4,1
Hepatomegalia	1	4,1
Icterícia	1	4,1
Mialgia	2	8,3
Náuseas	1	4,1
Palidez cutâneo-mucosa	1	4,1
Telangiectasias/aranhas vasculares	2	8,3
Vômitos	1	4,1

Os casos foram analisados quanto aos achados ultrassonográficos abdominais, tendo sido normal em 8 casos (33,3%). Alterações hepáticas foram encontradas em 11 casos (45,8%), com achados ultrassonográficos sugestivos de cirrose em 4 casos (16,6%), doença parenquimatosa hepática difusa crônica em 4 casos (16,6%) e hepatomegalia em 3 casos (12,5%). Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição dos principais achados ultrassonográficos sugestivos ou indicativos de hepatite crônica e doenças das vias biliares observados nos pacientes incluídos no estudo.

Achados Ultrassonográficos	n	%
Cirrose hepática	4	16,6
Colangite	1	4,1
Colecistite	2	8,3
Colelitíase	2	8,3
Doença parenquimatosa hepática difusa crônica	4	16,6
Esplenomegalia	10	37,5
Esplenectomia	2	8,3
Esteatose hepática leve	2	8,3
Hepatomegalia	3	12,5
Hipertensão portal	3	12,5
Ultrassonografia normal	8	33,3

O achado ultrassonográfico mais frequente nesta casuística foi a esplenomegalia, evidenciada em 10 casos (41,6%), sendo definida como o baço maior ou igual a 12 cm de comprimento (BRAGA et al., 2014).

5.3 PERFIL BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO

A média da ALT foi 220,3 U/L, da AST 193,1, com desvio padrão alto, devido a casos de AST=1260 U/mL e de ALT=1590 U/mL. Fosfatase alcalina média foi 109,2 UI/L, Bilirrubina direta média 0,8 mg/dl e Bilirrubina indireta média 0,6 mg/dl. Tabela 9.

Tabela 9. Valores médios dos principais marcadores bioquímicos e hematológicos avaliados.

Exame	Média	Mínimo	Máximo	Mediana	Desvio Padrão
Hematócrito (%)	38,2	30	45	38,3	3,6
Leucócitos totais (mm ³)	6076,6	3900	10500	5900	1537,6
AST (U/mL)	193,1	13	1260	83,5	274,1
ALT U/mL)	220,3	11	1590	90,5	344,6
GGT (U/L)	88,3	19	439	69	89,6
Bilirrubina Direta (mg/dl)	0,8	0,1	8,9	0,3	1,7
Bilirrubina Indireta (mg/dl)	0,6	0,1	3,7	0,5	0,7
Fosfatase Alcalina (UI/L)	109,2	13	238	111	62,1
Proteínas Totais (g/dl)	7,87	5,8	10,7	8,0	1,1
Plaquetas (mm ³)	188.838	90.100	380.000	176.500	70.204
TAP (seg.)	16,2	12	33	15,3	4,4
Colesterol Total (mg/dl)	162,8	100	282	157	49,6
Ferro sérico (g/dl)	121,8	39	300	116	52,7
Creatinina (mg/dl)	0,7	0,5	1,4	0,7	0,2
Uréia (mg/dl)	28,1	16	47	27,6	8,7
Ácido Úrico (mg/dl)	4,2	1,8	6,6	4,3	1,2
Glicemia de jejum (mg/dl)	88,7	70	124	90	11,3

5.4 PERFIL SOROLÓGICO

Além do HBsAg e do anti-HBc total, as amostras foram testadas também para o anti-HBe, HBeAg, HDV (anti-HDV total), HCV (anti-HCV), HAV (Anti-HAV) e o HIV (anti-HIV 1 e 2), pois estes três últimos são critérios de exclusão do caso desta

pesquisa. Em um dos 24 casos, anti-HBs foi positivo e em outro, não foi avaliado. Todos foram HBsAg+, anti-HBe + e HbeAg-. É provável que o único caso Anti-HBs positivo seja um falso positivo. Tabela 10.

Tabela 10. Avaliação dos casos deste estudo quanto à soroprevalência.

Marcador sorológico	n	%
Anti-HDV total	24	100,0
Anti-HBs negativo	22	91,6
Anti-HBs NA*	1	4,1
Anti-HBs positivo	1	4,1
HBsAg positivo	24	100,0
HBsAg negativo	0	0
Anti-HBc total positivo	23	95,8
Anti-Hbe positivo	24	100,0
HbeAg negativo	24	100,0

NA= Não avaliado.

5.5 PERFIL HISTOPATOLÓGICO

5.5.1 Classificação Histopatológica: Metavir

Todos os 24 casos estudados tiveram avaliação histopatológica (Apêndice VII), utilizando-se a Classificação Metavir (Anexo IV). O padrão mais frequente foi A3F3, observado em 8 casos (33,3%). O segundo foi A2F3, visualizado em 3 casos (12,5%). No total, 12 casos (50%) apresentavam fibrose moderada com esboço de nódulos (F3). Fibrose grau 2 (F2) foi observada em 5 casos (20,8%), Fibrose grau 1 (F1) foi observado em 4 casos (16,6%) e os casos sem fibrose (F0) foram 3, representando 12,5% da casuística. Cirrose (F4) não foi diagnosticada em nenhum caso.

Atividade inflamatória severa (A3) foi identificada em 9 casos (37,5%), moderada (A2) em 6 casos (25%) e atividade leve (A1) foi evidenciada em 5 casos (20,8%). Quatro casos (16,6%) não apresentavam atividade inflamatória (A0). As amostras 18 e 21 foram classificadas como A0F1 e A2F2, respectivamente, embora sejam exíguas, ou seja, menores que 2,0 cm e tinham menos de 10 espaços-porta, condições citadas por vários autores como necessárias para indicar uma amostra como satisfatória. (SNOVER, 1992). Figura 22.

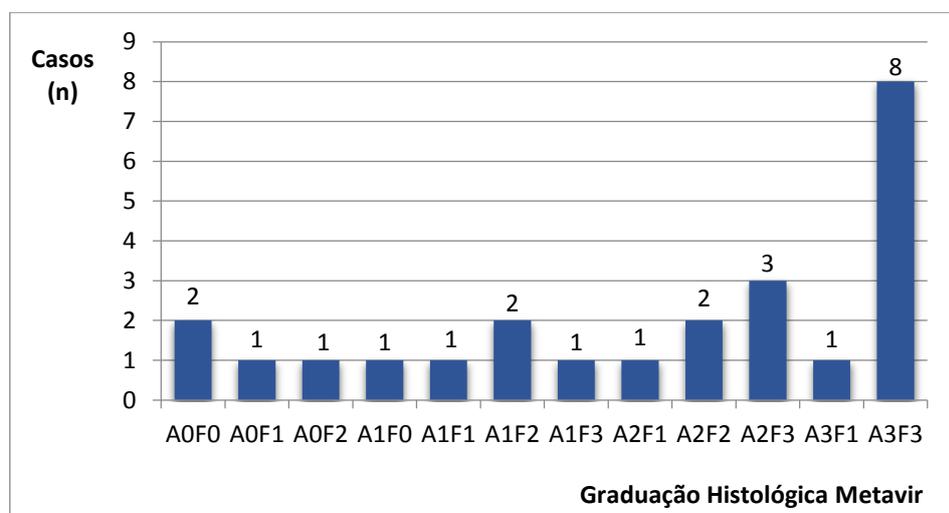


Figura 22. Diagnósticos Histopatológicos desta casuística, por ordem de Metavir.

Avaliando-se os casos por gênero, verifica-se que quanto à presença de fibrose não houve diferença significativa entre os sexos - 11 dos 13 (84,6%) masculinos e 10 dos 11 (90%) femininos. Contudo, avaliando-se por grau histopatológico a fibrose, verifica-se uma pior graduação (F3) no sexo feminino, 7 de 11 casos (63,6%), enquanto nos homens correspondeu a 5 dos 13 casos (38,4%). A fibrose grau 2 (F2) foi evidenciada em uma mulher e em 4 homens. A fibrose grau I (F1) foi visualizada em 2 mulheres e 2 homens. Ausência de fibrose foi o diagnóstico de um caso feminino e dois masculinos.

A atividade inflamatória foi mais frequente no sexo feminino (11 de 11 casos, 100% das mulheres), enquanto correspondeu a 8 dos 13 casos masculinos (61,5%). Foi classificada como acentuada em 5 de 11 mulheres (45,4%) e 4 de 13 homens (30,7%), moderada em 3 mulheres e 2 homens, leve em 3 mulheres e em 2 homens. Foi ausente em 4 homens.

Avaliando-se os casos por faixa etária, verifica-se que a fibrose grau 3 (F3) foi mais prevalente na faixa etária de 25-30 anos, com 4 casos (16,6%), seguida da faixa etária de 31-36 anos, com 3 casos (12,5%), com 1 caso (4,1%) na faixa etária de 18-24 anos, evidenciando-se uma alta prevalência nas três primeiras décadas de vida. A Fibrose grau 2 (F2) esteve presente uniformemente em todas as faixas etárias, com média de 1 caso por faixa etária (4,1%), exceto dos 43-48 anos. A fibrose grau I (F1) foi mais prevalente dos 25-30 anos- 2 casos (8,3%).

Atividade inflamatória acentuada (A3) foi mais prevalente na faixa etária de 25-30 anos, com 5 casos (20,8%), atividade moderada (A2) foi mais observada na faixa etária de 18-24 anos, com 3 casos (12,5%). Atividade discreta (A1) esteve presente em dois casos de 25-30 anos (8,3%), dois casos de 31-36 anos (8,3%) e 1 caso na faixa etária de 49-54 anos (4,1%). A ausência de atividade inflamatória foi mais evidenciada em faixa etária maior, sendo 1 caso (4,1%) de 43-48 anos e 1 caso (4,1%) dos 48-54 anos. Houve ainda um caso na faixa dos 18-24 anos. Tabela 11.

Tabela 11. Avaliação histológica pela Classificação Metavir de acordo com a faixa etária.

Faixa etária	Metavir	n	%
18-24	A0F0	1	4,1
	A2F1	1	4,1
	A2F2	1	4,1
	A2F3	1	4,1
25-30	A1F1	1	4,1
	A1F2	1	4,1
	A3F1	1	4,1
	A3F3	4	16,6
31-36	A1F0	1	4,1
	A1F2	1	4,1
	A2F3	1	4,1
	A3F3	2	8,3
37-42	A0F0	1	4,1
	A2F2	1	4,1
	A2F3	1	4,1
	A3F3	1	4,1
43-48	A0F1	1	4,1
	A3F3	1	4,1
49-54	A0F2	1	4,1
	A1F3	1	4,1
Total		24	100,0

5.5.2 Caracterização de reações e danos morfológicos

Na avaliação de reações e danos morfológicos, foram avaliados aspectos específicos do infiltrado inflamatório, das lesões celulares reversíveis, irreversíveis, da fibrose, da regeneração celular e do dano vascular, utilizando-se (-), (+), (++) ou (+++), na semiquantificação. Cada característica está descrita no texto a seguir, com detalhes de localização, intensidade e padrão de distribuição.

Abaixo, estão listadas as características morfológicas pesquisadas, por ordem decrescente de frequência nos casos estudados, sendo mais frequente a fibrose perissinusoidal (91,6%), seguida da fibrose portal e porta-porta (83,3%), inflamação portal (83,3%) e balonização citoplasmática (79%). Tabela 12.

Tabela 12. Características morfológicas dos casos estudados, por ordem decrescente de frequência.

Característica Morfológica	n	%
Fibrose Perissinusoidal	22	91,6
Fibrose portal e porta-porta	20	83,3
Inflamação portal	20	83,3
Balonização citoplasmática	19	79,1
Atividade lobular	18	75,0
Corpúsculos de Councilman	18	75,0
Regeneração celular	18	75,0
Hiperplasia de células de Küpffer	17	70,8
Hipertrofia de células de Küpffer	17	70,8
Necrose em saca bocado	16	66,6
Extravasamento de linfócitos na interface (“spill over”)	16	66,6
Linfocitose intrassinusoidal	16	66,6
Hepatócitos em vidro fosco	15	62,5
Esteatose	10	41,6
Proliferação/reacção ductular	7	29,1
Agressão ductular	6	25,0
Depósito de ferro intra-hepatocitário (Perls+)	2	8,3
Colestase	0	0
Célula em mórula	0	0
Total	24	-

5.5.2.1 Caracterização e quantificação do infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório foi caracterizado quanto à localização, constituição e feita uma semiquantificação. Nesta etapa, foi incluída também a avaliação das células de Küpffer, pois são macrófagos especializados nos sinusóides hepáticos. Na figura 23, estão definidas as células que constituem os infiltrados inflamatórios dos casos estudados.

Da análise dos dados, verifica-se que predominaram os linfócitos. Em 20 dos 24 casos em que foi detectada inflamação (83,33%), eles estavam distribuídos tanto nos espaços-porta quanto no parênquima lobular e em 2 casos, exclusivamente portal e discreta (+).

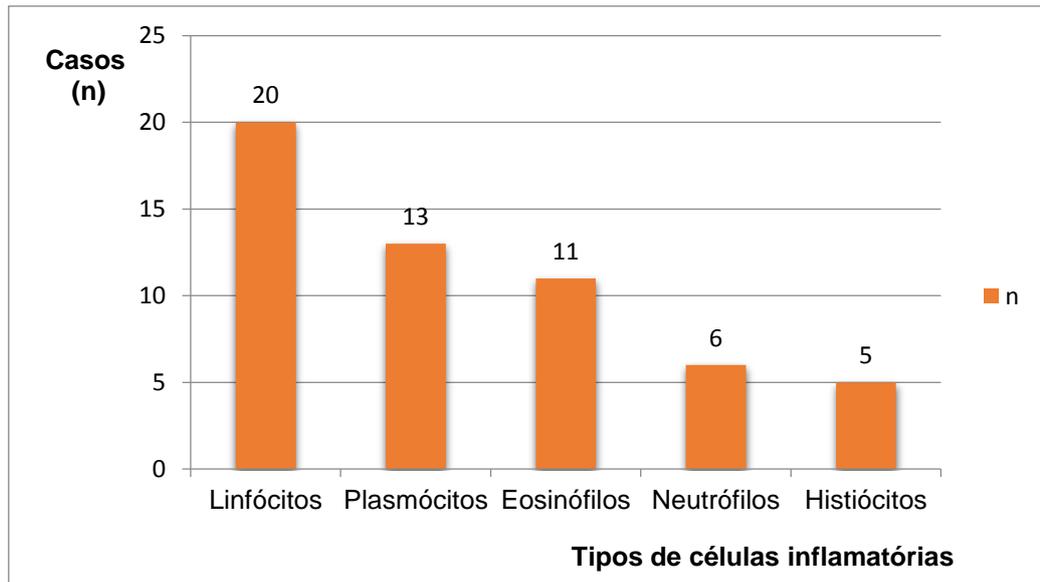


Figura 23. Tipos de células inflamatórias observadas por ordem decrescente de frequência.

Dos 18 casos com inflamação portal e lobular, o infiltrado linfocitário portal foi acentuado (+++) em 9 casos, moderado (++) em 7 casos, discreto (+) em 2 casos. Quanto ao infiltrado linfocitário lobular, foi classificado como acentuado em apenas 2 casos, moderado em 5 casos, discreto em 11 casos. A gravidade da inflamação portal foi proporcional à lobular em 7 casos.

O extravasamento de linfócitos para a interface foi evidenciado em 16 dos 20 casos (80%), sendo acentuado em 2 casos, moderado em 6 e discreto em 10 casos. Linfocitose intrassinusoidal foi evidenciada em 16 dos 20 casos com inflamação, sendo classificada como acentuada em um caso, moderada em 4 e discreta em 11 casos. Linfocitose foi mais frequente em casos com atividade inflamatória moderada (5 casos) e acentuada (9 casos). Em 5 dos 20 casos (25%), notamos ainda a formação de acúmulos linfóides (figura 24), todos com atividade portal acentuada.

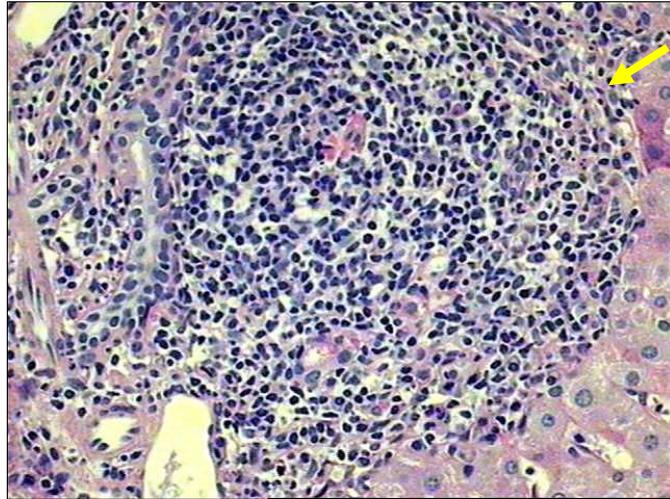


Figura 24. Microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acentuado com formação de um acúmulo linfóide sem centro germinativo (seta) (H&E, 200 x).

O infiltrado neutrofílico foi visualizado em 6 dos 20 casos (30%), sendo discreto em todos estes. Três dos 6 casos apresentavam atividade inflamatória acentuada e 2 dos 6 casos, atividade moderada. Foram visualizados histiócitos, em pequeno número, em 5 dos 20 casos (25%), 4 deles com atividade acentuada e 1 caso com atividade moderada.

Plasmócitos foram evidenciados em 13 dos 20 casos (65%), sendo visualizados em número elevado em 2 casos, moderado em 2 casos e discreto em 9 casos. Oito casos contendo plasmócitos apresentavam atividade acentuada, enquanto 5 deles apresentavam atividade inflamatória moderada (Figura 25).

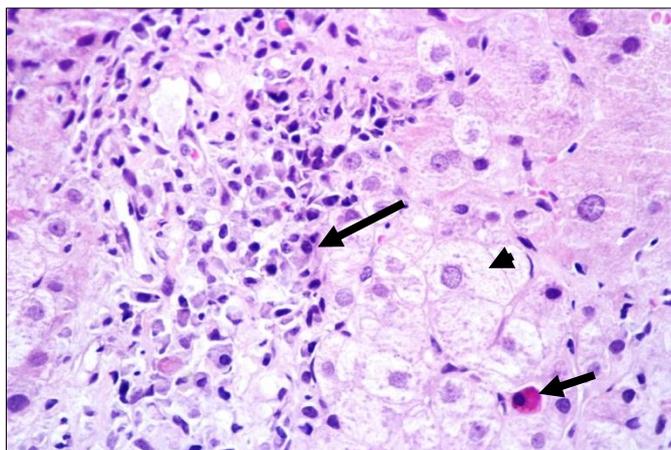


Figura 25. Microfotografia mostrando infiltrado inflamatório acentuado, com moderado número de plasmócitos (seta maior). Presença ainda de corpúsculo de Councilman ou corpo apoptótico (seta menor) e balonização citoplasmática (cabeça de seta) (H&E, 200 x).

Eosinófilos em número discreto foram vistos em 11 casos (55%), 2 deles com atividade inflamatória moderada e em 3 casos, com atividade inflamatória acentuada. Figura 26.

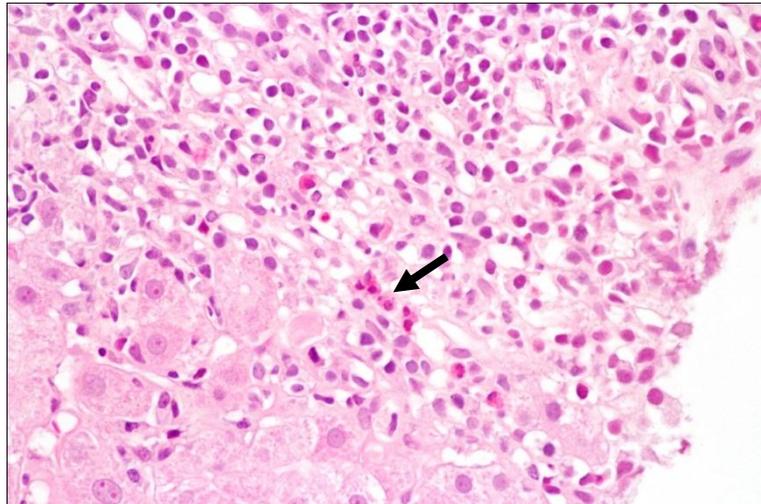


Figura 26. Microfotografia mostrando numerosos eosinófilos periporiais (seta) (H&E, 200x).

Hiperplasia e hipertrofia de células de Küpffer foram visualizadas em 17 dos 24 casos (70,8%), sendo mais frequentes naqueles casos com atividade inflamatória acentuada (7 casos).

5.5.2.2 Avaliação das lesões celulares reversíveis

As lesões celulares reversíveis, como degeneração hidrópica; acúmulos celulares, como lipídios na esteatose e degeneração moruliforme. Depósito de ferro e presença de HBsAg no citoplasma (hepatócitos em vidro fosco) foram os tipos lesões reversíveis avaliadas separadamente. Colestase e células em mórula não foram visualizadas em nenhum caso.

Avaliação da degeneração hidrópica

A degeneração hidrópica esteve presente em 19 dos 24 casos (79,1%), sendo acentuada em um caso, moderada em 6 casos, leve em 12 casos, todos de localização lobular e periportal. Figura 27.

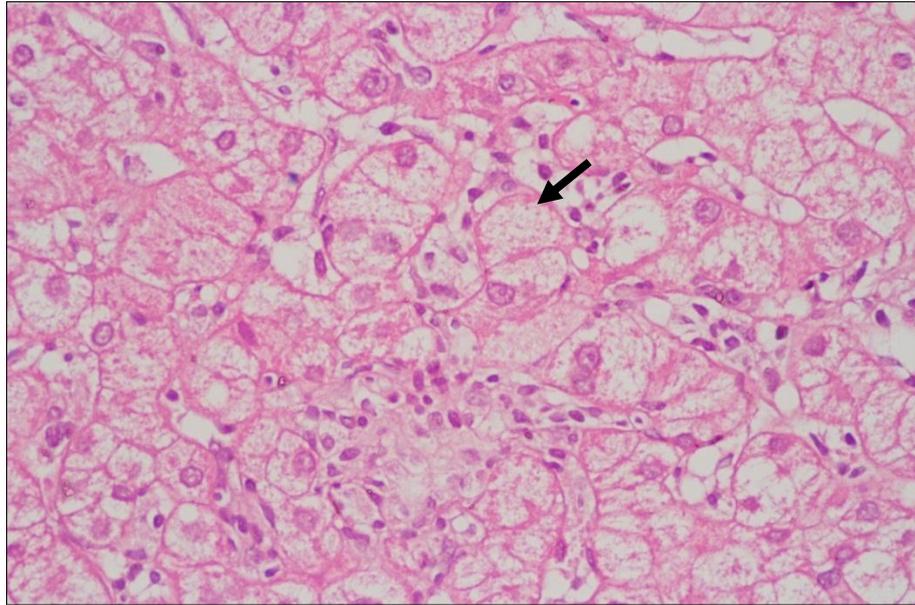


Figura 27. Microfotografia mostrando intensa balonização citoplasmática (H&E, 200 x).

Avaliação da esteatose

A esteatose foi observada 10 casos (41,6%), sendo discreta e insignificante em 9 casos (área esteatótica menor que 5% de cada amostra). Em um caso ocupou uma área maior do que 5%, macrofotocular, de padrão em faixa na região lobular (zona 2), como mostrado na Figura 28.

Foi evidenciada esteatose exclusivamente na zona 1 em apenas um caso, exclusivamente em zona 2 em um caso, em zonas 1-2 em 3 casos, em zonas 2-3 em um caso e em zonas 1-2-3 em 4 casos.

A esteatose ocorreu em casos com ou sem atividade inflamatória, sendo mais frequente em casos com atividade acentuada (4 casos) e fibrose moderada (5 casos). Células em mórula não foram visualizadas em nenhum dos casos deste estudo.

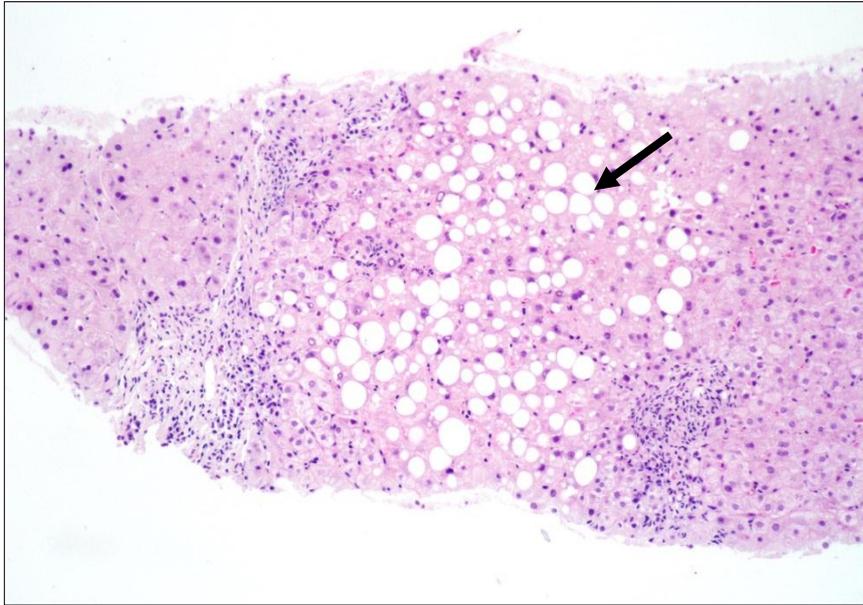


Figura 28. Microfotografia mostrando esteatose macro e microgoticular em faixa e septos fibrosos permeados por infiltrado mononuclear predominantemente linfocítico (H&E, 100 x).

Avaliação de depósito de ferro

Foi visualizado depósito intra-hepatocitário de ferro em dois dos 24 casos (8,3%), nas 3 zonas de Rappaport, sendo moderado em um deles. Figura 29.

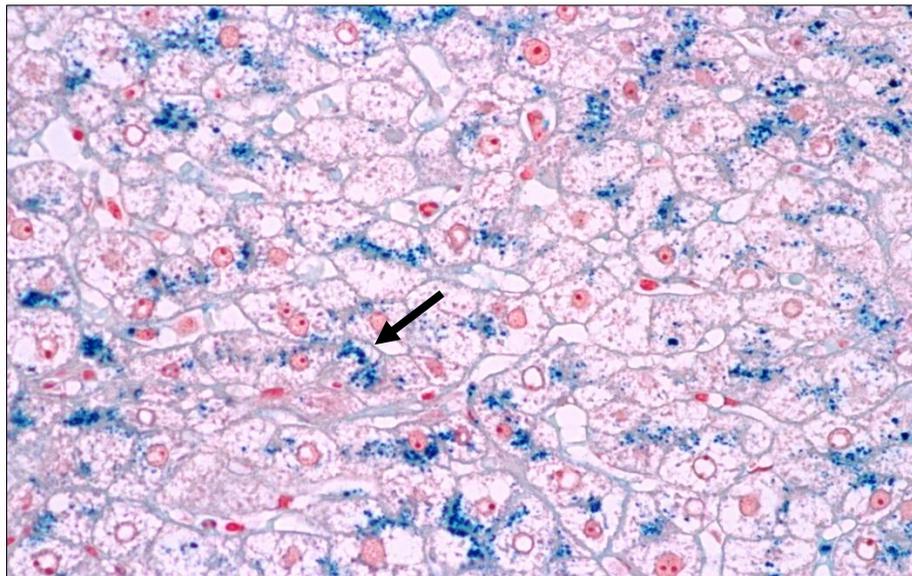


Figura 29. Microfotografia mostrando grânulos grosseiros em quantidade moderada, intracitoplasmáticos, difusamente distribuídos (Perls, 200 x).

Hepatócitos em vidro fosco

Hepatócitos em vidro fosco foram visualizados em 15 dos 24 casos (62,5%), distribuídos difusamente nos lóbulos. Foram vistos poucos hepatócitos em vidro fosco em 10 casos, em número moderado, em 5 casos. Figura 30.

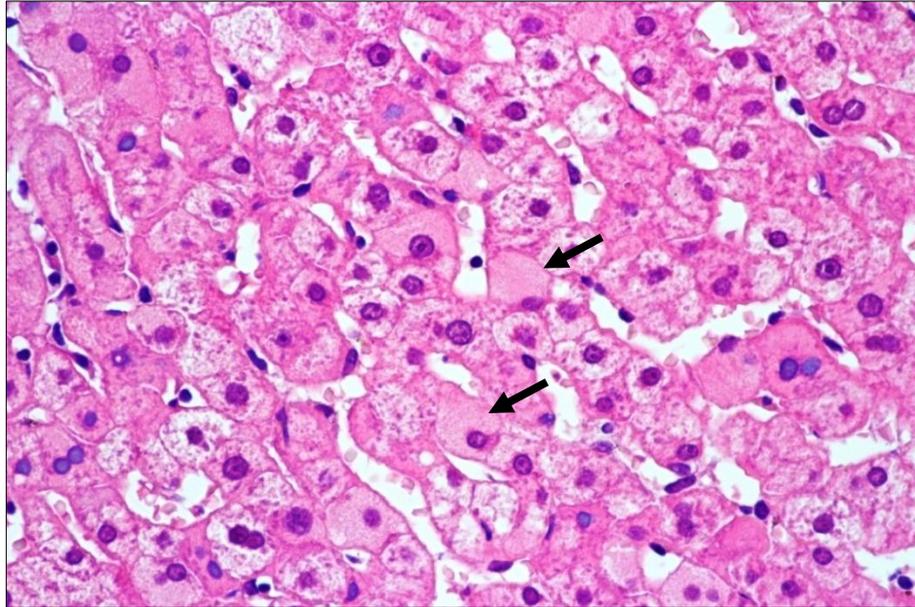


Figura 30. Microfotografia mostrando hepatócitos em vidro fosco (setas) (H&E, 200 x).

Colestase

Foi pesquisada colestase intracanalicular e intra-hepatocitária, não tendo sido visualizada em nenhum caso.

5.5.2.3 Avaliação das lesões celulares irreversíveis

Foram avaliados os dois padrões histológicos de morte celular:

- Necrose hepatocelular
- Apoptose (corpúsculos de Councilman).

Avaliação da necrose

Quanto à extensão da necrose hepatocelular, não foi observado padrão maciço (necrose de todo o lóbulo) ou submaciço (necrose poupando pequena faixa de hepatócitos, em torno da veia centrolobular). Contudo, a agressão à placa limitante, com necrose em “saca-bocado” (Figura 31) foi observada em 16 casos (66,6%), sendo moderada em 11 casos e discreta em 5 casos, mais uma característica de hepatite crônica pré-existente.

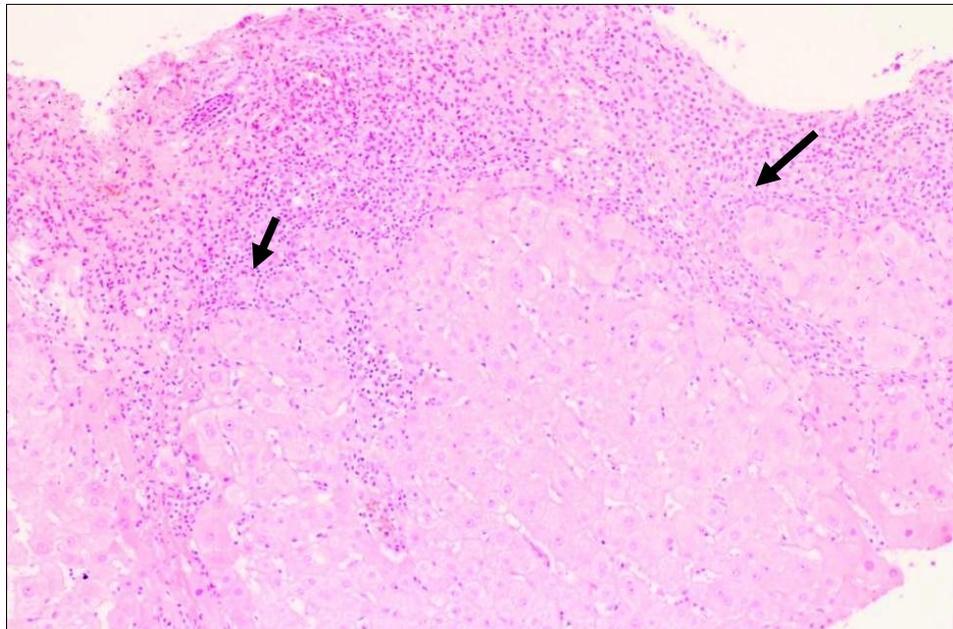


Figura 31. Microfotografia mostrando inflamação acentuada, com áreas de necrose em “saca-bocado” (setas) (H&E, 100 x).

Avaliação da apoptose

A presença de corpúsculos de Councilman foi evidenciada em 18 dos 24 casos (75%), sendo classificada como numerosos em um caso, moderados em 4 casos e discretos em 13 casos. As células apoptóticas se localizaram em todo o lóbulo, com preferência pela região periportal (Figura 32).

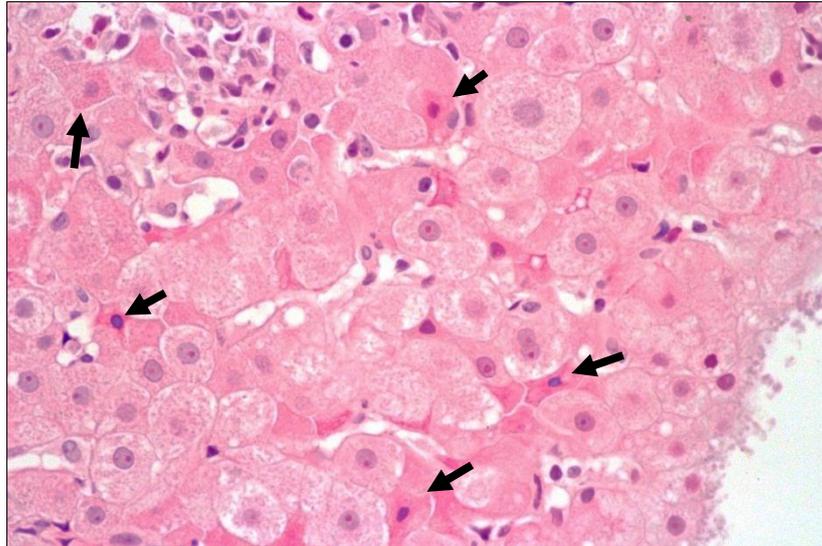


Figura 32. Microfotografia mostrando células apoptóticas com eosinofilia e picnose, periportais e mediozonais (setas) (H&E, 200x).

5.5.2.4 Avaliação dos Padrões de Fibrose

A fibrose foi observada em 22 casos (91,6%). As fibroses portal e porta-porta foram observadas em 20 dos 24 casos (83,3%). Retirando-se os casos com fibrose exclusivamente portal, em 13 dos 24 casos (54,1%) havia fibrose portal e fibrose porta-porta (Figura 33). Foi classificada como acentuada em 3 casos, moderada em 9 e leve em 1 caso, conforme a classificação Metavir.

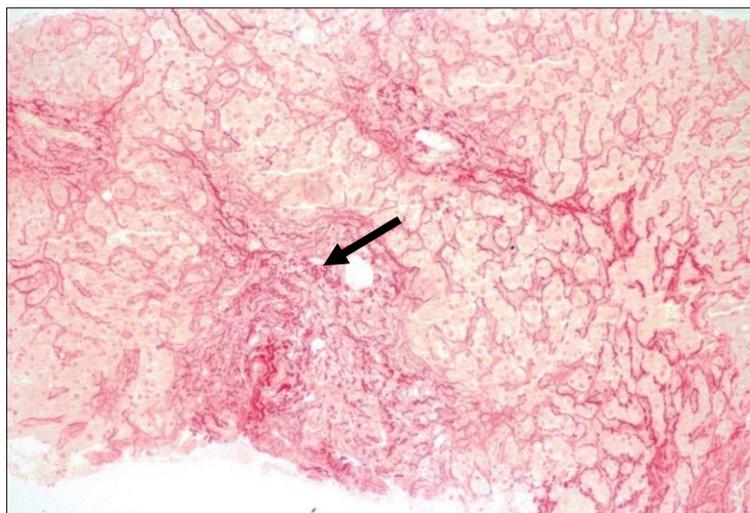


Figura 33. Microfotografia mostrando septos fibrosos portais e porta-porta, bem demarcados em vermelho (seta), esboçando nódulos de regeneração (Picrosirius, 100x).

Fibrose exclusivamente portal sem septos foi visualizada em 7 casos (29,1%), sendo portal discreta em dois casos, moderada em dois casos e acentuada em três casos. Figura 34.

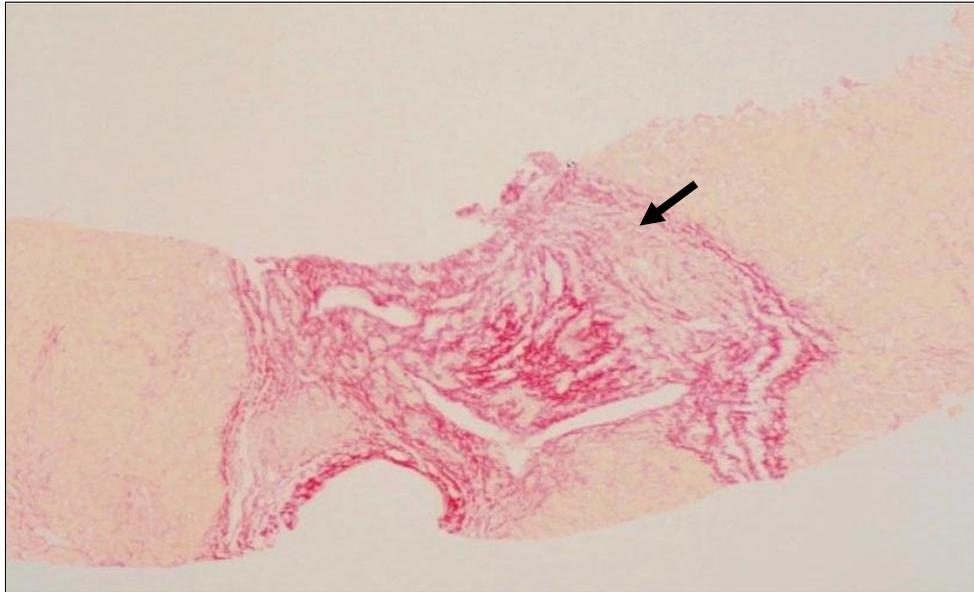


Figura 34. Microfotografia mostrando septos fibrosos portais importante (seta), sem septos porta-porta. Metavir: A3F1 (Picrosirius, 40x).

A fibrose perissinusoidal foi detectada em 22 casos (91,6%), sendo a mais frequentemente encontrada nos casos estudados. Foi dividida em focal ou difusa, sendo que o comprometimento sinusoidal difuso (zonas 1, 2 e 3) ocorreu em 12 casos; exclusivamente em zona 3 em 8 casos e em zonas 1 e 3 em 2 casos. Apresentaram fibrose grau 3 (F3) 9 dos 12 com padrão difuso e 3 dos 8 casos com fibrose perissinusoidal exclusivamente em zona 3.

O padrão focal mostrou distribuição zonal, sendo observada fibrose perissinusoidal envolvendo principalmente na zona 3, em 10 casos, sendo moderada em 3 casos e discreta em 8 casos. Em 2 casos, havia fibrose em torno da veia centrolobular. Figura 35.

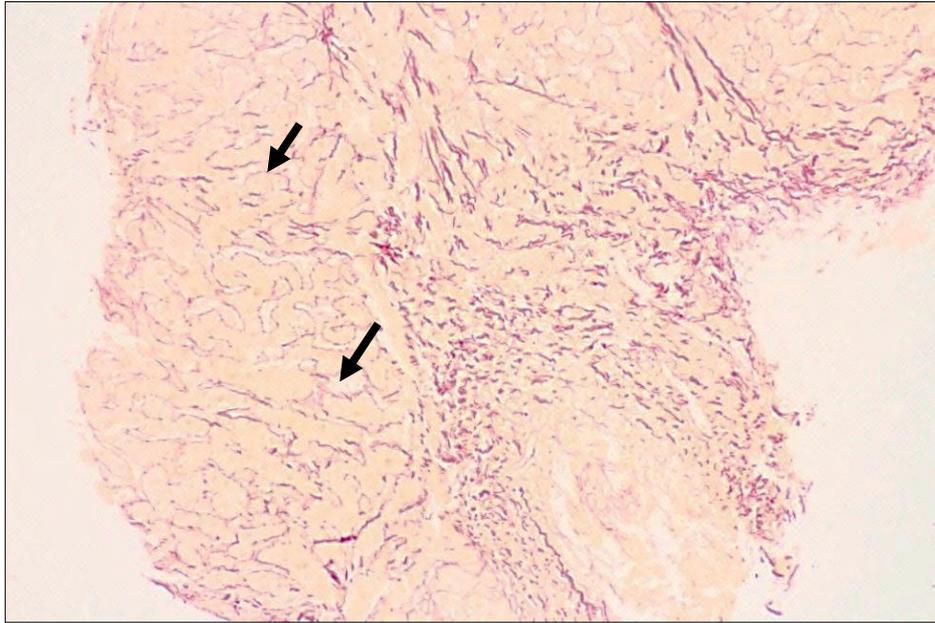


Figura 35. Microfotografia mostrando septos fibrosos bem demarcados em vermelho, em zonas 1, 2 e 3, esboçando nódulos de regeneração (setas). Note a fibrose perissinusoidal difusa. Metavir: A3F3. (Picrosirius, 100x).

5.5.2.5 Avaliação da regeneração celular

A regeneração celular (proliferação hepatocitária e ductular) foi avaliada de forma semiquantitativa, que variou de discreta (+) a acentuada (+++).

Regeneração hepatocitária

A regeneração hepatocitária foi evidenciada em 18 dos 24 casos, (75%). Os achados histológicos indicativos de regeneração encontrados, por ordem de frequência, foram: Duplicidade de cordões hepatocitários em 18 casos (Figura 36), pseudorrosetas em 14 casos (Figura 37), núcleos reativos em 11 casos e multinucleação em dois casos.

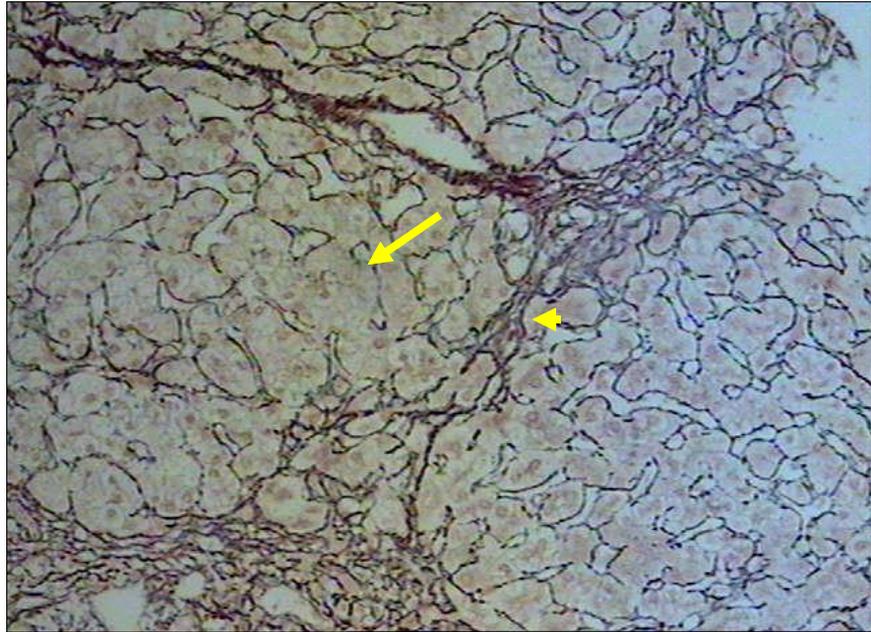


Figura 36. Microfotografia mostrando septos fibrosos porta a porta (ponta de seta) e duplicidade de cordões hepatocitários (seta). Metavir: A2F3 (Reticulina, 200x).

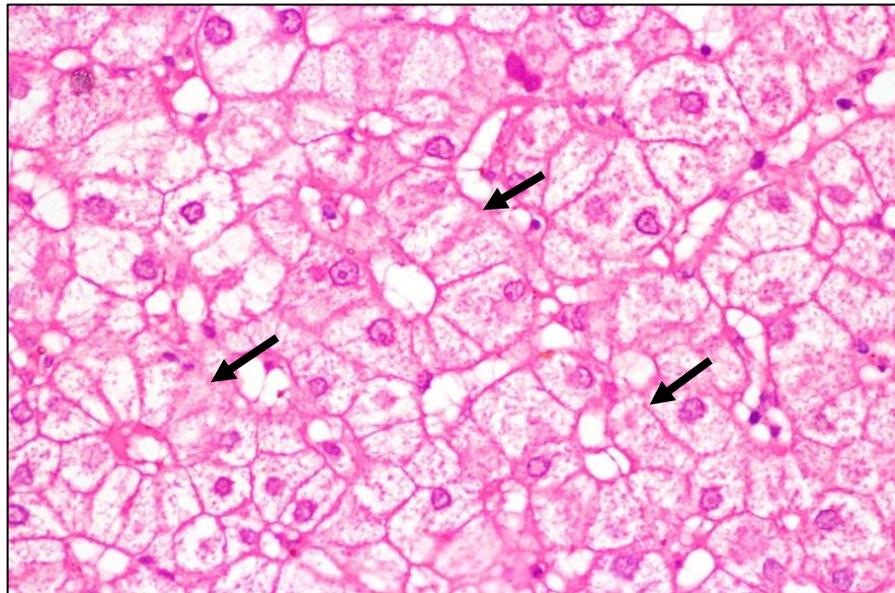


Figura 37. Microfotografia mostrando pseudorroseas de regeneração (setas) (H&E, 200x).

Reação ou Proliferação ductular

Quanto à proliferação ductular, foi observada em 7 casos (29,1%), sendo moderada em um caso e discreta em 6 casos.

Agressão ductular

A agressão ao epitélio ductular, indicado por (+) quando presente e (-) se ausente, foi observada em 6 destes casos.

5.5.2.6 Avaliação do dano vascular

Dano vascular não foi detectado dano vascular em nenhum caso.

5.6 PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas especificamente para pesquisa de antígenos virais. Para o HBsAg e HBcAg foram realizadas em 22 dos 24 casos, enquanto para a pesquisa do HDAg foi realizada em 23 casos, devido ao completo desgaste do bloco de parafina, que impossibilitou as reações em um caso. Os resultados estão organizados na figura 38.

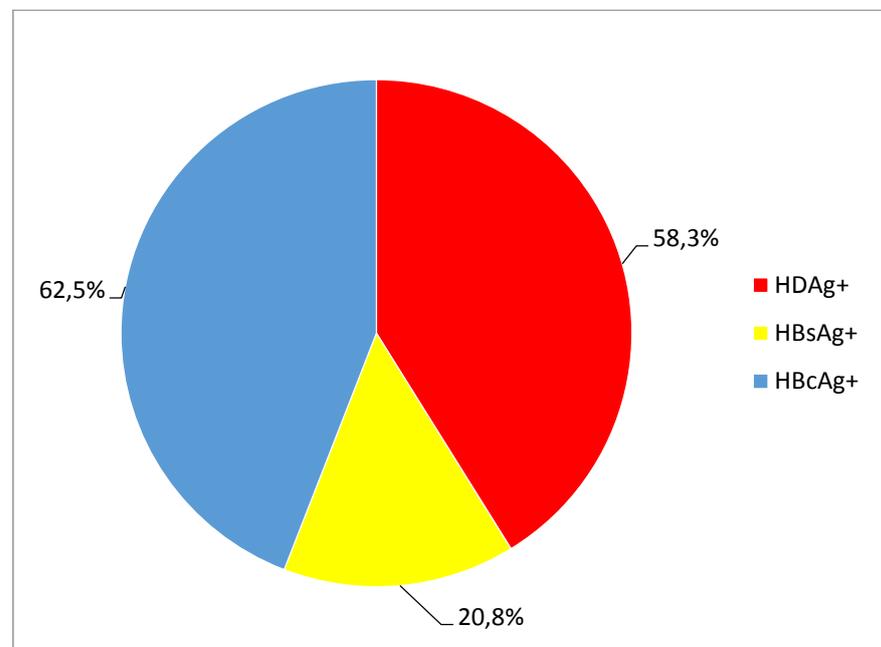


Figura 38. Casos positivos para os marcadores imuno-histoquímicos analisados.

5.6.1 Perfil imuno-histoquímico do Antígeno Delta (HDAg)

A reação imuno-histoquímica para HDAg foi realizada em 23 dos 24 casos, sendo positiva em 14 casos (58,3%), negativa em 9. A marcação foi nuclear e citoplasmática em 14 casos (Figura 39). Nota-se a marcação de células isoladas, sem padrão de continuidade entre elas.

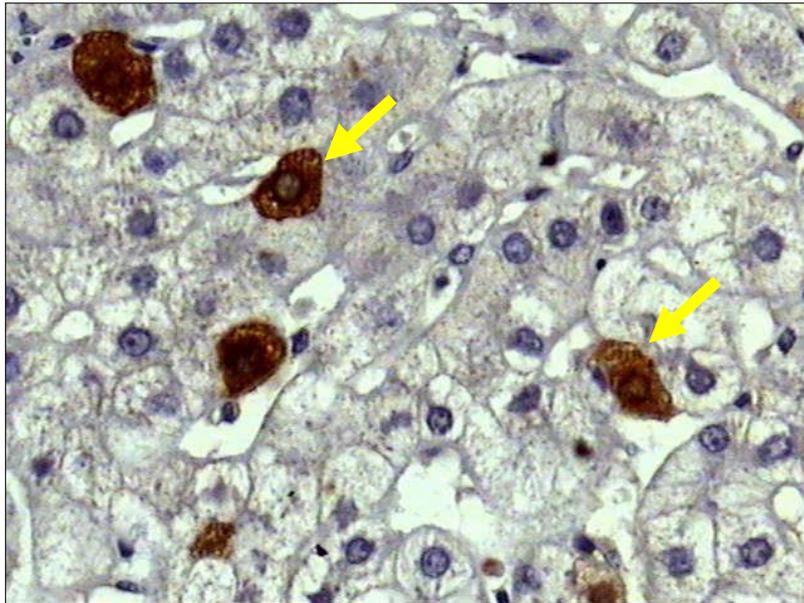


Figura 39. Microfotografia mostrando expressão do antígeno Delta no núcleo e citoplasma dos hepatócitos (setas). Técnica de imuno-histoquímica para HDAg, 400x.

O padrão de marcação nuclear do HDV foi visto em um único caso, onde também foi evidenciada marcação citoplasmática e nuclear, Figura 40, A e B.

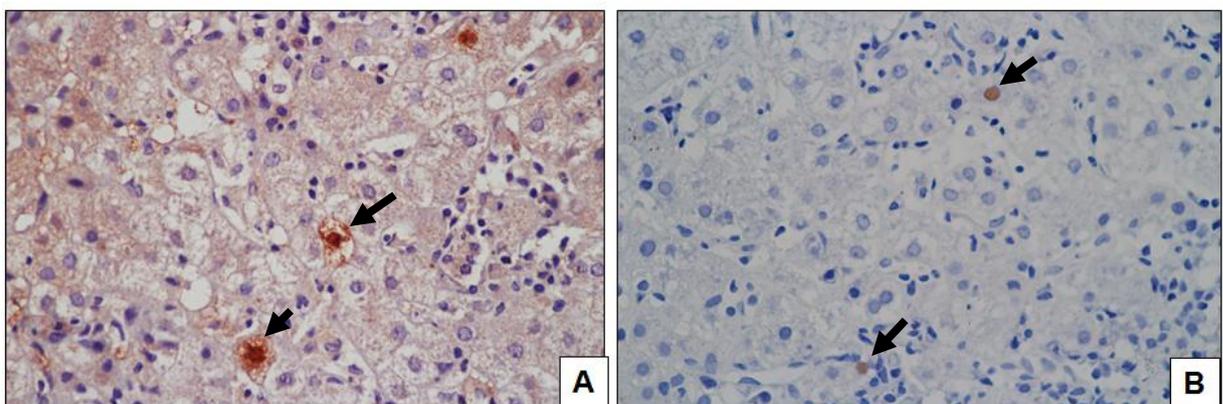


Figura 40. Microfotografia mostrando expressão do antígeno Delta no núcleo e citoplasma dos hepatócitos (A) e exclusivamente nuclear (B). Técnica de imuno-histoquímica para HDAg, 200x (A e B).

A reação para HDAg foi quantificada em (+), com marcação nuclear e citoplasmática, sendo observados dois casos com marcação em muitas células (+++) (Figura 41), 6 casos com marcação em número moderado de células (++) e 6 casos com marcação em poucas células (+).

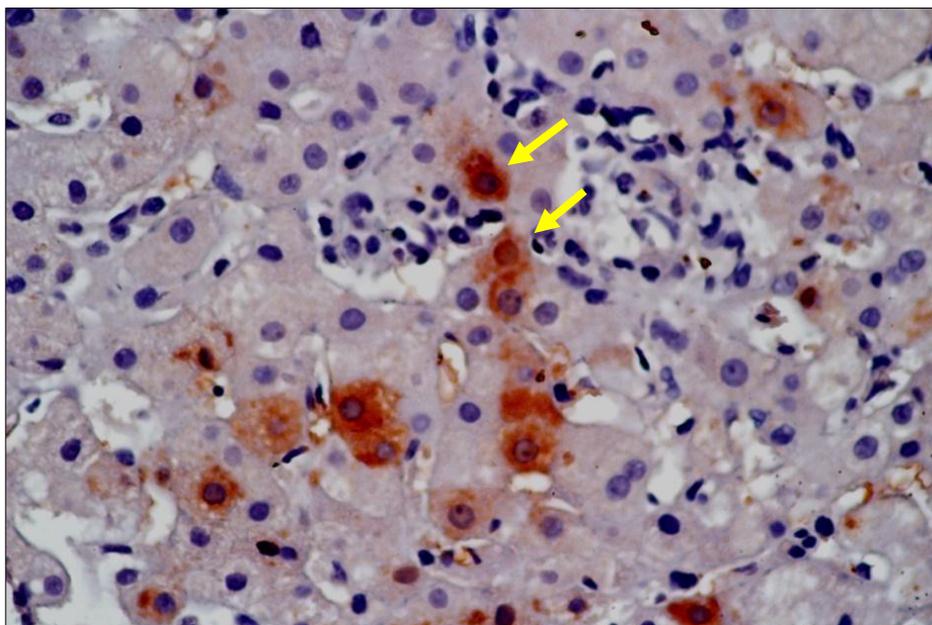


Figura 41. Microfotografia mostrando expressão do antígeno Delta (setas) predominantemente no citoplasma dos hepatócitos e em raros núcleos. Técnica de imuno-histoquímica para HDAg, 200x.

A marcação nuclear foi mais evidente (++) em um dos 14 casos em que foi detectada. A marcação citoplasmática foi mais evidente (++) em dois dos 14 casos em que foi detectada.

5.6.2 Perfil imuno-histoquímico do HBsAg

As reações imuno-histoquímicas para detecção de HBsAg intra-hepatocitário foram realizadas em 7 dos 24 casos, tendo sido positiva em 5 casos (20,8%), negativa em 2 casos e não avaliada em 17 casos. Em todos estes, apresentou padrão de marcação citoplasmático, sendo o padrão de membrana evidenciado em dois casos: nº 2 (+++) (Figura 42) e no caso nº 13 (+), Figura 43.

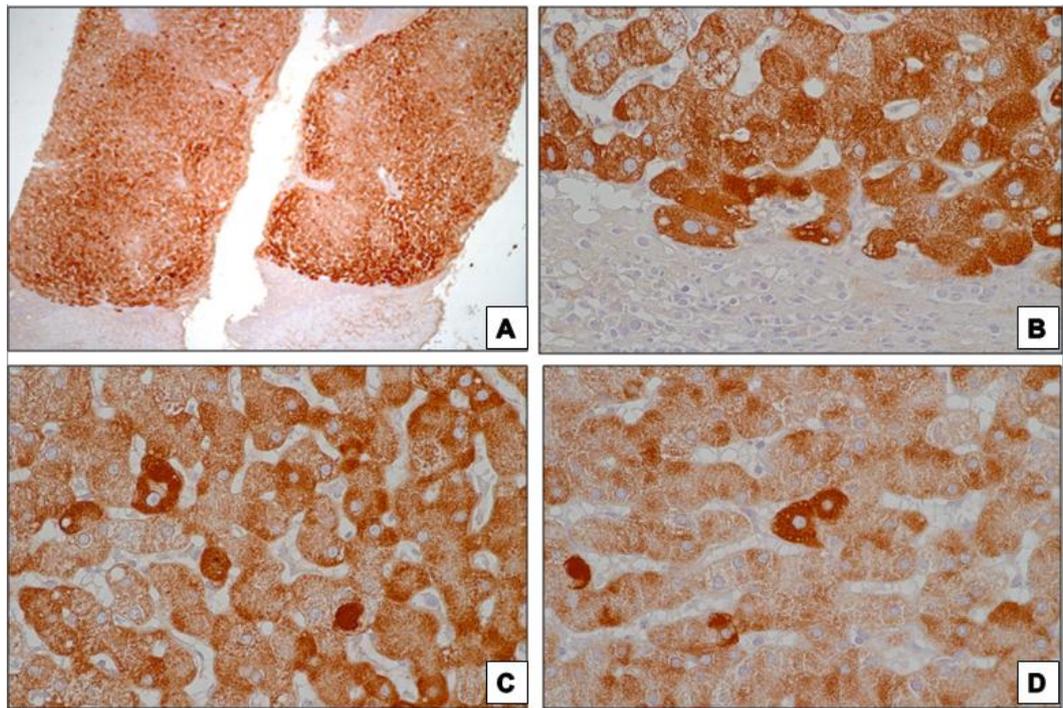


Figura 42. Microfotografia mostrando expressão do antígeno HBsAg no citoplasma dos hepatócitos, em padrão de faixa (A), (+++). Preservação dos espaços-porta (B) e apresenta marcação forte (C) e fraca de hepatócitos (D). Técnica de imuno-histoquímica para HBsAg, 40x (A) e 200 x (B, C, D).

O HBsAg apresentou padrão de expressão em faixa de hepatócitos, bem demarcado, com áreas positivas coradas em marrom entremeadas por faixas sem marcação (Figura 42, A). A imunoexpressão do HBsAg nos 5 casos foi semiquantificada como discreta (+) em 2 casos e acentuada (+++) em 3 casos.

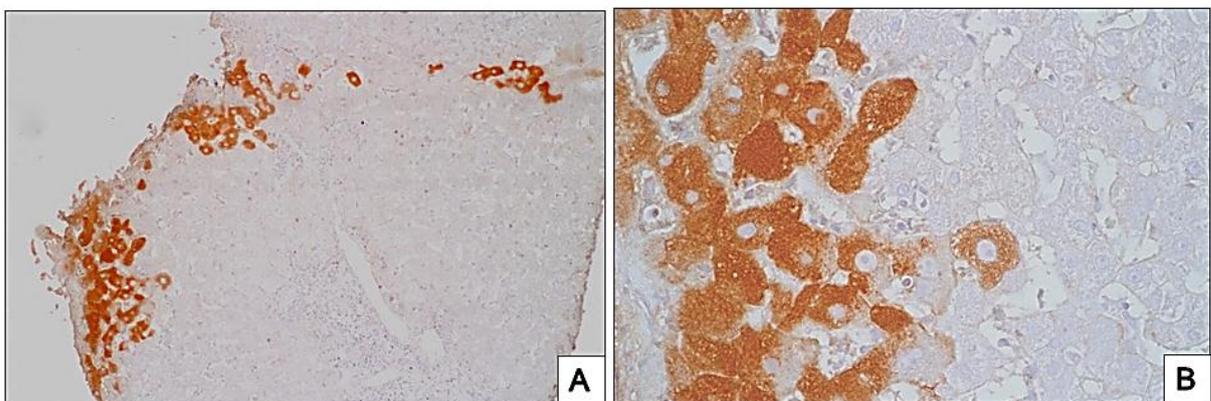


Figura 43. Microfotografia mostrando expressão em marrom do HBsAg no citoplasma dos hepatócitos (+++). Técnica de imuno-histoquímica para HBsAg, 40x (A) e 200 x (B).

5.6.3 Perfil imuno-histoquímico do HBcAg

A pesquisa do HBcAg foi concluída em 20 dos 24 casos, sendo positiva em 15 casos (62,5%), tendo sido negativa em 5 casos e não avaliada em 4 casos (reação não realizada). Dos positivos, em 14 deles o padrão de marcação foi exclusivamente citoplasmático. O HBcAg foi semiquantificado, tendo expressão acentuada (+++) em 2 casos, 7 casos como moderada (++) e em 5 casos como discreta (+). Figura 44.

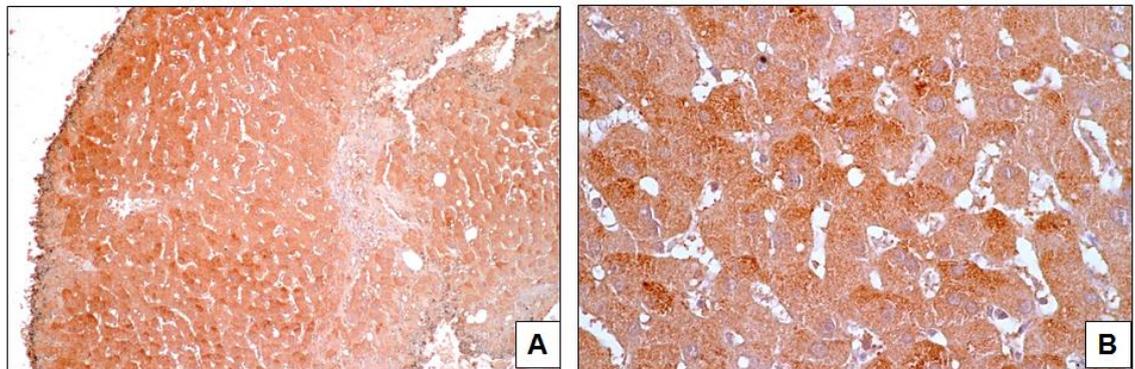


Figura 44. Microfotografia mostrando expressão do HBcAg no citoplasma (+++) dos hepatócitos. Técnica de imuno-histoquímica para HBcAg, 40x (A) e 200 x (B).

Um único caso de HBcAg teve expressão exclusivamente nuclear, com marcação focal e discreta (+), sendo um caso sem expressão imuno-histoquímica do HDV. Figura 45.

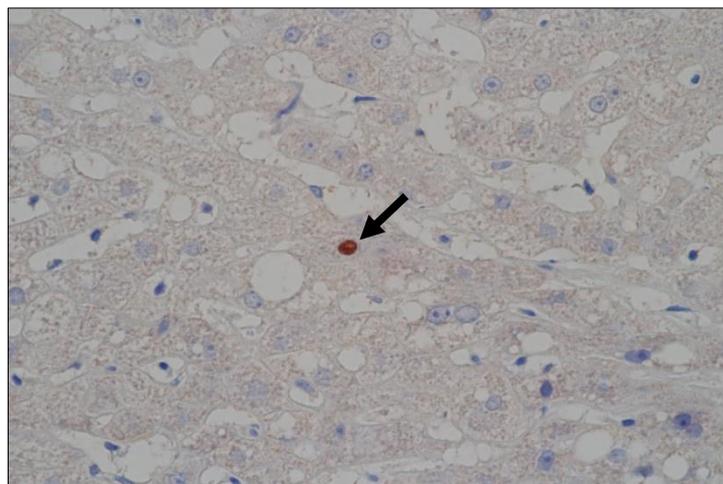


Figura 45. Microfotografia mostrando expressão do antígeno HBcAg no núcleo de hepatócito (seta). Único caso com expressão nuclear do HBcAg. Técnica de imuno-histoquímica para HBcAg, 200 x.

5.7 PERFIL DA BIOLOGIA MOLECULAR

5.7.1 Genotipagem

Nas condições em que foi feita esta pesquisa, os dados referentes a genotipagem foram fornecidos pela equipe do Laboratório de Virologia do CEPEM.

5.7.1.1 Genotipagem do HDV

O genótipo do HDV pode ser determinado em 17 pacientes, enquanto o do HBV foi definido em 11 pacientes. Todos foram genótipo Delta tipo III, com predomínio da faixa etária de 25 a 30 anos (41,1%), sendo 10 casos do sexo masculino (58,8%) e 7 casos (41,1%) do sexo feminino. Tabela 13.

Tabela 13. Distribuição por faixa etária dos casos de Genótipo III.

Faixa etária	n	%
18-24	4	23,5
25-30	7	41,1
31-36	4	23,5
37-42	1	5,8
43-48	0	0
49-54	0	0
Total	17	100,0

5.7.1.2 Genotipagem do HBV

Quanto à genotipagem para o vírus B, foram analisados 11 dos 24 casos (Tabela 14):

Tabela 14. Distribuição por faixa etária dos casos de HBV.

Faixa etária	n	%
18-24	2	18,1
25-30	4	36,3
31-36	3	27,2
37-42	0	0
43-48	0	0
49-54	2	18,1
Total	11	100,0

Desses 11 casos, 7 (63,6%) foram do genótipo F, sendo 4 casos do sexo feminino e 3 casos do sexo masculino. Quanto a faixa etária, 4 casos estavam entre 25-30 anos e 3 casos entre 31-36 anos, com média de 29,2 anos (Figura 46).

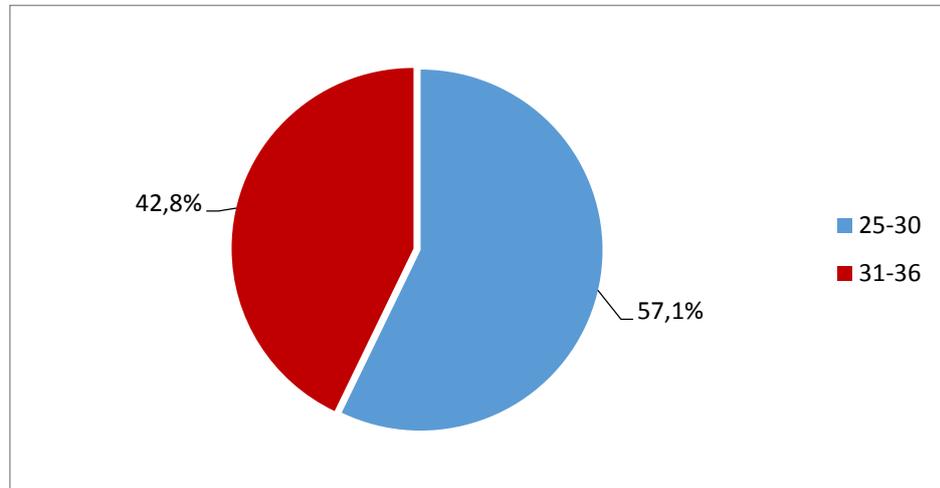


Figura 46. Distribuição dos casos de genótipo F do HBV segundo a faixa etária, em anos.

Quatro dos 11 casos (36,36%) foram do tipo A, sendo 2 casos (50%) do sexo masculino e 2 casos (50%) do sexo feminino. Dois deles estavam na faixa etária de 18-24 anos e os outros dois, na faixa etária de 49-54 anos, com média de 38 anos. Figura 47.

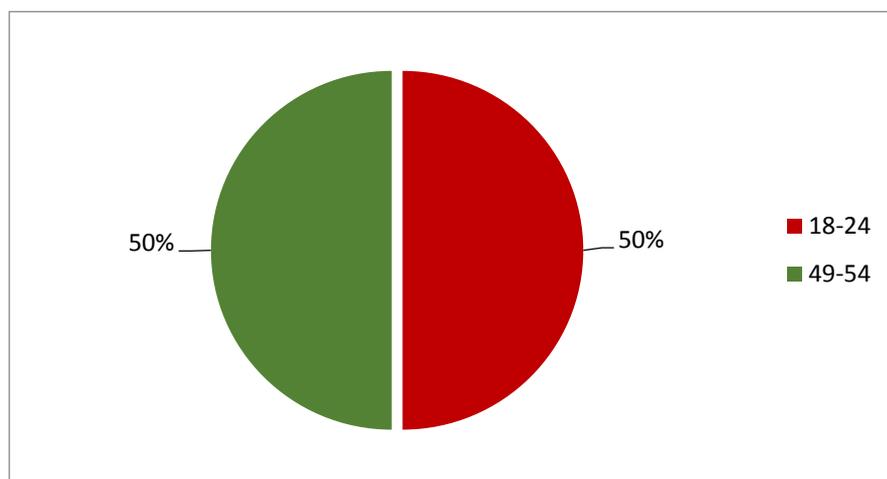


Figura 47. Distribuição dos casos de genótipo A do HBV segundo a faixa etária, em anos.

5.7.2 Determinação da Carga Viral

A carga viral é um exame quantitativo que estima a partir de uma amostra de plasma a quantidade de ácido nucleico viral e assim a quantidade de cópias, presentes no organismo. É, portanto, mais precisa do que a PCR, que é um método qualitativo.

As cargas virais do HBV e HDV foram avaliadas quanto à média e análises correlatas. Foram avaliadas as cargas virais e log₁₀ de acordo com o genótipo do HBV (A ou F) e quanto ao genótipo do HDV. Tabela 15.

Tabela 15. Estudo das cargas virais e log do HBV e HDV.

Exame	Média	Mínimo	Máximo	Mediana	Desvio Padrão
Carga viral HBV (Geral)	599,1	<50	7147	196,5	1431,5
Log HBV (Geral)	2,3	1,7	3,8	2,3	0,5
Carga viral HBV-A	2843,7	<50	7147	503,5	3411,1
Log HBV-A	2,7	1,7	3,8	2,6	0,9
Carga viral HBV- F	334,2	<50	1089	101	388,4
Log HBV-F	2,1	1,7	3,0	2	0,5
Carga viral Delta	54498,9	<75	345.877	14648	97357,8
Log Delta-genótipo 3	4,0	1,8	5,5	4,1	0,9

Analisando a figura 48, verifica-se que os únicos coeficientes de correlação significantes foram entre log carga viral B e idade ($r = 0,45$, p -valor = 0,04) e entre AST e ALT ($r = 0,93$, p -valor = 10^{-11}). Os testes de média de cargas virais de HDV/HBV entre níveis de atividade inflamatória ou de fibrose não foram significantes, bem como as cargas virais de HBV e HDV e o infiltrado inflamatório perissinusoidal; nem cargas virais e fibrose perissinusoidal. Estas avaliações foram prejudicadas possivelmente pelo tamanho da amostra, pois é notada, nos testes de significância, uma tendência à associação.

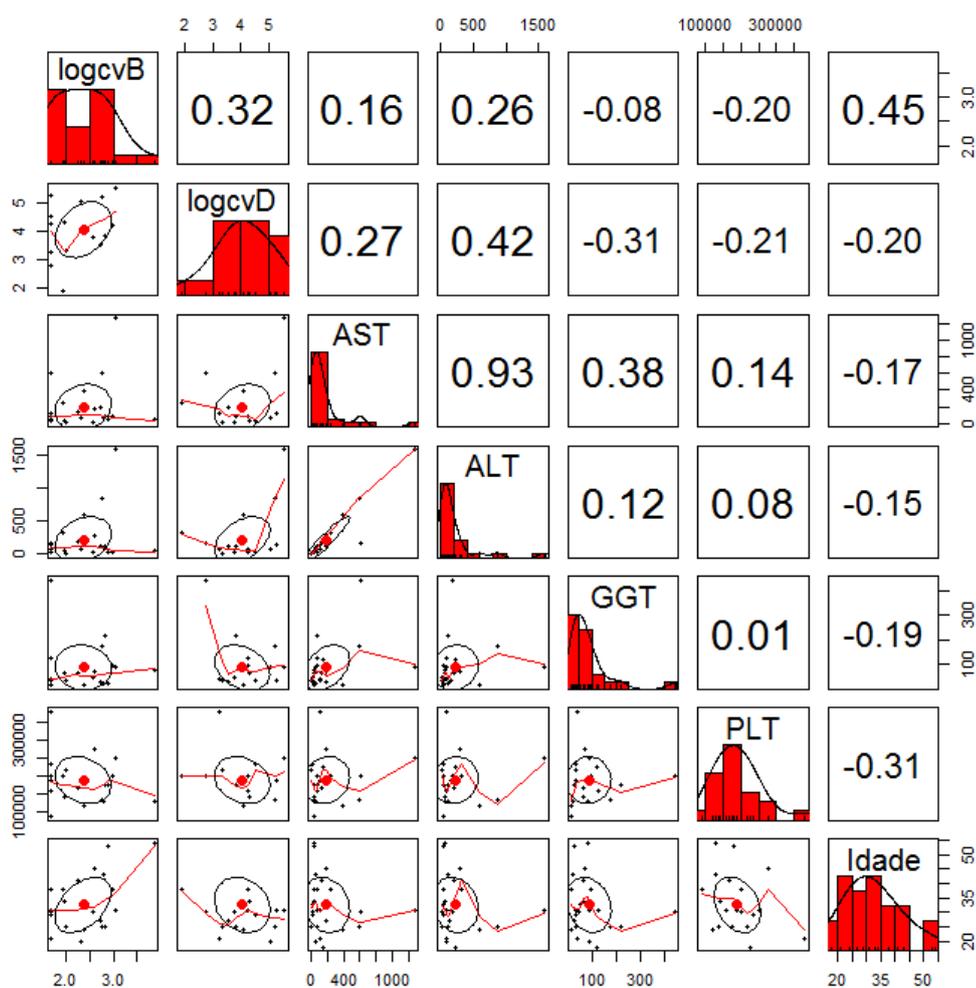


Figura 48: Coeficientes de Correlação de Pearson acima da diagonal, Histogramas na Diagonal e Diagramas de Dispersão abaixo da Diagonal.

5.7.2.1 Quantificação do HDV

A carga viral do HDV por PCR-RT foi realizada em 16 pacientes (66,6%), e variou de <75 UI/mL a 345.877 UI/mL, com valor médio de 57.905,1 UI/mL. O log₁₀ do HDV variou de 1,8 a 5,5 com média de 4,0.

5.7.2.2 Quantificação do HBV

A carga viral do HBV foi avaliada em 22 pacientes (91,66%) e variou de <50 UI/mL a 7.147 UI/mL, com valor médio de 653,59 UI/mL. O log₁₀ do HBV variou de 1,7 a 3,85, com média de 2,3686364.

6. DISCUSSÃO

A endemicidade da hepatite Delta varia em cada região do mundo. No Brasil, São Paulo, tem uma baixa prevalência do HDV, enquanto na Região Amazônica brasileira e entre certos grupos indígenas na Venezuela e região de Santa Marta, na Colômbia, a prevalência desta infecção está entre as maiores no mundo. (KAY et al., 2014; POLISH et al., 1993).

A média de faixa etária desta casuística foi de 32,6 anos, variando de 18 a 54 anos. A média de idade na literatura variou de 15 a 55 anos, com média de 25 anos (BRAGA et al., 2014), o que sugere possível transmissão do HDV nas fases iniciais da vida, superinfectando portadores crônicos do HBV (GOYAL & MURRAY, 2014; LOBATO et al., 2006).

Pesquisas indicam que o HDV está associado à mortalidade precoce (Ministério da Saúde, 2015). Um dos 24 casos deste trabalho, do sexo feminino, 31 anos, foi a óbito devido a complicações da hepatite crônica.

Com relação ao gênero, observou-se concordância com estudos de outras regiões, com predomínio no gênero masculino. Um estudo epidemiológico de Paraná et al. (2006) no oeste da Região Amazônica brasileira teve uma casuística com 67,5% de indivíduos do sexo masculino. BRAGA et al. (2014) relatou 67,2% dos casos no sexo masculino e VATA et al. (2006) na Romênia, também relatou maioria deste gênero. Avaliando-se esta variável (p -valor do teste Qui-quadrado de diferença de proporções = 0,68), verifica-se que não houve diferença estatisticamente significativa a respeito de gênero.

Outros estudos similares em outros locais do mundo mostraram resultados diferentes, mas as características populacionais eram também diferentes: Populações mais velhas, usuários de drogas endovenosas, associação com outros vírus como HCV e HIV (KIESSLICH et.al, 2009; CASEY et al., 1996). Uma pesquisa em pacientes com HBV/HDV mostrou faixa etária variando de 21 a 40 anos, mas com infecção também pelo HIV (SARAVANAN et al., 2013).

Verificamos que 19 pacientes (79,1%), nasceram em área conhecida endêmica: Carauari (no Rio Juruá), Canutama e Lábrea (no Rio Purus) e Humaitá (no Rio Madeira), todas no Estado do Amazonas e Guajará-Mirim (Rio Mamoré), no Estado de Rondônia, com 15 casos (78,9%). As cidades do Amazonas são conhecidas pelas endemias de HDV, previamente estudadas e publicadas por diversos autores, principalmente a região do Lábrea (FONSECA et al., 1992; BENSABATH et al., 1987; BOSHELL et al., 1965).

Dentre as características sociodemográficas, houve concordância com o estudo de Viana quanto à escolaridade. Dez (41,6%) são alfabetizados, 2 (8,3%) são analfabetos e apenas um (4,1%) possui nível superior. Viana et al, (2005) mostrou correlação significativa entre número de anos estudados com a presença de anticorpos anti-HDV, já que 3,4% dos indivíduos tiveram quatro anos ou menos de estudos e 1,5% tinha 5 anos ou mais de estudos.

Dentre os antecedentes pessoais, por ordem decrescente Malária (54,1%), exodontia/tratamento dentário e contato com doentes com hepatite (33,3% cada um), internação, antecedente de cirurgia, injeção por curiosos (20,8% cada um) foram os fatores mais importantes. Malária e outras doenças tropicais tratadas utilizando seringas não descartáveis aumentam o risco de disseminação (CORREA et al., 2011; PARANÁ et al., 1994).

Apesar das vacinas terem apresentado uma boa cobertura, 91,6%, a vacina para hepatite B não foi ministrada na população deste estudo, talvez por habitarem em áreas remotas de difícil acesso (PARANÁ et al., 2006). Estudos atuais revelam diminuição da prevalência da infecção pelo HDV na Itália, sugerindo os autores que tal fato possa ser explicado pela redução de portadores crônicos do HBV, em razão da alta cobertura vacinal contra a hepatite B entre os habitantes daquele país (WU et al., 1995, b).

Dentre os antecedentes familiares, casos de hepatite na família foram informados por 58,3% dos pacientes. Dos 14 casos de relato de hepatite na família, 3 relataram parceiro com hepatite. Os demais relataram irmãos, irmãs, mãe e

sobrinha com hepatite (HBsAg+). A transmissão familiar é referida como uma importante forma de transmissão na Região Amazônica, o que foi possível se comprovar pela similaridade genotípica em casos intrafamiliares de portadores crônicos do HBV aos quais se atribuiu este padrão transmissão ao compartilhamento de objetos pessoais, como escovas de dente (LOBATO et al.,2006; NIRO et al., 1999).

Dentre os fatores de risco, os tóxicos injetáveis e as tatuagens não foram significativos neste estudo, nem no trabalho desenvolvido por HSIEH et al., 2006, um estudo em que predominou o genótipo I. Em áreas de alta endemicidade como o sul da Itália, África e Norte da América do Sul, admite-se que a transmissão ocorra pelo contato de pessoa a pessoa, enquanto em áreas de baixa endemicidade, como os Estados Unidos, a transmissão seja limitada a grupos com frequente exposição a sangue por via percutânea, como usuários de drogas intravenosas e hemofílicos (RIZZETTO et al., 1990).

Estudos realizados em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas sugerem que a transmissão sexual represente o mecanismo mais importante na disseminação do HDV na população (BRAGA et al., 2001). Características como a genética viral e o genótipo influenciam na diferença dos dados, já que as pesquisas citam mais frequentemente o genótipo I (BRAGA et al., 2014).

Dos 24 pacientes acompanhados, 5 (20,8%) apresentavam sinais de hepatite crônica, sendo 3 dos 5 sintomáticos (12,5%): O Metavir variou de A0F1 a A3F3, com 3 casos de F3. Nossos dados estão menores do que o de Paraná et al. (2006), que reportou 47,5% de sintomáticos, sendo que os sintomas mais referidos foram fadiga, dor abdominal, perda de peso, associado a achados laboratoriais de descompensação hepática, em pacientes também com genótipo III. Onze dos 24 pacientes estudados apresentavam características ultrassonográficas sugestivas ou indicativas de doença hepática crônica.

Em uma pesquisa recente, BRAGA et al. (2014) correlaciona a esplenomegalia com a atividade inflamatória, tendo encontrado esplenomegalia em

30% dos pacientes com atividade inflamatória acentuada (A3); 14% de pacientes A3 não apresentaram esplenomegalia. Nesta pesquisa, encontramos 10 casos com esplenomegalia à ultrassonografia, quatro deles associadas à cirrose e 6 casos de esplenomegalia sem cirrose.

Verificou-se, portanto, uma baixa sensibilidade para cirrose (F4), tendo em vista que nenhum dos 4 casos obtiveram comprovação histológica, sendo 2 casos F1, um F2 e um F3, demonstrando maior especificidade do estudo histopatológico na identificação da cirrose, nesta casuística, o que pode ser devido ao tipo de aparelho de ultrassonografia utilizado e/ou à experiência dos profissionais que realizaram o exame, já que na literatura a ultrassonografia é referido como bom método na detecção da cirrose hepática (LESSA, 2008). Também não foi evidenciada, histologicamente, esteatose nos dois casos que a apresentaram na ultrassonografia.

Constatou-se uma relação de esplenomegalia com hepatopatia, sendo mais frequente em pacientes com grau de atividade inflamatória severa (A3) em 3 dos 10 casos, moderada (A2) em 6 casos e fibrose grau 3 (F3) em 5 casos (50%). Assim, levando em consideração o pequeno tamanho da amostra, podemos sugerir que quando encontrada, a esplenomegalia é uma característica preditiva de severidade da hepatopatia.

Houve grande variação da AST (média 193, 1 U/mL, variando de 13 a 1260U/mL), este valor elevado foi visto no caso 12, Metavir A2F3, Genótipo B/F e Genótipo D/III. As transaminases elevadas indicam citólise. Se lesão é superficial, aumenta primeiramente a ALT. Mas se a lesão é profunda e mais grave, eleva-se também a AST (GORINA, 1996). A ALT variou de 11 a 1590 U/mL, no caso 12, com média de 220,3 U/mL. MANOCK et al. (2000) apresentou valores mais elevados, provavelmente devido aos casos de hepatite fulminante por HDV genótipo III, relatados em indígenas no Equador.

Não há nenhuma correlação entre HBV-DNA e níveis de ALT em pacientes com hepatite Delta crônica, sugerindo que o dano nestes pacientes é causado principalmente pelo HDV (SAKUGAWA et al., 2001).

Correlacionando alguns dados bioquímicos com os de outros trabalhos, envolvendo casos de infecção por HDV/HBV ou apenas por HBV (BARROS JUNIOR, 2005), verificamos que bilirrubinas e plaquetas apresentaram-se uniformes entre as pesquisas. As bilirrubinas elevam-se após o aumento das aminotransferases e, nas formas agudas, podem alcançar valores 20 a 25 vezes acima do normal.

A fosfatase alcalina, que tende a se elevar em processos obstrutivos e colestáticos (Ministério da Saúde, 2015) pouco se altera nas hepatites por vírus, exceto se cursar com colestase. Manteve valores médios dentro da normalidade (adultos: 94 a 280 UI/L para adultos) (GORINA, 1996). Tabela 16.

Tabela 16. Exames hematológicos e bioquímicos desta pesquisa x dados de outros trabalhos

Exame	Média, deste trabalho (n=24)	Média de BRAGA et al., 2014, HDV (n=64)	MANOCK et al., 2000, HDV III (n=173)	BARROS JÚNIOR, 2005, tese sobre HBV (n=52)
Hematócrito (%)	37,74	-	-	38,1
AST (U/mL)	193,17	60	233-1950	78,7
ALT U/mL)	220,33	73	122–3706	105,7
GGT (U/L)	88,33	42	-	191,2
Bilirrubina Direta (mg/dl)	0,8113	-	7,9 a 21	1,48
Bilirrubina Indireta (mg/dl)	0,66	0,6		
Fosfatase Alcalina (UI/L)	109,23	-	-	-
Proteínas Totais (g/dl)	7,875	-	-	-
Plaquetas (mm ³)	188.838	155,000	-	189,1

Como trabalhamos com casos selecionados, todos apresentavam anti-HDV total (+). Além disso, a pesquisa nos prontuários evidenciou que 100% eram também HBsAg (+), o que era esperado já que, como é sabido, o HDV necessita do HBsAg para replicação e infectividade, dentre outras funções.

Viana et al, (2005) encontrou uma peculiaridade no seu estudo no Estado do Acre: Uma alta frequência de HDV na ausência de HBsAg em 28 casos. Isso pode indicar uma infecção passada e já resolvida pelo HDV (CHEN et al., 2002). A replicação do HBV parece ter sido suprimida pelo HDV, já que os marcadores sorológicos realizados de rotina para HBV foram indetectáveis (FONSECA, 2002). Desse modo, é possível que o HDV genótipo III interaja de forma diferente com o HBV (VIANA et al., 2005). Lozano et al. (1994), após pesquisa que avaliou aspectos clínicos e histopatológicos da Hepatite Delta Crônica, concluiu que a persistência da replicação do HBV é o maior determinante de dano hepático severo na Hepatite Delta.

Nesta pesquisa, não foi possível diferenciar casos de coinfeção daqueles com superinfecção, devido a ausência de alguns exames, como Anti-HBc IgG e IgM e Anti-HDV IgG e IgM. Além disso, excetuando-se os casos fulminantes, nos casos crônicos não existem diferenças clínicas e bioquímicas distintas entre superinfecção e coinfeção HBV/HDV, apesar de o prognóstico revelar-se bem diferente (Tabela 17).

Tabela 17. Marcadores sorológicos desta pesquisa x dados de outros trabalhos.

Marcador sorológico	% neste trabalho	VIANA et al., 2005	% MANOCK et al., 2000, HDV III	BARROS JÚNIOR, 2005, HBV
Anti-HDV total	100,0	2,5-2,8	70	8
Anti-HBs negativo	91,6	-	-	100
Anti-HBs positivo	4,1	-	-	60,8
HBsAg positivo	100,0	-	-	0
HBsAg negativo	0	-	27	100
Anti-HBc total positivo	95,8	-	96	100
Anti-Hbe positivo	100,0	-	-	56
HbeAg negativo	100,0	-	-	-

O Sistema METAVIR consiste numa avaliação prática e simplificada do material de biópsia e está baseado no grau de atividade inflamatória e grau de fibrose (BEDOSSA et al., 1996). Na nossa casuística houve vários tipos de combinações destas duas variáveis, todos os graus de atividade inflamatória, mas nenhum caso de fibrose grau 4 (F4).

Dentre as células inflamatórias, os linfócitos foram as predominantes (20 casos, 83,3%), seguindo dos plasmócitos (13 casos, 65%), eosinófilos (11 casos, 55%), neutrófilos (6 casos, 30%) e histiócitos (5 casos, 25%).

Vinte dos 24 casos apresentaram os linfócitos no infiltrado inflamatório. De distribuição portal e lobular em 18 casos, cursou com grau de inflamação portal proporcional à lobular em 7 casos. Linfocitose intrassinusoidal foi evidenciada em 16 dos 20 casos, um achado interessante, mas que pode ser vista também em outras formas de Hepatite viral, como HCV, EBV e Paramixovírus. Linfocitose intrassinusoidal foi detectada em 12/51 casos (23,5%), mesmo em áreas de atividade parenquimatosa discreta, sendo mais frequente em biópsias de pacientes com Hepatite C, genótipo 1. (CODES et al., 2003).

Na infecção pelo Epstein Barr Vírus (EBV) observa-se linfocitose intrassinusoidal em fileira indiana, além de corpos apoptóticos e focos de necrose parenquimatosa, podendo ser vistos granulomas. O diagnóstico diferencial é com Leucemias e Linfomas. Na infecção pelo Paramixovírus, vê-se infiltrado inflamatório com células gigantes (DANCYGIR, 2010).

Em 5 dos 20 casos contendo linfócitos no infiltrado inflamatório foram visualizados acúmulos linfóides, sem centro germinativo. Esses acúmulos são característicos de hepatite crônica pré-existente, sendo mais frequentemente observados na hepatite crônica pelo HCV. Codes et al. (2003) relatou que folículos linfóides foram frequentemente observados em biópsias de pacientes etilistas crônicos, quando comparados àqueles que não consomem bebida alcoólica (66% e 24,3%, respectivamente).

Foi evidenciada elevação dos linfócitos no tecido hepático, revelando uma correlação com a elevação da ALT e plaquetopenia, como observado também por outros autores (GRABOWSKY & WEDEMEYER, 2010). Um estudo de Braga et al. (2014) constatou que o aumento da ALT nas hepatites crônicas agudizadas cursam plaquetopenia e grau elevado de atividade inflamatória. Comparando os linfócitos

semiquantificados nos casos deste estudo com ALT e plaquetas, temos o descrito na Tabela 18 (casos destacados).

Neste trabalho, encontramos 6 casos com plaquetopenia, que variou de 90.100 a 143.000/mm³. A contagem normal é de 150.000-350.000/mm³. A ALT estava aumentada em todos os casos que cursaram com plaquetopenia, porém de forma não proporcional. Em dois destes casos a atividade inflamatória era moderada e em outros dois, acentuada. Na pesquisa de Braga et al., 2014, predominou a plaquetopenia.

Tabela 18. Comparação dos linfócitos no tecido hepático x ALT x plaquetas.

Caso nº	Metavir	Linfócitos	ALT (U/mL)	Plaquetas /mm ³
1	A1F2	+	28	235.000
2	A3F3	++	150	190.000
3	A3F3	+++	62	143.000
4	A0F0	+	219	226.000
5	A2F1	++	592	120.000
6	A3F3	++	36	200.000
7	A2F3	++	75	NA
8	A1F2	+	84	158000
9	A3F3	++	123	NA
10	A3F1	++	860	136.000
11	A0F0	+	320	200.000
12	A2F3	++	1590	251.000
13	A3F3	++	178	200.000
14	A2F2	+++	81	380.000
15	A1F1	+	11	218.000
16	A3F3	+++	25	NA
17	A3F3	++	113	175.000
18	A0F1	++	97	129.000
19	A0F2	+*	43	178.000
20	A1F3	+++	53	129.000
21	A2F2	++	201	167.000
22	A1F0	+	27	NA
23	A2F3	++	33	90.100
24	A3F3	+++	287	276.000

NA= Não avaliado; *= Número habitual.

Os plasmócitos são linfócitos B diferenciados. Foram visualizados em treze dos 24 casos (65%), localizados nos espaços-porta, por vezes ultrapassando a interface epitélio-mesênquima. Um caso foi semiquantificado como acentuado, dois como moderados e 10 como discretos. Hepatite delta é, conforme vários relatos

científicos, uma doença imunomediada (WEDEMEYER & MANNNS, 2006; PHILLIP et al., 1994). Uma resposta imune-adaptativa para HBV e HDV parece ser a chave no controle da infecção e na patogênese do HDV (GRABOWSKY & WEDEMEYER, 2010).

A colangite, que pode ser vista em doenças autoimune, como a colangite esclerosante primária, foi detectada à ultrassonografia em um único caso, mas não teve correlação histológica. Não foi possível detectar resposta imune-mediada nos exames, pois resultados de anticorpos (ANA, AML, LKM1, dentre outros) não estavam disponíveis. Além disso, não havia indícios histológicos de colestase em nenhum caso e a fosfatase alcalina não estava elevada (média de 109,23, variando de 13 a 238 UI/L), achados auxiliares para este diagnóstico (GORINA, 1996). Assim sendo, acreditamos ser pouco provável um caso de hepatite autoimune sobreposta, sendo mais aceitável que seja consequência da estimulação do sistema imune pelo HDV (SMEDILE et al. 2002).

Uma dissertação sobre plasmócitos e células estreladas em 33 amostras de hepatite autoimune sugere que os plasmócitos podem estimular as células estreladas hepáticas, que são responsáveis pela fibrogênese hepática, e assim contribuir de maneira indireta na progressão para cirrose, em casos de hepatite autoimune (BRANDÃO, 2005).

Eosinófilos foram visualizados nos espaços-porta em quantidade variável em 11 casos (55%), estando associado à atividade inflamatória acentuada em 7 casos. Estas células têm sido descritas na literatura associados a várias patologias, incluindo a hepatite C, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, síndrome hipereosinofílica primária, rejeição do enxerto e hepatotoxicidade induzida por drogas (TARANTINO et al., 2008). Não encontramos dados sobre eosinófilos e HDV.

A cirrose pelo HDV costuma aparecer em indivíduos mais jovens quando comparada com a cirrose pelo HBV (NOUREDDIN & GISH, 2014). Demonstrou-se a evolução para a cirrose em períodos de 1 a 2 anos após a fase, razão pela qual a

infecção crônica pelo HDV tem sido identificada como a principal causa de cirrose em adultos jovens na Itália e Amazônia. Estudos indicam que o genótipo III do HDV associado ao subtipo F do HBV, como responsáveis por formas graves de hepatite que acometeram militares peruanos na bacia amazônica peruana (CASEY et al., 1996).

As células apoptóticas parecem ter relação com a fibrogênese. Elas incorporam células inflamatórias, células parenquimatosas residentes e células fibrogênicas, particularmente as células estreladas, que são as células-chave na fibrogênese hepática, contribuindo para a apoptose e inflamação (CANBAY et al., 2004). Apoptose é um achado pouco relatado. Paraná et al. (2008) citou apenas um caso com pronunciada apoptose dentre os 9 casos relatados com hepatite Delta.

Foi avaliada a associação entre o grande número de células apoptóticas de nossa casuística com a fibrose encontrada, tanto a portal quanto a perissinusoidal, vista em 22 casos: Apoptose foi evidenciada em número elevado em 18 dos 24 casos e foram numerosas em 5 deles. A associação apoptose com fibrose perissinusoidal foi vista em 19 casos e de apoptose com fibrose portal e/ou porta-porta, em 11 casos (Tabela 19).

Tabela 19. Fibrose x Apoptose nos casos deste estudo.

n	Metavir	Fibrose Portal	Fibrose Porta-porta	Fibrose Perissinusoidal	Apoptose	n	Metavir	Fibrose Portal	Fibrose Porta-porta	Fibrose Perissinusoidal	Apoptose
1	A1F2	+	-	+	+	13	A3F3	-	++	++	+++
2	A3F3	-	+++	+	+	14	A2F2		++	+	++
3	A3F3	-	+++	+	+	15	A1F1	++*	-	+	++
4	A0F0	-	-	+	+	16	A3F3	-	-	+	+
5	A2F1	+++	-	+	+	17	A3F3	-	+++	+	+
6	A3F3	-	++	++	+	18	A0F1	-	++	-	-
7	A2F3	-	++	++	+	19	A0F2	++	-	-	-
8	A1F2	+	-	++	-	20	A1F3	-	-	+	+
9	A3F3	-	+	++	-	21	A2F2	-	-	+	-
10	A3F1	+++*	-	+	++	22	A1F0	-	++	+	+
11	A0F0	-	-	+	-	23	A2F3	-	++	+	+
12	A2F3	-	++	++	++	24	A3F3	-	-	+	+

VCL= veia centrolobular; * Fibrose portal importante

Esse nos pareceu ser um achado histológico de relevância para auxiliar no diagnóstico histopatológico da Hepatite Delta. Contudo, as análises estatísticas para a observação de associações entre apoptose e fibrose portal (p-valor para teste

Exato de Fisher = 0,57), entre apoptose e fibrose portal e porta-porta (p-valor para teste Exato de Fisher = 0,66) ou entre apoptose e fibrose perissinusoidal (p-valor para teste Exato de Fisher = 0,24), não mostrou associação nenhuma entre elas (para um p valor de significância estatística < 0,05).

De relevância em termos de padrão de distribuição de fibrose foram os 3 casos de fibrose portal importante, sem septos. A fibrose exclusivamente portal, sem septos curtos ou septos porta-porta está associada mais frequentemente a Esquistossomose. Contudo, não foram encontradas evidências histológicas e nem epidemiológicas para esta etiologia. Há aumento da severidade das lesões iniciais e uma subsequente evolução para a cirrose em pacientes com necrose em saca-bocado (hepatite de interface) (COOKSLEY et al., 1986), o que parece ser causado por um efeito citopático direto do HDV (COLE et al., 1991), além de algum mecanismo autoimune, o que é sugerido pela presença de vários auto-anticorpos circulantes (PASCARELLA & NEGRO, 2010).

Correlacionado a fibrose com a hepatite de interface, verificou-se que ocorreu necrose em saca-bocado em 4 casos de fibrose perissinusoidal e em 12 casos com fibrose portal e/ou porta-porta e perissinusoidal (Tabela 20). Estatisticamente, foram observadas associações entre variáveis necrose e fibrose portal (p-valor para teste Exato de Fisher = 0,03) e entre necrose e fibrose portal e porta-porta (p-valor para teste Exato de Fisher = 0,005).

Tabela 20. Correlação da Fibrose com a Hepatite de Interface (Necrose em saca-bocado).

n	Met	FP	FPP	FPS	HI	n	Met	FP	FPP	FPS	HI
1	A1F2	+	-	+	-	13	A3F3	-	++	++	++
2	A3F3	-	+++	+	++	14	A2F2		++	+	++
3	A3F3	-	+++	+	++	15	A1F1	++*	-	+	-
4	A0F0	-	-	+	-	16	A3F3	-	-	+	++
5	A2F1	+++	-	+	+	17	A3F3	-	+++	+	++
6	A3F3	-	++	++	++	18	A0F1	-	++	-	-
7	A2F3	-	++	++	+	19	A0F2	++	-	-	-
8	A1F2	+	-	++	-	20	A1F3	-	-	+	++
9	A3F3	-	+	++	++	21	A2F2	-	-	+	+
10	A3F1	+++*	-	+	++	22	A1F0	-	++	+	-
11	A0F0	-	-	+	-	23	A2F3	-	++	+	+
12	A2F3	-	++	++	+	24	A3F3	-	-	+	++

n= caso, Met= Metavir; FP= Fibrose portal, FPP= Fibrose porta-porta, FPS= Fibrose perissinusoidal, HI= Hepatite de interface, *= Fibrose portal acentuada.

As células de Küpffer são macrófagos especializados localizados nos sinusóides hepáticos. A hiperplasia de células Küpffer está associada com apoptose hepatocelular, inflamação e fibrogênese em modelo de estudo da fibrose com camundongos (LIU et al., 2010). A fagocitose de hepatócitos apoptóticos pelas células de Küpffer aumenta a expressão de genes pró-fibrogênicos e substâncias relacionadas à morte celular. A persistência de ativação destas células promove mais apoptose, que culmina com inflamação hepática, geração de quimiocinas CXC e ativação sustentada das células estreladas, que são fibrogênicas (CANBAY et al., 2004).

Dezessete dos 24 casos cursaram com hiperplasia e hipertrofia de células de Küpffer, que tiveram relação com inflamação e fibrose, porém não passível de análise estatística entre hiperplasia e hipertrofia, com o grau de atividade inflamatória ou grau de fibrose. A atividade destes casos variou de A1 a A3 e a fibrose, de F1 a F3.

Células em mórula não foram observadas, o que já era o esperado, pois este tipo de esteatose microvesicular com edema está mais associado à Hepatite Delta Aguda/Fulminante (PARANÁ et al., 2008).

A balonização citoplasmática ou degeneração hidrópica foi observada em 19 casos (79,16%). Esta balonização pode ser causada por um dano mitocondrial induzido pelo vírus ou por algum cofator tóxico desconhecido. Existem evidências para se suspeitar de um possível efeito citopático de cepas específicas do HBV e HDV (PARANÁ et al., 2008)

Da análise dos dados deste estudo, notamos a relação existente entre o HDAg e o HBsAg, já que a replicação do HDV depende da presença do HBsAg. O HBcAg foi o mais prevalente, 20 casos (62,5%), estando associado ao HBsAg nos casos com imunoexpressão positiva para HDAg. O HDAg esteve presente em 58,33% dos 23 casos em que foi realizada a pesquisa. O HBsAg esteve presente em 20,83% dos 22 casos. Figura 49.

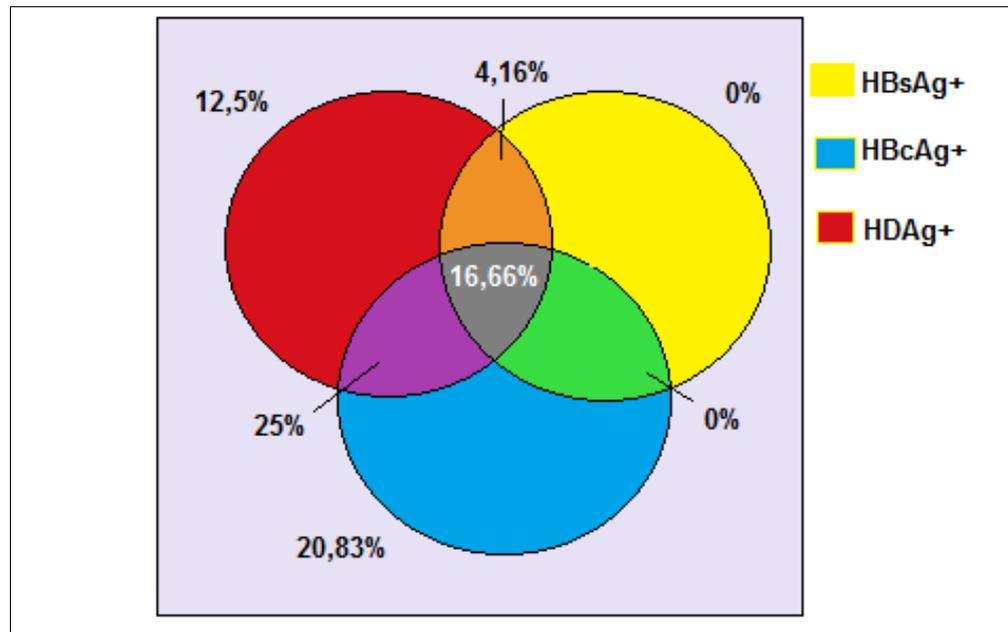


Figura 49. Gráfico mostrando a intersecção de imunoexpressão do HBsAg, HBcAg e HDV do HBsAg, HBcAg e HDV nos casos deste estudo.

Geralmente, a superinfecção pelo HDV tem mostrado suprimir a replicação do HBV, levando a uma diminuição do HBsAg e HBcAg no núcleo e citoplasma dos hepatócitos na superinfecção (PARANÁ et al., 2008), com dano hepático sendo induzido mais pelo HDV do que pelo HBV (PASCARELLA & NEGRO, 2010). Contudo, esse padrão não foi o observado neste estudo, já que o HDV não pareceu ter suprimido o HBV. Já o HBsAg estava diminuído, mas positivo nos casos HDAg positivo.

A imuno-histoquímica para HDAg foi positiva em 14 dos 23 casos (60,86%) em que o exame foi realizado. Notou-se uma relação direta entre a quantidade de HDAg e o grau da atividade inflamatória em 10 destes casos. Em dois casos com atividade severa e um com atividade moderada não foi detectada expressão imuno-histoquímica do HDAg.

A marcação foi nuclear e citoplasmática (Tabela 21). Paraná et al. (2008) relatou positividade do HDAg em 5 dos 9 (55%) casos fulminantes que evoluíram para óbito por hepatite Delta. O HDAg estava localizado principalmente no citoplasma dos hepatócitos, como os outros antígenos.

Tabela 21. Relação dos achados imuno-histoquímicos para HDAg com o grau de atividade inflamatória, necrose em saca-bocado e atividade lobular.

n	HDV	HDV Nuclear	HDV citoplasma	Grau de Atividade	Necrose em saca bocado	Atividade lobular
1	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+++	++	+
3	-	-	-	+++	++	+
4	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	++	+	+
6	+	+	+	+++	++	++
7	++	+	+	++	+	+
8	-	-	-	+	-	+
9	+	++	++	+++	++	++
10	+	+	+	+++	++	++
11	-	-	-	+	-	-
12	++	+	+	++	+	+
13	+++	+	+	+++	++	+++
14	+++	+	++	++	++	++
15	-	-	-	+	-	-
16	++	+	+	+++	++	+++
17	++	+	+	++	++	+
18	+	+	+	++	-	+
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	+++	++	+
21	++	+	+	++	+	+
22	-	-	-	+	-	-
23	++	+	+	+++	+	+
24	NA	NA	NA	+++	++	++

n= número do caso, (-)= negativo, (+)=discreta, (++)=moderada, (+++)= acentuada; NA= Não avaliado.

O vírus é encontrado no núcleo dos hepatócitos e pode, ocasionalmente, ser observado no citoplasma, em fases mais avançadas da doença (FONSECA, 2002; BIANCHI & GUDAT, 1994). As ribonucleoproteínas do HDV mudam continuamente entre o núcleo e o citoplasma. Sobre a permanência viral nas células, foi constatado que a detecção de HDAg nos hepatócitos é possível em 50% dos pacientes cronicamente infectados, por 10 anos ou mais (WU et al., 1995).

Comparando a disposição celular do HDV por imuno-histoquímica com o grau de atividade inflamatória dos casos estudados, verificamos que quanto maior a quantidade de HDAg celular, maior o grau da atividade inflamatória, maior a necrose em saca-bocado e necrose lobular. Nossos achados estão de acordo com a literatura, que mostram haver um efeito citopático direto do HDV nos hepatócitos

(NETTER et al., 1993) induzindo uma inflamação ao redor dos hepatócitos infectados (NEGRO et al., 1988).

Observamos também que poucas células expressaram o antígeno, em células ora próximas, ora distantes umas das outras, o que demonstra que a disseminação da infecção pelo HDV nos hepatócitos é descontínua, e não de célula a célula. Isso também foi observado em pesquisas em camundongos (NETTER et al., 1993).

As células apoptóticas estão associadas também à infecção pelo HDV. Contudo, estas células não tiveram imunoexpressão para os antígenos virais pesquisados, sugerindo uma perda da associação entre replicação viral e este dano celular (NEGRO et al., 1989), possivelmente por perda dos antígenos necessários para a reação imuno-histoquímica após a morte celular.

Testes exatos de Fisher apontaram para associações significantes de atividade lobular com os três padrões de distribuição do HDV na imuno-histoquímica, sendo que para a associação entre HDV e atividade lobular o p-valor foi 0,005144, para HDV nuclear e perinuclear e atividade lobular o p-valor foi 0,02493 e para HDV citoplasmático e atividade lobular o p-valor foi 0,0108. Observou-se ainda associação entre HDV e atividade inflamatória (p-valor= 0.03574).

O HBsAg é positivo para garantir a infectividade da HDV (HUGHES et al., 2011). O padrão membranoso está fortemente ligado à expressão do HBcAg e é um indicador indireto de replicação ativa. O padrão citoplasmático indica replicação ou a eliminação crônica ineficiente do HBsAg do retículo endoplasmático liso em fase pré-S (pré-síntese) (BIANCHI & GUDAT, 1994). A imuno-histoquímica para detecção de HBsAg foi realizada em 7 dos 24 casos e positiva em 5 deles. Em todos os casos, o padrão de marcação foi citoplasmático. O padrão de membrana foi evidenciado em 2 casos HBsAg+, sendo que um foi HBcAg+ no citoplasma e o outro, não teve este marcador avaliado. Segundo Bianchi & Gudat (1994), o padrão membranoso de imunoexpressão do HBsAg é um indicativo indireto de replicação viral.

Observou-se relação direta da graduação do HBsAg com o grau de atividade inflamatória em 5 casos (71,42%), estando o padrão em faixa associado a uma maior atividade inflamatória (A), de moderada a acentuada, e a uma atividade lobular que variou de leve a acentuada. Apenas dois casos sem expressão imuno-histoquímica de HBsAg apresentaram atividade inflamatória, de moderada a acentuada, o que pode ter ocorrido devido a problemas na fixação ou processamento histológico da amostra. Paraná et al (2008) identificou o HBsAg em 7 dos 9 casos de hepatite delta fulminante em que o HBsAg estava disperso no parênquima hepático e em células em mórula, porém não fez referência a padrão de distribuição em faixa (Tabela 22).

Tabela 22. Relação dos achados imuno-histoquímicos do HBsAg com a atividade inflamatória, necrose em saca-bocados e atividade lobular.

Caso nº	HBsAg	HBsAg Citoplasma	HBsAg Membrana	Metavir	Grau de Atividade	Necrose em saca bocado	Atividade lobular
1	+*	+	-	A1F1	+	-	-
2	+++*	+++	+++	A3F1	+++	++	+
7	+*	++	-	A2F3	++	+	+
10	+++*	+++	-	A3F1	+++	++	++
13	+++*	+++	+	A3F2	+++	++	+++

* Padrão de distribuição em faixa de hepatócitos.

Numa associação dos resultados da imuno-histoquímica para HBsAg com a fibrose, não se observou nenhum padrão específico (Tabela 23).

Tabela 23: Relação dos achados imuno-histoquímicos do HBsAg com a fibrose hepática.

Caso nº	HBsAg	HBsAg Citoplasma	HBsAg Membrana	Metavir	Fibrose portal	Fibrose portal e porta-porta	Fibrose Perissinusoidal
1	+	+	-	A1F1	+	-	+
2	+++*	+++	+++	A3F1 A2F3	-	+++	+
7	+*	++	-		-	++	++
10	+++*	+++	-	A3F1	+++*	-	+
13	+++*	+++	+	A3F2	-	++	++

* Padrão de distribuição em faixa de hepatócitos.

O encontro de HBcAg no citoplasma dos hepatócitos significa células com replicação viral ativa (BIANCHI & GUDAT, 1994). O HBcAg nuclear, encontrado em apenas 1 dos 20 casos (Metavir A1F3) em que a reação imuno-histoquímica para HBcAg foi realizada e provavelmente representa um acúmulo de nucleocapsídeos vazios, enquanto o HBcAg citoplasmático, encontrado em 15 dos 20 casos (62,5%), reflete replicação ativa (BIANCHI & GUDAT, 1994). Estes achados frequentemente estão associados com sinais de doença ativa, como necrose em saca-bocado e atividade lobular, como os observados neste estudo.

O HBcAg esteve presente em 5 dos 9 casos (55%) de Hepatite Delta da região do Lábrea, no Amazonas, e foi visto primariamente no núcleo dos hepatócitos, mas também marcou fracamente o citoplasma em dois dos nove casos estudados (PARANÁ et al., 2008).

Ocorreu em casos com atividade A1 (4 casos), A2 (4 casos) e A3 (4 casos) e também em 3 casos sem atividade inflamatória (A0). Quanto a correlação com a fibrose, foi observado em casos F3 em 7 casos, F2 em 3 casos, F1 em 2 casos e F0 em 3 casos. Estava associado ao HDV em 41,66% dos casos e com o HBsAg em 16,66% dos casos (Tabela 24).

Tabela 24. Relação dos achados imuno-histoquímicos do HBcAg com o Metavir.

N	Metavir	HBcAg	HBcAg Nuclear	HBcAg Citoplasma	N	Metavir	HBcAg	HBcAg Nuclear	HBcAg Citoplasma
1	A1F2	+++d	-	+	12	A2F3	+d	-	+
2	A3F3	++d	-	+	16	A3F3	+d	-	+
4	A0F0	++d	-	+	18	A0F1	+d	-	+
7	A2F3	+++d	-	+	20	A1F3	+	+	-
8	A1F2	+d	-	+	21	A2F2	+d	-	+
9	A3F3	++d	-	+	22	A1F0	++d	-	+
10	A3F1	++d	-	+	23	A2F3	++d	-	+
11	A0F0	++d	-	+					

Embora todos os pacientes do nosso estudo apresentassem marcador sorológico HbeAg negativo, indicando inatividade na replicação viral, os resultados imuno-histoquímicos nos revelam uma atividade replicativa importante nestes pacientes. Isto sugere que o marcador HbeAg nos pacientes coinfectados HBV/HDV não seja a melhor forma de avaliar a replicação do HBV.

Nosso estudo mostrou uma prevalência do genótipo III, em todos os 17 casos estudados. Paraná et al. (2006) detectou genótipo I em 55% e genótipo III em 45% dos casos de Hepatite Delta. Ele notou uma distribuição bimodal, com genótipo III mais prevalente na faixa etária de 21-30 anos.

A maior parte de nossa casuística foi de indivíduos jovens. Analisando o genótipo do HBV, foi evidenciado também este padrão bimodal: Uma maior prevalência do genótipo F entre 25 e 34 anos e do genótipo A nos extremos de idade (21-24; 53-54 anos).

Correlacionado faixa etária, com Metavir (fibrose) e genótipos de B (Tabela 25), notamos que 4 dos 7 casos de genótipo F apresentavam fibrose moderada (F3), na faixa etária de 30-34 anos. O genótipo F predomina em regiões com maior população indígena, sustentando a hipótese de que este genótipo é peculiar de populações ameríndias (BLITZ et al., 1998).

Tabela 25. Correlação dos genótipos de HBV e HDV com o Metavir.

N	Idade	Metavir	Genótipo B	Genótipo D	N	Idade	Metavir	Genótipo B	Genótipo D
1	29	A1F2	F	3	5	24	A2F1	A	3
2	31	A3F3	F	3	14	21	A2F2	A	3
3	34	A3F3	F	3	19	53	A0F2	A	NA
10	25	A3F1	F	3	20	54	A1F3	A	NA
12	31	A2F3	F	3					
15	25	A1F1	F	3					
16	30	A3F3	F	3					

NA= Não avaliado

Quanto aos genótipos do HDV, estudos de biologia molecular têm apontado que a infecção pelo HDV III tem tido manifestações mais graves do que aquelas pelos genótipos I ou II. Os genótipos I e III são os prevalentes na Amazônia Brasileira (PARANÁ et al., 2006). A associação entre genótipo III do HDV e o F do HBV já foi citada por diversos autores como a responsável pelas formas mais graves desta infecção (KIESSLICH et al., 2009; CASEY et al., 1996).

O genótipo III do HDV, único encontrado nesta casuística, é encontrado apenas na Região Amazônica e tem provável origem em indígenas da América do Sul. O genótipo I do HDV provavelmente entrou na região amazônica durante o ciclo da borracha, primeiro grande contato dos indígenas com não-indígenas (PARANÁ et al., 2006).

Estudos mostram que manter a carga viral o mais baixa possível durante o máximo de tempo diminui as complicações, retarda a evolução e complicações da doença e prolonga a sobrevida. A carga viral é dada por mL de sangue (LabTests, 2015).

O log do HBV-genótipo A foi 2,70 (1,7-3,85). O log do HBV-genótipo F foi 2,193 (1,7-3,04). Nota-se, portanto, uma carga viral maior nos casos de genótipo A. A relação log D/log B variou de 0,96 a 3,1, com média de 1,85, ou seja, um predomínio de HDV nas amostras, mostrando um maior número de cópias do HDV. Já é conhecido que quando o HDV está se replicando, há uma diminuição da replicação do HBV (BUTI et al., 2011). BRAGA et al. (2014) apresentou pesquisa com média de log 10 do HDV de 1,8 entre pacientes com infecção HBV dominante. Em pacientes com replicação do HDV dominante, a média do log 10 do HDV foi de 4.408 cópias/mL. Em pacientes com HBV comparável com HDV, a média do log 10 da carga viral foi de 2,07 cópias. O Log HBV médio foi 2,36 (variando de 1,7 a 85) e do HDV médio foi de 4,04 (1,88 a 5,54). Foi possível fazer a correlação em 16 dos 24 casos.

7. CONCLUSÃO

- Os aspectos histológicos da infecção HBV/HDV identificados foram mais brandos do que os registrados em outros locais, pois esta casuística incluiu apenas casos de hepatite crônica. Os achados clássicos de Hepatite Delta são vistos na forma aguda e na fulminante.
- O genótipo III do HDV predominou nesta casuística e foi considerado o responsável pelas formas graves de hepatite, especialmente quando associado com o genótipo F do HBV.
- Não foram observadas formas graves, mas foi confirmada a atividade inflamatória acentuada e rápida progressão da fibrose hepática em pacientes jovens, sugerindo pior evolução.
- Sugere-se que uma série de mecanismos fibrogênicos, incluindo o elevado número de células apoptóticas, fibrose perissinusoidal, infiltrado inflamatório rico em plasmócitos e eosinófilos, acelerem a progressão para a cirrose na hepatite Delta. Devido ao tamanho da amostra, estas associações não foram confirmadas.
- Acreditamos que degeneração hidrópica exuberante, corpos apoptóticos frequentes, fibrose perissinusoidal importante, infiltrado inflamatório rico em plasmócitos e eosinófilos, linfocitose perissinusoidal e atividade lobular são achados inespecíficos e podem ser vistos em diversas hepatopatias, mas em conjunto auxiliam na caracterização histopatológica da Hepatite Delta em Rondônia. Os estudos estatísticos não puderam confirmar estas associações devido ao tamanho da amostra.
- As células apoptóticas estão associadas também à infecção pelo HDV. Contudo, não expressaram os antígenos virais pesquisados, possivelmente por perda dos antígenos necessários para a reação imuno-histoquímica após a morte celular.
- A distribuição do HDAg nos hepatócitos, por imuno-histoquímica, foi descontínua e esparsa, em todas as amostras, o que sugere que não há infecção célula a célula.

- O padrão de expressão em faixa observado nos casos HBsAg (+), por imuno-histoquímica, esteve relacionado com maior atividade inflamatória e maior grau de fibrose.
- A imuno-histoquímica para HBcAg evidenciou replicação do HBV em pacientes com sorologia HBeAg (-). Isto sugere que este marcador sorológico, nos pacientes coinfectados HBV/HDV, não seja a melhor forma de avaliar a atividade replicativa do HBV.
- O HDV não pareceu ter suprimido o HBV. Já o HBsAg estava diminuído, mas positivo nos casos HDAg positivo.
- Houve maior carga viral em pacientes com genótipo A do HBV.
- Não houve correlação da ALT com o Metavir e carga viral para HDV.
- Houve associação significativa entre HDV e atividade inflamatória, principalmente atividade lobular, um achado com significância para o diagnóstico histopatológico de hepatite delta.
- Nesta casuística, a esplenomegalia mostrou-se uma característica preditiva de severidade da hepatopatia.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS Z, AFZAL R. **Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review.** World J Hepatol 2013; 5(12): 666-675.

ALVARADO-MORA MV, LOCARNINI S, RIZZETTO M, PINHO JR. **An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment.** Antivir Ther. 2013; 18(3 Pt B):541-8.

ANDRADE, Z.A.; LESBORDES, J.L.; RAVISSE P.; PARANÁ, R.; PRATA A.; BARBERINO J.S.; TREPO C. **Fulminante hepatitis with microvesicular steatosis (a histologic comparison of cases occurring in Brazil- Labrea hepatitis- and in Central África- Bangui Hepatitis.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 25(3):155-160, jul-set, 1992.

ANDRADE GB, RIET-CORREA F, MONTES GS, BATTLEHNER CN, SALDIVA PH. **Dating of fibrotic lesions by the Picrosirius-polarization method. An application using the lesions of Lechiguana (bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis).** Eur J Histochem. 1997; 41 (3):203-9.

ARAGONA M, CAREDA F, LAVARINI C et al. **Serological response to the hepatitis Delta virus in hepatitis D.** Lancet, v.2, p. 478-480, 1987.

BARROS JUNIOR, GM. **HEPATITE CRÔNICA B OCULTA: Estudo clínico, epidemiológico, histopatológico e molecular em doentes com diagnóstico de hepatite crônica da demanda da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas. Orientador: Prof. Dr. Wornei Silva Miranda Braga, 90 p. MANAUS, 2005.

BATTS KP, LUDWIG J. **Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting.** Am. J. Surg. Pathol. 1995; 1409-1417.

BAHCECIOGLU I.H. et al. **Pegylated Interferon α Therapy in Chronic Delta Hepatitis: A One-Center Experience.** Hepat Mon. 2015 March; 15(3): e24366.

BEDOSSA P, POYNARD T., METAVIR Cooperative Study Group. **An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C.** Hepatology. 1996; 24:289-293.

BIANCHI, L, GUDAT, F. **Chronic hepatitis. In: The Pathology of the Liver.** 3^a ed. Churchill Livingstone, Edinburgh; 1994:349–395.

BOSHELL, JM. **Report on the Labrea region epidemic September-November, 1965.** In; Belem Virus Laboratory Annual Report, Belém, Pará, FSESP, 1965.

BOTELHO-SOUZA LF, DOS SANTOS AO, BORZACOV LM, HONDA ER, VILLALOBOS-SALCEDO JM, VIEIRA, DS. **Development of a reverse transcription quantitative real-time PCR-based system for rapid detection and quantitation of hepatitis delta virus in the western Amazon region of Brazil.** Journal of Virological Methods. v. 197, p. 19-24, 2014, a.

BOTELHO-SOUZA, LF. **Análise molecular do vírus da hepatite Delta: Desenvolvimento de transcrição reversa-PCR em tempo real e nested PCR-RFLP para quantificação e genotipagem viral.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre. Orientadora: Dra. Deusilene Souza Vieira. Porto Velho, 2014, b.

BRAGA WS, OLIVEIRA, CMC, ARAUJO JR, CASTILHO MC, ROCHA JM, GIMAQUE JBL, SILVA MLCR, VASCONCELOS HL, RAMASAWMY R, PARANÁ R. **Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage – a case series of HDV-3 patients.** Journal of Hepatology, 2014 vol. 61, p. 1205–1211.

BRAGA WS, CASTILHO MDA C, BORGES FG. **Hepatitis D virus infection in the Western Brazilian Amazon - far from a vanishing disease.** Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45:691–5.

BRAGA WSM, BRASIL LM, SOUZA RAB, CASTILHO MCC, FONSECA JCF. **Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 34: 349-355, 2001.

BUTI M, HOMS M, RODRIGUEZ-FRIAS F, FUNALLERAS G, JARDÍ R, SAULEDA S, et al. **Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: a long-term follow-up study.** J Viral Hepat 2011;18:434–442.

BRAGA, WSM. **Infecção pelos vírus das hepatites B e D entre grupos indígenas da Amazônia Brasileira: aspectos epidemiológicos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical [0037-8682] 2004 vol:37 iss:suppl 2 pg:9 -13.

BRAGA WSM, BRASIL LM, SOUZA RAB, CASTILHO MCC, FONSECA JCF. **Ocorrência da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) e delta (VHD) em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 34: 349-355, 2001.

BRANDÃO, DN. **Relação entre plasmócitos e células estreladas hepáticas na Hepatite Autoimune.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina. Área de Concentração: Patologia Orientadora: Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho Ribeirão Preto, 2005.

BUITRAGO, B.; POPPER, H.; HADLER, S. C.; THUNG, S. N.; GERBER, M. A.; PURCELL, R. H. & MAYNARD, J. E., 1986. **Specific histologic features of Santa Marta hepatitis: A severe form of hepatitis delta-virus infection in northern South America.** Hepatology, 6:1285-1291.

CANBAY A, FRIEDMAN S, GORE GJ. **Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis.** Hepatology. Vol. 39, pag. 273–278, 2004.

CASEY JL, BROWN TL, COLAN EJ, WIGNALL F, GERIN JL. **A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern America.** Proceedings of the National Academy of Science USA 90: 9016-9020, 1993.

CASEY JL, NIRO GA, ENGLE RE, et al. **Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F.** The Journal of Infectious Diseases, 174:920-926, 1996.

Centers for Disease Control and Prevention. **Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases.** 7th ed. Atlanta; 2002.

CHEN YC, SHEEN IS, CHU CM, Liaw YF. **Prognosis following spontaneous HbsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection.** Gastroenterology 2002, 123: 1084–1089.

CODES L, FREITAS, FREITAS LAR, Santos- Jesus R , Vitvitski L, SILVA LK, TREPO C, REIS MG, PARANÁ R. **Comparative Study of Hepatitis C Virus Genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2003;7(6):409-417.

COLE SM, GOWANS EJ, MACNAUGHTON TB, HALL PD, BURRELL CJ. **Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen.** Hepatology 1991; 13: 845–51.

COOKSLEY WG, BRADBEAR RA, ROBINSON W, HARRISON M, HALLIDAY JW, POWELL LW, NG HS, SEAH CS, OKUDA K, SCHEUER PJ, et al. **The prognosis of chronic active hepatitis without cirrhosis in relation to bridging necrosis.** Hepatology. 1986 May-Jun;6 (3):345-8.

CRAWFORD JM; LIU C. **Fígado e Trato Biliar.** In: Robbins e Cotran. Bases Patológicas das doenças/ Vinay Kumar et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 872-873.

DANCYGIR, H. **Viral Infections by non hepatotropic viroses.** In: Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobilir Diseases. Vol. 2, p. 826-827. New York: Springer, 2010.

DEGERTEKIN H., YALÇIN K, YAKUT M. **The prevalence of hepatitis delta virus infection in acute an chronic liver diseases in Turkey: an analysis of clinical studies.** Turk J Gastroenterol 2006; 17:25-34.

DESMET VJ; ROSAI J. **Liver: Non-neoplastic diseases, tumor and tumorlike conditions.** In: Surgical Pathology, vol.1, 9^a ed., pg. 920-957. China: Elsevier , 2004.

DIENES HP, PURCELL RH, POPPER H, PONZETTO A. **The significance of infections with two types of viral hepatitis demonstreded by histologic features in chimpanzees.** J. Hepatol. 1990; 1990:77-84.

European Association for the study of the liver: **EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis.** B. J. Hepatol 2009; 50:227-42.

EROL S, OZKURT Z, ERTEK M, TASYARAN MA. **Intrafamilial transmission of hepatitis B virus in the eastern Anatolian region of Turkey.** Eur. J.Gastroenterol. Hepatol. 2003; 15: 345–9.

EWING B, GREEN P: **Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities.** Genome Res 1998, 8:186-194.

FARCI P. **Delta hepatitis: an update.** J Hepatol. 2003; 39 Suppl 1: S212–9.

FARCI P, NIRO GA. **Clinical features of hepatitis D.** Semin Liver Dis. 2012;32:228-36.

FATTOVICH, G et al. **Influence of hepatitis delta virus infections on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B.** J.Infect.Dis. 155, 931-935 (1987)

FONSECA, JCF. **Manual de diagnóstico sorológico das hepatites virais**, pg. 60-69, Bristol Myers Squibb, São Paulo, 2009.

FONSECA, JCF, **Hepatite D**. Tratado de Infectologia, Ricardo Veronesi e Roberto Focaccia, vol. 1, pág. 325-333, 2ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, 2002.

FONSECA JCF. **Hepatite D- artigo de revisão**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.35 n.2 Uberaba mar./abr. 2002.

FONSECA JCF, BRASIL LM, CASTILHO MC, BOTELHO R, BRAGA WM, FERREIRA LC. **Fulminant hepatitis and microvesicular steatosis (morula-like cells). A study in children and adolescents**. Hepatology 30:284A, 1999.

FONSECA JCF, BRASIL LM, CASTILHO MC, BRAGA WSM, SOUZA RAB, FERREIRA LCL. **Hepatitis delta virus (HDV) infectious in the Brazilian Amazon basin and its role in chronic liver disease**. Hepatology 19: 63I, 1994.

FONSECA JCF. **Hepatite Delta**. In: Fonseca JCF (ed) Hepatite Delta. Imprensa Universitária, Manaus, AM, p.1-66. 1993.

FONSECA JCF, FERREIRA LCL, BRASIL LM, CASTILHO MC, MOSS R, BARONE M. **Fulminant Labrea hepatitis: Role of HAV, HBV and HDV infection**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 34: 609-612, 1992.

FONSECA JCF, SIMONETTI SRR, SCHATZMAYR HG, et al. **Prevalence of infection with hepatitis Delta virus (MOV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higyene, 82:469-471, 1988.

FONSECA JCF. **Epidemiologia das hepatites B e Delta na Região Amazônica**. Skopia, 23:28-32, 1986.

FREITAS N, CUNHA C, MENNE S, GUDIMA S O. **Envelope Proteins Derived from Naturally Integrated Hepatitis B Virus DNA Support Assembly and Release of Infectious Hepatitis Delta Virus Particles.** Journal of Virology, Volume 88, número 10, p. 5742–5754, 2014.

GAETA GB, STROFFOLINI T, CHIARAMONTE M, et al. Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. Hepatology 2000; 32:824-7.

GAST-GALVIS, A. - **Viscerotomia en Colombia (Resultado del exâmen histopatologico de 22 000 muestras de higado humano).** Rev. Méd. (Bogotá) 553.554:1'44,1945.

GISH RG, LOCARNINI S. **Genotyping and genomic sequencing in clinical practice.** Clinics in liver disease. 2007; 11 (4): 761-95, VIII.

GONÇALVES, REGINA. **Hepatite D.** Disponível em:

<http://www.aidsportugal.com/Modules/WebC_Docs/GetDocument.aspx?DocumentId=260&Version=2> acesso em: 30 de junho de 2010.

GOMES-GOUVÊA, MS; SOARES MCP, MELLO IMVGC; BRITTO EMF, MOIA LJMP; BENSABATH G; NUNES HM, CARRILHO FJ, PINHO JRR. **Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin.** Acta Tropica, Elsevier, 2008.

GORINA, A B. **Provas funcionais hepáticas.** In: A Clínica e o Laboratório. Cap. 17. p. 253-262. 16ª ed. Rio de Janeiro: Medsi editora,1996.

GOVINDARAJAN S, FIELDS HA, HUMPHREY CD et al. **Pathologic and ultrastructural changes of acute and chronic Delta hepatitis in experimentally infected chimpanzees.** Am. J. Pathol., v. 122, p. 315-022, 1986.

GOYAL A & MURRAY JM. **The Impact of Vaccination and Antiviral Therapy on Hepatitis B and Hepatitis D Epidemiology.** Plos One. Outubro 2014, Volume 9, Issue 10, e110143.

GRABOWSKY J & WEDEMEYER H. **Hepatitis Delta: Immunopathogenesis and Clinical Challenges.** Dig. Dis.2010; 28: p. 133-138.

Guidelines on the use of Liver Biopsy in Clinical Practice. British Society of Gastroenterology, October, 2004. Disponível em: <<http://www.bsg.org.uk/clinical-guidelines/liver/guidelines-on-the-use-of-liver-biopsy-in-clinical-practice.html>>. Acesso em: 15 de abril de 2011.

HADLER SC, MONZON M, PONZETTO A et al. **Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela.** Ann. Intern. Med., v. 100, p. 339-44, 1984.

HADZIYANNIS SJ. **Hepatitis Delta: an overview.** In: Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, et al. Editors. Viral Hepatitis and Liver Disease. Turin, Italy: Minerva Medica, p. 283-289, 1997.

Hepcentro, 2015. **Hepatites D e Fluxograma para o diagnóstico da infecção aguda pelo HDV.** Disponível em: <http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm>. Acesso em 01 nov. 2015.

HSIEH TH, LIU CJ, CHEN DS, CHEN PJ. **Natural course and treatment of hepatitis D virus infection.** J Formos Med. Assoc 2006; 105: 869–81.

HUANG YH, WU JC, TAO MH, et al. **DNA-Based immunization produces Th1 immune responses to hepatitis delta virus in a mouse model.** Hepatology 2000;32:104–10.

HUGHES S, WEDEMEYER H, HARRISON ML. **Hepatitis delta vírus**. The Lancet. Publicação online, de 20 de abril de 2011. Acesso em <www.thelancet.com> em 30 de julho de 2015. DOI:10.1016/S0140-6736 (10)61931-9

JUNIOR, LEONIDAS BRAGA DIAS. **Hepatopatias fulminantes/febres hemorrágicas na Amazônia: revisão histórica, padrões de lesão hepática e diagnóstico etiológico**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Patologia. Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves. 172p. São Paulo, 2005.

KAY A, MELO DA SILVA E, PEDREIRA H, NEGREIROS S, LOBATO C, BRAGA W, MUWONGE R, DENY P, REIS M, ZOULIM F, TREPO C, D'OLIVEIRA JR A, SALCEDO JMV, SCHINONI MI & PARANÁ R. **HBV/HDV co-infection in the Western Brazilian Amazonia: an intriguing mutation among HDV genotype 3 carriers**. Journal of Viral Hepatitis, 2014: 1-5. doi:10.1111/jvh.12267

KIESSLICH D, CRISPIM MA, SANTOS C, FERREIRA FL, FRAIJI NA, KOMNINAKIS SV et al. **Influence of hepatitis B vírus (HVB) genotype on the clinical course of diseases in patients coinfecting with HBV and hepatitis Delta vírus**. J. Infect. Dis. 2009; 199: 1608-1611.

KORSMAN S, ZYL GU, NUTT L, ANDERSSON MI, PREISER W. **Vírus da Hepatite Delta**. In: Virologia. P. 164-166. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

KUCIRKA LM, FARZADEGAN H, FELD JJ, et al. **Prevalence, correlates, and viral dynamics of hepatitis delta among injection drug users**. J. Infect. Dis. 2010; 202:845-52.

KWOK S, HIGUCHI R. **Avoiding false positives with PCR**. Nature 1989; May 18;339(6221):237-8. Errata in Nature 1989; Jun 8; 339(6224):490.

LAB TESTS, 2015. **Carga Viral**. Disponível em:

<http://www.labtestsonline.org.br/understanding/analytes/viral-load/tab/test/>. Acesso em 15 de dez. 2015.

LAUBER K, BOHN E, KROBER SM, XIAO YJ, BLUMENTHAL SG, LINDEMANN RK, MARINI P, et al. **Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-mediated release of a lipid attraction signal**. Cell 2003;113: 717–730.

LE GAL F; GAULT E; RIPAULT MP; SERPAGGI J; TRINCHET JC; GORDIEN E; DENY P. **Eighth Major Clade for Hepatitis Delta Virus**. Emerging Infectious Diseases, vol.12, n.9, 2006.

LESSA, Andréia de Seixas. **Ultrassonografia na avaliação de um modelo experimental de esteatose e cirrose em ratos Wistar**. Radiol Bras, São Paulo, v. 41, n.2, p.98, Apr. 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-39842008000200020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 24 Nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-39842008000200020>.

LIAO FT, LEE YJ, KO JL, et al. **Hepatitis delta virus epigenetically enhances clusterin expression via histone acetylation in human hepatocellular carcinoma cells**. J Gen Virol 2009; 90(Part 5): 1124–34.

LINDH M; HANNOUN C; HORAL P; KROGSGAARD K. **Interpreted Study Group. Virological response to interferon therapy oh chronic hepatitis B as measured by a higly sensitive assay**. J Viral Hepat. 2001 Sep 8(5)349-57

LIU C, TAO Q, SUN M, WU JZ, YANG W, JIAN P, PENG J, HU Y, LIU C, LIU P. **Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats**. Laboratory Investigation (2010) 90, 1805–1816.

LOBATO C; TAVARES-NETO J; RIOS-LEITE M; TREPO C; VITVITSKI L; PARVAZ P; ZOULIM F; D'OLIVEIRA JR A; PARANÁ R. **Intrafamilial prevalence of hepatitis**

B virus in Western Brazilian Amazon region: Epidemiologic and biomolecular study. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 21 (2006) 863-868.

LOZANO JL, CRESPO J, DE LA CRUZ F, CASAFONT F, LOPEZ-ARIAS MJ, MARTIN-RAMOS L, PONS-ROMERO F. **Correlation between hepatitis B viremia and the clinical and histological activity of chronic delta hepatitis.** Med Microbiol Immunol, 1994, 183(3):159-67.

LUNA LG. **Methods for connective tissue.** Manual of Histologist Staining of the Armed Forces Institute of Pathology. 3. Ed. New York: Mc-Graw-Hill Book Company, 1968.

MCGILL, D.B., RAKELA, J. et al. (1990). **A 21-year experience with major haemorrhage after percutaneous liver biopsy.** Gastroenterology, 99:1396–1400.

MELE A, MARIANO A, TOSTI ME, et al. **Acute hepatitis delta virus infection in Italy: incidence and risk factors after the introduction of universal anti-hepatitis B vaccination campaign.** Clin. Infect. Dis. 2007; 44:e17-24

MIRSHAFIEE H E SHOOSHTARI MM, SHARIFI Z, HOSSEINI SM. **Genotype Analysis of Hepatitis Delta Virus from Hepatitis B Surface Antigen Positive Patients Using PCR-RFLP in Tehran, Iran.** Arch Iranian Med, 2009.

Ministério da Saúde, 2010. **Hepatites virais: O Brasil está atento. Série B. Textos Básicos de Saúde.** 2ª edição. Brasília, 2005. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/hepatites_virais_brasil_atento.pdf> .

Acesso em: 02 fev. 2010.

Ministério da Saúde, 2015. **Hepatites Virais.** Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/07_0044_M2.pdf.

Acesso em 01 nov. 2015.

MITSUNAGA S., FUJIMURA K., MATSUMOTO C., HIRAKAWA S., NAKAJIMA K., TADAKORO K., JUJI T. **High Throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its application to analysis of transfusion hepatitis.** Transfusion 2002; 42:100-106.

MONTES G.S. E JUNQUEIRA, L.C.U. **The use of the picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 86, Supp. III, 1-11, 1991.

MONTES G.S. **Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems.** Cell Biol Int. 1996 Jan; 20(1):15-27.

MYLLEY AG, SILVERSTEIN MDD, DIENSTAG JL. **Indications for use hepatitis B vaccine based on cost-effectiveness analysis.** New England Journal of Medicine 307:644-652, 1982.

NAVASCUÉS CA, RODRIGUEZ M, SOTORRIO NG et al. **Epidemiology of hepatitis D virus infection: changes in the last 14 years.** Am J. Gastroenterol. 1995; 90:1981-4.

NEGRO F, RIZZETTO M. **Diagnosis of hepatitis delta virus infection.** Journal of Hepatology 22:136-139, 1995.

NEGRO F, BONINO F, BISCEGLIE A, HOOFNAGLE JH, GERIN JL. **Intrahepatic markers of hepatitis delta virus infection: A study by in Situ hybridization.**Hepatology. Vol. 10, 6, Dec. 1989, Pag. 916–920.

NEGRO F, BALDI M, BONINO F, et al. **Chronic HDV (hepatites delta virus) hepatitis. Intrahepatic expression of delta antigen, histologic activity and outcome of liver disease.** J Hepatol 1988; 6: 8–14.

NETTER H J, KAJINO K, TAYLOR J M. **Experimental transmission of human hepatitis delta virus to the laboratory mouse.** J Virol. 1993 Jun; 67(6): 3357–3362.

NIRO GA, CIANCIO A, GAETA GB, et al. **Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta.** *Hepatology* 2006; 44: 713–20.

NIRO GA, CASEY JL, GRAVINESE E, GARRUBBA M, CONOSCITORE P, SAGNELLI E, DURAZZO M, CAPORASO N, PERRI F, LEANDRO G, FACCIORUSSO D, RIZZETTO M, ANDRIULLI A, 1999. **Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: Molecular evidence.** *J Hepatol*30: 564–569.

NOUREDDIN M, GISH R. **Hepatitis Delta: Epidemiology, Diagnosis and Management 36 Years After Discovery.** *Curr Gastroenterol Rep.* 2014; 16:365.

OLIVERO A, SMEDILE A. **Hepatitis delta virus diagnosis.** *Semin Liver Dis.* 2012; 32:220-7.

PARANÁ R, ANDRADE Z, FREITAS LAR, PRATA A, KAY A, SANTOS JB. **Virological and histological re-evaluation of Labrea hepatitis.** *Acta Gastroenterol Latinoam*, 2008. Vol. 38 (N4): 284-29.

PARANÁ R, KAY A., MOLINET F., VIANA S., SILVA LK, SALCEDO JMV, TAVARES-NETO J, LOBATO C, LEITE MR, MATTEONI L, D' OLIVEIRA JR A, TAUIL P, TRÉPO C. **HDV genotypes in the western brazilian amazon region: a preliminary report.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(3), 2006, pp. 475–479.

PARANÁ R, LYRA L, TREPO C, 1999. **Intravenous vitamin complexes used in sporting activities and transmission of HCV in Brazil.** *Am. J. Gastroenterol.*, 1994: 857–858.

PASCARELLA S e NEGRO F. **Hepatitis D virus: an update.** *Liver International.* p.7-21, 2010.

PHILIPP T, DURAZZO M, TRUTWEIN C, ALEX B, STRAUB P, LAMB JG, et al. **Recognition of uridine diphosphate glucunosyl transferase by LKM-3 antibodies in chronic hepatitis D.** *Lancet* 1994; 344:578-81.

POLISH, LB, GALLAGHER M, FIELDS HA, HADLER SC. **Delta Hepatitis: Molecular Biology and Clinical and Epidemiological Features.** *Clinical Microbiology Reviews*, 1993, vol. 6, n° 3, p. 211-229.

RADJEF N, IVANNUISHINA V, ANAIS P, TRINCHET J, DENY P. **Hepatitis D Virus (HDV) genome analysis from Africa suggest the existence of more than three world-wide genotypes.** *Journal of Hepatology* 34 (suppl 1): 120, 2001.

RADJEF, N; GORDIEN E; IVANIUSHINA V; GAULT E; ANAÏS E; DRUGAN T; TRINCHET JC; ROULOT, D; TAMBY M. MILINKOVITCH MC; DÉNY P. **Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades.** *Journal of Virology*, 78: 2537-2544, 2004.

RIZZETTO, M., A. PONZETTO, AND I. FORZANI. **Hepatitis delta virus as a global health problem.** *Vaccine* 8:S10-S23, 1990.

RIZZETO M, CANESE MG, ARICÓ S, CRIVELLI C, TREPO C, BONINO F, VERME G. **Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers.** *GUT* 18: 997-1003, 1977.

RIZZETO M, VERME G, RECHIA S, et al. **Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen with intrahepatic expression of the Delta agent: An active progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment.** *Ann. Intern. Med.*, v. 98, p. 437-441, 1983.

RIZZETTO M, ROSINA F. **Hepatitis D virus: treatment.** In: Zuckerman AJ, Thomas HC, editors. *Viral hepatitis*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1997. pp. 387-393.

RIZZETTO M. **Hepatitis D: virology, clinical and epidemiological aspects.** *Acta Gastroenterol Bel* 2000; 63:221-4.

RIZZETO M. **Hepatitis D: thirty years after.** J. Hepatol. 2009; 50: 1043-1050.

RIZZETTO M. **Hepatitis D: the comeback?** Liver Intern 2009; 29:140-142.

ROSINA F, CONOSCITORE P, CUPPONE R, ROCCA G, GIULIANI A, COZZOLONGO R, et al. **Changing pattern of chronic hepatitis D in Southern Europe.** Gastroenterology, v. 117, p.161-166, 1999.

ROSKAMS T. et al., **Nomenclature of the Finer Branches of the Biliary Tree: Canals, Ductules, and Ductular Reactions in Human Livers.** Hepatology. 2004; 39:1739 –1745.

SARAVANAN S, MADHAVAN V, VELU V, et al. **High prevalence of hepatitis delta virus among patients with chronic hepatitis B virus infection and HIV-1 in an intermediate hepatitis B virus endemic region.** J Int Assoc Provid AIDS Care. 2013.

SANTOS AO, ALVARADO-MORA MV, BOTELHO L; VIEIRA D; PINHO J, CARRILHO FJ, HONDA ER, SALCEDO, JMV. **Characterization of Hepatitis B virus (HBV) genotypes in patients from Rondônia, Brazil.** Virology journal, v. 7, p. 315, 2010.

SARNO EN; CARVALHO FG; ALVARIZ FG; SOARES MCG; FONSECA FB. **Identificação do HBsAg em tecido hepático pelas técnicas de orceína e aldeído-fucsina de Gomori.** Ver. Inst. Med. Trop., São Paulo 20: 1-5, 1978.

SHADUR B, MACLACLHAN J, COWIE B. **HEPATITIS D IN VICTORIA 2000-2009.** Intern Med J. 2013; 43(10):1081-7.

SHIH HH et al. **Hepatitis D Virus Isolates with Low Replication and Epithelial-Mesenchymal Transition-Inducing Activity Are Associated with Disease Remission.** J Virol. 2012 Sep; 86(17): 9044–9054. doi: 10.1128/JVI.00130-12.

SMEDILE A, FARCI P, VERME G, et al. **Influence of Delta infection on severity of hepatitis B.** Lancet, v.2, p. 945-947, 1982.

SMEDILE A, CIANCIO A, RIZZETTO M. **Hepatitis D virus.** In: Richmann DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. Clinical Virology. Washington DC: ASM press, 2002. PP. 1227-40.

SMEDILLE A., RIZZETTO M. **HDV: Thirty years later.** Digestive and Liver Disease 43S (2011) S15-S18.

SNOVER, DC. **Viral Infections.** In: **Biopsy Diagnosis of Liver Disease.** pg. 130-131. Baltimore: Williams and Wilkins, 1992.

STOTLAND, BR. & LICHTENSTEIN, GR. **Liver biopsy complications and routine ultrasound.** The American Journal of Gastroenterology 1996; 91: 1295–1296.

SU, C.W. et al. **Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients.** Gastroenterology 130, 1625-1635 (2006).

SURATT PM, GIBSON RS. **Técnica de Biópsia Hepática por agulha.** Manual de Procedimentos Médicos, 1ª Ed., pg. 176-181, Editora Roca, São Paulo.

SUREAU C, GUERRA B, LEE H. **The middle hepatitis B vírus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus.** J Virol 1994; 68: 4063–6.

TAVANEZ JP et al. **Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm.** RNA (2002), 8:637–646. DOI: 101017S1355838202026432

TARANTINO G; CABIBI D; CAMMÀ C; ALESSI N; DONATELLI M; PETTA S; CRAXÌ A; DI MARCO V. **Liver Eosinophilic Infiltrate Is a Significant Finding in Patients With Chronic Hepatitis C.** J Viral Hepat. 2008;15(7):523-530.

THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG: **The Clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Res 1997, 25:4876-4882.

UZUNALIMOGLU, O., et al. **Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey.** Dig. Dis. Sci. 46, 1022-1028 (2001).

Utilização do Entecavir em portadores de hepatite crônica viral. Resolução SES-MG N° 2019 de 14 de setembro de 2009. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/politicas_de_saude/farmacia-de-minas-1/gmex/protocolos-clinicos-2012>. Acesso em 15 set. 2011.

SAÚDE TOTAL. **Vacina contra hepatite B.** Disponível em: <http://www.saudetotal.com.br/artigos/vacinacao/hepatiteb02.asp>. Acesso em 09/11/2015.

VATA A, HURMUZACHE M, DUCA E, et al. **The co-infection with hepatitis virus B and D--cases admitted in the infectious diseases hospital from Iasi, Romania (2003-2005).** Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2006;110 (4):856-60.

VIANA S, PARANÁ R, MOREIRA RC, COMPRI AP, MACEDO V. **High prevalence of hepatitis B vírus and hepatitis D vírus in the western Brazilian Amazon.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 73(4), 2005, pp. 808-814.

WANG KS, CHOO QL, WEINER AJ, et al. **Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome.** Nature, 1986; 323: 508-14.

WEBER B, MELCHIOR W, GEHRKE R, DOERR HW, BERGER A, RABENAU H. **Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals.** J. Med. Virol. 2001 Jul; 64(3)312-9.

WEDEMEYER H, MANNS MP. **Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead.** Nat Ver Gastroenterol Hepatol 2010, 7:31-40.

WEDEMEYER, H. **Re-emerging interest in hepatitis delta: New insights into the dynamic interplay between HBV and HDV.** Journal of Hepatology, 2010, 52: 627-629.

WEDEMEYER, H. **Hepatitis D revival.** Liver International 2011; 140-144.

WEISFUSE IB, HADLER SC, FIELDS HA, et al. **Delta hepatitis in homosexual men in the United States.** Hepatology 1989; 9:872-4.

WRANKE, A. et al. **Anti-HDV IgM as a Marker of Disease Activity in Hepatitis Delta.** Plos One, 2014; vol 9, Issue 7, p. 1-13.

WU JC, CHEN TZ, HUANG YS, YEN FS, TING LT, SHENG WY, TSAY SH, LEE SD. **Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction.** Gastroenterology. 1995 Mar;108(3):796-802. (a)

WU JC, CHOO KB, CHEN CM, CHEN TZ, HUO T, LEE SD. **Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D.** Lancet 346: 939-941, 1995 (b).

YAMADA, G, NAKANE PK. **Hepatitis B core and surface antigens in liver tissue. Light and electron microscopic localization by the peroxidase-labelled antibody method.** Lab Invest 1977, 26:649-659.

ZACHOU, K et al. **Significance of HDV-RNA and HBsAg levels in delta hepatitis: first data of the HEP-NET/International HDV Intervention Trial.** J. Hepatol.44 (Suppl.2), S178 (2006).

ZACHOU K, YURDAYDIN C, DREBBER U, DALEKOS GN, ERHARDT A, CAKALOGLU Y., et al. **Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis.** Liver Int 2009:15.

ZHANG YY, TSEGA E, HANSSON BGR. **Phylogenetic Analysis of Hepatitis D Viruses Indicating a New Genotype I Subgroup among African Isolates.** Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1996, P. 3023–3030.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE

1ª Via- Paciente

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA HEPATITE DELTA EM RONDÔNIA:

Caracterização imuno-histoquímica do antígeno Delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

A Hepatite D é pouco conhecida e muito pouco discutida no Brasil e no exterior, apesar de sua importância e tendência a comportamento agressivo, especialmente na região amazônica ocidental. Além disso, literatura médica mundial apresenta poucos dados a respeito da avaliação e gradação histológica e imuno-histoquímica das biópsias hepáticas provenientes de pacientes portadores do vírus delta. Em geral, os achados celulares são descritos como inespecíficos e o estudo imuno-histoquímico, pouco utilizado. O objetivo geral deste estudo é determinar as características histopatológicas de pacientes portadores de Hepatite Delta, em acompanhamento no Ambulatório Especializado de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

CONSULTA E EXAMES INICIAIS:

Após consulta padronizada pelo CEPEM, no Ambulatório de Hepatites, os pacientes selecionados serão encaminhados para realização dos exames de imagem, bioquímicos e sorológicos, rotineiramente solicitados para avaliar se o paciente apresenta ou não indicação para realização de biópsia. Os exames para avaliação antes da biópsia são: ultrassom de abdome, sorologias, bioquímica (função hepática e coagulograma, sorologias para vírus B e D e hemograma completo, dentre outros de rotina no ambulatório de hepatites do CEPEM). O paciente será submetido à nova consulta médica, na qual serão avaliados os resultados dos exames supracitados. Nesta consulta, no Ambulatório de Hepatites do CEPEM, será feita a solicitação de biópsia hepática, bem como de reserva de sangue, cujo pedido deve ser encaminhado ao CEMETRON com 24 horas de antecedência. Será preenchida a AIH e o paciente será orientado sobre o procedimento, que será agendando no ambulatório de hepatites, com a Sra. Maria.

PROCEDIMENTOS DE BIÓPSIA:

Os procedimentos de coleta de materiais e dados serão da seguinte forma: Quando o paciente em tratamento ambulatorial no CEMETRON aceitar participar da pesquisa, ele receberá este

TCLE e as explicações sobre a pesquisa. A seguir será coletada a biópsia hepática por agulha grossa, conforme rotina do serviço, no CEMETRON, pela Dra. Glauce Anne Cardoso. O procedimento será realizado em enfermaria. O paciente ficará internado por 24h a partir da hora do procedimento. No dia da biópsia, o paciente deverá internar em jejum absoluto de pelo menos 6 horas, às 7h. O procedimento será realizado às 8h. O paciente deverá trazer seus exames apresentados na última consulta, a AIH preenchida pelo médico solicitante da biópsia e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Na sala do ambulatório CEMETRON, o paciente será colocado em decúbito dorsal e será puncionada uma veia periférica no membro superior esquerdo, pela equipe de enfermagem. Por tal acesso venoso foram infundidos: soro glicosado 5% (500ml) e, em casos selecionados, solução de Midazolam 5mg no momento da biópsia. Os pacientes permanecerão acordados e colaborando com o procedimento. Os pacientes serão então examinados pela realizadora da biópsia, antes do procedimento, para que seja detectada a macicez hepática. Em seguida, dar-se-á início ao ato cirúrgico. Inicialmente será realizada assepsia e antiassepsia com Polvidine tópico nas regiões torácica inferior à direita, hipocôndrio direito, flanco direito e regiões axilares anterior e média à direita. Em seguida, serão colocados os campos cirúrgicos. Após localização da macicez hepática pela percussão, em torno do 7º espaço intercostal direito, linha axilar anterior direita, proceder-se-á anestesia com Lidocaína 1% sem solução vasoconstritora, com agulha 22G, na pele, tecido celular subcutâneo superficial e profundo, borda superior costal, e cápsula hepática através da introdução lenta da agulha em expiração máxima, até sentir-se a "raspagem" da cápsula. Posteriormente, será feita uma incisão 0,3cm com bisturi frio na pele acima do bordo superior da costela inferior, fugindo do feixe vásculonervoso que passa no bordo inferior dos arcos costais. No local, será introduzida a agulha de Tru-cut, formando um ângulo de 90º com a pele, no nível do 7º espaço intercostal direito com a linha axilar anterior direita. Neste momento, o paciente será orientado a ficar em apnéia após expiração profunda e a agulha foi introduzida vagarosamente até uma média de 8 cm de profundidade, estando o médico puncionador atento para a transposição da cápsula hepática, sentida por modificação na resistência de entrada. Acionará, enfim, o sistema de duplo corte manual e em seguida retirará a agulha. O fragmento de tecido hepático será colocado em um frasco contendo formol 10%, quando será verificado se o fragmento obtido é de tamanho adequado à avaliação histopatológica (cerca de 2 cm de comprimento ou mais). Caso o fragmento seja menor que isso, será feita nova punção imediatamente após a primeira. Ao término do ato cirúrgico, após a realização de curativo compressivo, o paciente adotará a posição decúbito lateral direito, onde permanecerá por duas horas. A mensuração dos sinais será feita de 30 em 30 minutos até serem completadas 4 horas do procedimento. Depois disso, o paciente encaminhado à enfermaria e será mantido em observação no leito por 24 horas. Será controlada a pressão arterial, o pulso e a frequência respiratória a cada 15 minutos na primeira hora, e caso se mantiverem estáveis, deverá ser examinado novamente e ter a pressão arterial aferida a cada hora durante as próximas 4 (quatro) horas que sucedem o procedimento e depois a cada 4 (quatro) horas, nas 20 horas após o mesmo. Deverá ser avaliado às 16h pelo plantonista, que liberará a dieta se possível. Caso apresente as complicações citadas no item 3.3, o paciente receberá todos os cuidados necessários para a completa estabilização do quadro. A assistência médica é 24 horas. Após o procedimento, a médica

que realizará o procedimento, deverá fazer a prescrição e preenchimento da solicitação de biópsia, bem como encaminhar o frasco com a amostra hepática ao Ambulatório de Hepatites do CEPEM, aos cuidados da secretária D. Maria, que se encarregará de encaminhar as amostras para a etapa de preparo e microscopia, na Fiocruz de Salvador, Bahia. Os fragmentos filiformes de tecido hepático obtidos serão submetidos à estudo histopatológico e imuno-histoquímico, conforme preconizado pelo Programa Nacional de Hepatites. A alta hospitalar será na manhã seguinte, após criteriosa avaliação médica e receberá o Relatório de Alta Hospitalar, com resumo de internação clínica. O paciente será orientado a agendar e retornar ao ambulatório de Hepatites Virais em 30 (trinta) dias, para receber o resultado da biópsia e dar continuidade ao tratamento. É garantido ao paciente a continuidade do tratamento após estudo histopatológico, conforme rotina do Ambulatório de Hepatites do CEPEM.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:

A coleta de material apresenta risco mínimo e o desconforto é moderado, visto que haverá a necessidade de o paciente ficar internado por 24 h em observação. As complicações mais comuns são: dor no local da punção ou no ombro (5% dos casos), hemorragia (0,5% dos casos), hipotensão (2% dos casos), fístula arteriovenosa intra-hepática (5,4% dos casos).

O paciente receberá todo o suporte necessário, caso ocorra alguma complicação.

Este procedimento servirá para estadiamento da doença bem como para verificar a necessidade de tratamento. Com esta pesquisa, poderá existir benefício futuro para o tratamento de pacientes com hepatite D, na dependência dos resultados obtidos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados serão analisados dentro do laboratório de realização desta pesquisa e serão guardados e poderão ser enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no CEMETRON e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:

Eu, _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O Professor Orientador Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a orientanda e/ou o professor orientador, no telefone (69) 9952-0084, ou e-mail: anitasperandioporto@yahoo.com.br e juanito2001@hotmail.com.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome Assinatura do participante ou digital Data

Nome Assinatura do Pesquisador Data

APÊNDICE II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE 2ª Via- Pesquisador

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA HEPATITE DELTA EM RONDÔNIA:

Caracterização imuno-histoquímica do antígeno Delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:

A Hepatite D é pouco conhecida e muito pouco discutida no Brasil e no exterior, apesar de sua importância e tendência a comportamento agressivo, especialmente na região amazônica ocidental. Além disso, literatura médica mundial apresenta poucos dados a respeito da avaliação e graduação histológica e imuno-histoquímica das biópsias hepáticas provenientes de pacientes portadores do vírus delta. Em geral, os achados celulares são descritos como inespecíficos e o estudo imuno-histoquímico, pouco utilizado. O objetivo geral deste estudo é determinar as características histopatológicas de pacientes portadores de Hepatite Delta, em acompanhamento no Ambulatório Especializado de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia-CEPEM.

CONSULTA E EXAMES INICIAIS:

Após consulta padronizada pelo CEPEM, no Ambulatório de Hepatites, os pacientes selecionados serão encaminhados para realização dos exames de imagem, bioquímicos e sorológicos, rotineiramente solicitados para avaliar se o paciente apresenta ou não indicação para realização de biópsia. Os exames para avaliação antes da biópsia são: ultrassom de abdome, sorologias, bioquímica (função hepática e coagulograma, sorologias para vírus B e D e hemograma completo, dentre outros de rotina no ambulatório de hepatites do CEPEM). O paciente será submetido à nova consulta médica, na qual serão avaliados os resultados dos exames supracitados. Nesta consulta, no Ambulatório de Hepatites do CEPEM, será feita a solicitação de biópsia hepática, bem como de reserva de sangue, cujo pedido deve ser encaminhado ao CEMETRON com 24 horas de antecedência. Será preenchida a AIH e o paciente será orientado sobre o procedimento, que será agendando no ambulatório de hepatites, com a Sra. Maria.

PROCEDIMENTOS DE BIÓPSIA:

Os procedimentos de coleta de materiais e dados serão da seguinte forma: Quando o paciente em tratamento ambulatorial no CEMETRON aceitar participar da pesquisa, ele receberá este TCLE e as explicações sobre a pesquisa. A seguir será coletada a biópsia hepática por agulha grossa, conforme rotina do serviço, no CEMETRON, pela Dra. Glauce Anne Cardoso. O procedimento será realizado em enfermaria. O paciente ficará internado por 24h a partir da hora do procedimento. No dia da biópsia, o paciente deverá internar em jejum absoluto de pelo menos 6 horas, às 7h. O procedimento será realizado às 8h. O paciente deverá trazer seus exames apresentados na última consulta, a AIH preenchida pelo médico solicitante da biópsia e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Na sala do ambulatório CEMETRON, o paciente será colocado em decúbito dorsal e será puncionada uma veia periférica no membro superior esquerdo, pela equipe de enfermagem. Por tal acesso venoso foram infundidos: soro glicosado 5% (500ml) e, em casos selecionados, solução de Midazolam 5mg no momento da biópsia. Os pacientes permanecerão acordados e colaborando com o procedimento. Os pacientes serão então examinados pela realizadora da biópsia, antes do procedimento, para que seja detectada a macicez hepática. Em seguida, dar-se-á início ao ato cirúrgico. Inicialmente será realizada assepsia e antiassepsia com Polvidine tópico nas regiões torácica inferior à direita, hipocôndrio direito, flanco direito e regiões axilares anterior e média à direita. Em seguida, serão colocados os campos cirúrgicos. Após localização da macicez hepática pela percussão, em torno do 7º espaço intercostal direito, linha axilar anterior direita, proceder-se-á anestesia com Lidocaína 1% sem solução vasoconstritora, com agulha 22G, na pele, tecido celular subcutâneo superficial e profundo, borda superior costal, e cápsula hepática através da introdução lenta da agulha em expiração máxima, até sentir-se a "raspagem" da cápsula. Posteriormente, será feita uma incisão 0,3cm com bisturi frio na pele acima do bordo superior da costela inferior, fugindo do feixe vasculonervoso que passa no bordo inferior dos arcos costais. No local, será introduzida a agulha de Tru-cut, formando um ângulo de 90º com a pele, no nível do 7º espaço intercostal direito com a linha axilar anterior direita. Neste momento, o paciente será orientado a ficar em apnéia após expiração profunda e a agulha foi introduzida vagarosamente até uma média de 8 cm de profundidade, estando o médico puncionador atento para a transposição da cápsula hepática, sentida por modificação na resistência de entrada. Acionará, enfim, o sistema de duplo corte manual e em seguida retirará a agulha. O fragmento de tecido hepático será colocado em um frasco contendo formol 10%, quando será verificado se o fragmento obtido é de tamanho adequado à avaliação histopatológica (cerca de 2 cm de comprimento ou mais). Caso o fragmento seja menor que isso, será feita nova punção imediatamente após a primeira. Ao término do ato cirúrgico, após a realização de curativo compressivo, o paciente adotará a posição decúbito lateral direito, onde permanecerá por duas horas. A mensuração dos sinais será feita de 30 em 30 minutos até serem completadas 4 horas do procedimento. Depois disso, o paciente encaminhado à enfermaria e será mantido em observação no leito por 24 horas. Será controlada a pressão arterial, o pulso e a frequência respiratória a cada 15 minutos na primeira hora, e caso se mantiverem estáveis, deverá ser examinado novamente e ter a pressão arterial aferida a cada hora durante as próximas 4 (quatro) horas que sucedem o procedimento e depois a cada 4 (quatro) horas, nas 20 horas após o mesmo. Deverá ser avaliado às 16h pelo plantonista, que liberará a dieta se possível. Caso apresente

as complicações citadas no item 3.3, o paciente receberá todos os cuidados necessários para a completa estabilização do quadro. A assistência médica é 24 horas. Após o procedimento, a médica que realizará o procedimento, deverá fazer a prescrição e preenchimento da solicitação de biópsia, bem como encaminhar o frasco com a amostra hepática ao Ambulatório de Hepatites do CEPEM, aos cuidados da secretária D. Maria, que se encarregará de encaminhar as amostras para a etapa de preparo e microscopia, na Fiocruz de Salvador, Bahia. Os fragmentos filiformes de tecido hepático obtidos serão submetidos à estudo histopatológico e imuno-histoquímico, conforme preconizado pelo Programa Nacional de Hepatites. A alta hospitalar será na manhã seguinte, após criteriosa avaliação médica e receberá o Relatório de Alta Hospitalar, com resumo de internação clínica. O paciente será orientado a agendar e retornar ao ambulatório de Hepatites Virais em 30 (trinta) dias, para receber o resultado da biópsia e dar continuidade ao tratamento. É garantida ao paciente a continuidade do tratamento após estudo histopatológico, conforme rotina do Ambulatório de Hepatites do CEPEM.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:

A coleta de material apresenta risco mínimo e o desconforto é moderado, visto que haverá a necessidade de o paciente ficar internado por 24 h em observação. As complicações mais comuns são: dor no local da punção ou no ombro (5% dos casos), hemorragia (0,5% dos casos), hipotensão (2% dos casos), fístula arteriovenosa intra-hepática (5,4% dos casos).

O paciente receberá todo o suporte necessário, caso ocorra alguma complicação.

Este procedimento servirá para estadiamento da doença bem como para verificar a necessidade de tratamento. Com esta pesquisa, poderá existir benefício futuro para o tratamento de pacientes com hepatite D, na dependência dos resultados obtidos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados serão analisados dentro do laboratório de realização desta pesquisa e serão guardados e poderão ser enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no CEMETRON e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:

Eu, _____, fui informada(o) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O Professor Orientador Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a orientanda e/ou o professor orientador, no telefone (69) 9952-0084, ou e-mail: anitasperandioporto@yahoo.com.br e juanito2001@hotmail.com.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome Assinatura do participante ou digital Data

Nome Assinatura do Pesquisador Data

APÊNDICE III**SEXO, IDADE, NATURALIDADE E PROCEDÊNCIA DOS PACIENTES HDV**

N	Sexo	Idade	Naturalidade	Procedência
1	M	29	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
2	F	31	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
3	F	34	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
4	M	18	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
5	F	24	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
6	M	38	Açucena, MG	Ariquemes, RO
7	M	20	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
8	F	31	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
9	F	27	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
10	F	25	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
11	M	38	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
12	F	31	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
13	M	30	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
14	M	21	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
15	M	25	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
16	M	30	Guajará-Mirim, RO	Guajará-Mirim, RO
17	M	25	Juína, MT	Porto Velho, RO
18	M	43	Santa Helena, PR	Porto Velho, RO
19	M	53	Carauari, AM	Mirante da Serra, RO
20	F	54	Pato Branco, PR	Vilhena, RO
21	M	41	Canutama, AM	Lábrea, AM
22	F	33	Quinta do Sol, PR	Ji-Paraná, RO
23	F	38	Lábrea, AM	Lábrea, AM
24	F	45	Humaitá, AM	Humaitá, AM

APÊNDICE IV**DADOS CLÍNICOS E DE ULTRASSONOGRRAFIA**

Caso	Sexo	Idade	Sinais	Sintomas	Ultrassonografia
1	M	29	Não	Não	Hepatomegalia
2	F	31	Não	Não	Cirrose hepática Esplenomegalia discreta
3	F	34	Não	Não	Fígado normal e litíase renal
4	M	18	Não	Não	Exame normal
5	F	24	Não	Não	Cirrose Esplenomegalia discreta colecistite.
6	M	38	Não	Não	Hepatomegalia Discreta Esplenomegalia acentuada
7	M	20	Não	Não	Esplenomegalia discreta
8	F	31	Não	Não	Hepatopatia crônica difusa Esplenectomia Litíase renal bilateral
9	F	27	Não	Não	Exame normal
10	F	25	Não	Não	Cirrose hepática Esplenomegalia discreta Colangite
11	M	38	Não	Não	Colecistite e Rim direito hipotrófico
12	F	31	Não	Não	Exame normal
13	M	30	Icterícia	Não	Fígado normal Colecistite Calculosa
14	M	21	Não	Não	Cirrose hepática Esplenomegalia discreta
15	M	25	Não	Não	Hipertensão portal Esplenomegalia acentuada
16	M	30	Aranhas vasculares	Não	Hepatomegalia Esplenomegalia
17	M	25	Não	Não	Exame normal
18	M	43	Não	Mialgia, astenia, anorexia e aversão ao cigarro	Exame normal
19	M	53	Não	Não	Esteatose discreta
20	F	54	Não	Não	Hepatopatia crônica difusa Colelitíase
21	M	41	Emagrecimento Palidez e Epistaxe	Astenia	Hepatopatia crônica difusa Esplenomegalia discreta
22	F	33	Não	Não	Exame normal
23	F	38	Emagrecimento Aranhas vasculares	Não	Hepatopatia crônica difusa Hipertensão portal e esplênica Esplenomegalia moderada
24	F	45	Emagrecimento colúria	Anorexia, Náuseas, vômitos, mialgias, aversão ao cigarro	Esteatose discreta

APÊNDICE V
QUADRO DE EXAMES BIOQUÍMICOS E HEMATOLOGICOS

Caso	Sexo	Idade	Hto %	LT mm ³	AST UK/ml	ALT UK/ml	GGT U/L	BD mg/dL	BI mg/dL	FA UI/L	PT g/dl	PLQ mm ³	TAP seg.	CT mg/dl	Fe g/dl	Cr mg/dl	Ur mg/dl	AU mg/dl	Gli mg/dl
1	M	29	38	7800	32	28	35	0,40	0,50	238	6,4	235000	14	169	73	1,2	44	4,5	97
2	F	31	30	9300	120	150	38	0,40	0,60	203	7,3	190000	12	229	39	0,7	37	4,1	78
3	F	34	37	6900	38	62	69	0,15	0,42	107	8,0	143000	12,6	142	95	0,6	21	4,1	76
4	M	18	35	6400	147	219	120	0,22	0,47	157	7,7	226000	13	157	110	0,9	36	4,5	88
5	F	24	34	5900	388	592	20	1,00	1,30	13	8,3	120000	13,4	175	70	1,4	47	2,3	80
6	M	38	33,3	5600	78	36	96	0,80	0,40	164	9,6	200000	13	110	120	1,2	37	5,3	94
7	M	20	42	6050	69	75	89	0,40	0,50	107	6,9		16	116	139	0,6	31	3,0	81
8	F	31	38,6	5600	87	84	128	0,32	0,50	115	7,6	158000	16	157	112	0,6	23	3,4	76
9	F	27	38	6300	187	123	32	0,90	1,30	54	8,2		14,5	103	89	0,8	16	4,1	93
10	F	25	39	6500	600	860	176	0,27	0,64	131	6,4	136000	20,3	139	122	0,5	29	3,7	92
11	M	38	35	6700	248	320		0,80	0,70	13	7,1	200000	13,7	100	NA	0,5	21	1,8	100
12	F	31	36	5300	1260	1590	92	1,56	0,93	94	8,7	251000	15,3	178	161	0,9	30	2,2	89
13	M	30	42	3900	602	178	439	8,90	3,70	170	6,8	200000	16,9	120	127	0,5	16	NA	99
14	M	21	44	6800	123	81	44	0,50	0,70	40	8,7	380000	NA	104	80	0,5	20	4,5	88
15	M	25	40	5000	13	11	37	0,20	0,20	17	7,2	218000	33	131	152	0,7	23	6,2	70
16	M	30	36	5000	17	25	50	0,40	0,50	18	8,0		17	113	184	0,6	23	5,2	77
17	M	25	42	4300	80	113	220	0,36	0,20	91	8,7	175000	15,3	258	146	1,1	NA	5,4	94
18	M	43	41,5	4300	68	97	26	0,10	0,13	191	5,8	129000	NA	282	92	0,8	28	6,6	91
19	M	53	40	4700	49	43	27	0,20	0,50	120	8,9	178000	NA	220	104	1,2	NA	6,2	93
20	F	54	41	4800	45	53	81,59	0,22	0,34	74,60	6,7	129000	15,7	219	157	0,6	27,2	2,9	124
21	M	41	42,2	6800	137	201	69	0,20	0,30	172	8,3	167000	19,3	203	63	0,8	NA	5,3	88
22	F	33	35,3	5900	20	27	51	0,17	0,31	72	8,0		14,3	162	NA	0,6	19	NA	72
23	F	39	34,9	4960	47	33	19	0,70	0,50	130	10,7	90100	21	143	146	0,5	NA	3,6	95
24	F	45	45,7	8330	181	287	73	0,30	0,20	130	9,0	276000	13,5	143?	300	0,9	NA	4,9	95

Abreviaturas da tabela: Hto=hematócrito; LT=Leucócitos totais; AST= Transaminase glutâmica oxalacética; ALT= Transaminase glutâmica pirúvica; GGT= Gama Glutamilttransferase; BD= Bilirrubina direta; BI= Bilirrubina indireta; FA= Fosfatase Alcalina; PT= Proteínas totais; PLQ= Plaquetas; TAP= Tempo de ativação da protrombina. CT= Colesterol Total; Fe= Ferro sérico; Cr= Creatinina; Ur= Uréia; AU= Ácido Úrico; Gli= Glicemia de jejum; NA= Não avaliado.

APÊNDICE VI**QUADRO DE CONTENÇÃO DE DADOS SOROLÓGICOS**

Caso	Sexo	Idade	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc total	HBeAg	Anti-HBe	Anti-HDV	Anti-HCV	Anti-HIV
1	M	29	+	-	-	-	+	+	-	-
2	F	31	+	-	+	-	+	+	-	-
3	F	34	+	-	+	-	+	+	-	-
4	M	18	+	-	+	-	+	+	-	-
5	F	24	+	-	+	-	+	+	-	-
6	M	38	+		+	-	+	+	-	-
7	M	20	+	-	+	-	+	+	-	-
8	F	31	+	NA	+	-	+	+	-	-
9	F	27	+	-	+	-	+	+	-	-
10	F	25	+	+	+	-	+	+	-	-
11	M	38	+	-	+	-	+	+	-	-
12	F	31	+	-	+	-	+	+	-	-
13	M	30	+	-	+	-	+	+	-	-
14	M	21	+	-	+	-	+	+	-	-
15	M	25	+	-	+	-	+	+	-	-
16	M	30	+	-	+	-	+	+	-	-
17	M	25	+	-	+	-	+	+	-	-
18	M	43	+	-	+	-	+	+	-	-
19	M	53	+	-	+	-	+	+	-	-
20	F	54	+	-	+	-	+	+	-	-
21	M	41	+	-	+	-	+	+	-	-
22	F	33	+	-	+	-	+	+	-	-
23	F	39	+	-	+	-	+	+	-	-
24	F	45	+	-	+	-	+	+	-	-

+= Presente; -= Ausente; NA= Não avaliado.

APÊNDICE VII**CLASSIFICAÇÃO METAVIR DOS CASOS ESTUDADOS**

Caso	Classificação Metavir	Sexo	Idade
1	A1F2	M	29
2	A3F3	F	31
3	A3F3	F	34
4	A0F0	M	18
5	A2F1	F	24
6	A3F3	M	38
7	A2F3	M	20
8	A1F2	F	31
9	A3F3	F	27
10	A3F1	F	25
11	A0F0	M	38
12	A2F3	F	31
13	A3F3	M	30
14	A2F2	M	21
15	A1F1	M	25
16	A3F3	M	30
17	A3F3	M	25
18	A0F1	M	43
19	A0F2	M	53
20	A1F3	F	54
21	A2F2	M	41
22	A1F0	F	33
23	A2F3	F	38
24	A3F3	F	45

APÊNDICE VIII

AVALIAÇÃO DE REAÇÕES E DANOS MORFOLÓGICOS* (1/4)

n	Metavir	Balonização	Corpusculos acidófilos Councilman (Apoptose)	Depósito de Ferro (Peris)	Célula em mórula	Hepat. Vidro fosco	Hiperplasia Cel Kupffer	Atividade Inflamatória	Tipo de Células inflamatórias	Inflamação Portal	Atividade Lobular	Spill Over	Linfocitose Intra-Sinusoidal	Necrose em saca bocado	Regressão celular	Proliferação Ou reação ductular	Agressão ductular	Esteatose	Fibrose Portal ou porta-porta	Fibrose Perissinusoidal
1	A1F2	+	+	-	-	-	+	+	Linfócitos	+	-	-	+	-	-	-	-	+<5 %	p+/3 p-p0	+ difuso
2	A3F3	++	+	-	-	-	+	+++	Linfócitos, acúmulos linfóides, eosinófilos e plasmócitos	+++	+	++	+	++	++	+	+	+<5 %	P/p-p +++/3	++ Zona 3
3	A3F3	+	+	-	-	++	+	+++	Linfócitos, acúmulos linfóides, eosinófilos e plasmócitos	+++	+	+++	++	++	++	+	+	-	P/p-p +++	+ difuso
4	A0F0	+	+	-	-	-	-	-	Linfócitos escassos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ Zona3
5	A2F1	++	+	-	-	+	-	++	Linfócitos	++	+	+	-	+	+	++	+	+<5 %	P+++ pp-	+ Zona3
6	A3F3	+	+	-	-	++	+	+++	Linfócitos histiócitos, eosinófilos e plasmócitos	+++	++	++	+	++	+	-	-	-	p/PP ++	++ difuso (foto)
7	A2F3	+	+	-	-	+	++	++	Linfócitos, eosinófilos e plasmócitos	++	+	+	+	+	+	-	-	-	p-p ++	++ difuso
8	A1F2	-	-	-	-	+	++	+	Linfócitos	+	+	-	-	-	-	-	-	-	P +	++ difuso

n	Metavir	Baloniização	Corpusculos acidófilos Councilman (Apoptose)	Depósito de Ferro (Perls)	Célula em mórula	Hepat. Vidro fosco	Hiperplasia Cel Kupffer	Atividade Inflamatória	Tipo de Células inflamatórias	Inflamação Portal	Atividade Lobular	Spill Over	Linfocitose Intra-Sinusoidal	Necrose em saca bocado	Regressão celular	Proliferação Ou reação ductular	Agressão ductular	Esteatose	Fibrose Fibrose Portal e Porta-porta	Fibrose Perissinusoidal
9	A3F3	+++	-	-	-	+	-	+++	Linfócitos e histiócitos	++	++	++	+	++	++	-	-	+ ⁵ %	++ p/pp	++ Difuso
10	A3F1	+	++	-	-	-	+	+++	Linfócitos com acúmulos linfóides Eosinófilos e plasmócitos	+++	++	++	+	++	++	+	-	-	+++ P Fibrose portal importante	+ Zona 1 e 2
11	A0F0	+	-	-	-	-	-	-	Linfócitos	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+ Zona 3
12	A2F3	+	++	-	-	+	-	++	Linfócitos, neutrófilos e raros plasmócitos	++	+	+	+	+	+	+	+	-	P/pp++	++ Difuso e em torno vcl
13	A3F3	+	+++	-	-	-	++	+++	Linfócitos, histiócitos e eosinófilos	+++	+++	++	+++	++	++	-	-	+ ⁵ %	P/pp++	++ difuso
14	A2F2	-	++	-	-	-	++	++	linfócitos com acúmulos linfóides, eosinófilos, Plasmócitos	+++	++	+	++	++	+	-	-	-	p/pp++	+ Zona 1 e 3
15	A1F1	-	++	-	-	-	+	+	Linfócitos e neutrófilos	+	-	+	+	-	+	-	-	-	P++ Fibrose portal importante	++ z1z3 focal

n	Metavir	Balonziação	Corpusculos acidófilos Councilman (Apoptose)	Depósito de Ferro (Peris)	Célula em mórula	Hepat. Vidro fosco	Hiperplasia Cel Kupffer	Atividade Inflamatória	Tipo de Células inflamatórias	Inflamação Portal	Atividade Lobular	Spill Over	Linfocitose Intra-Sinoidal	Necrose em saca bocado	Regressão celular	Proliferação Ou reação ductular	Agressão ductular	Esteatose	Fibrose Fibrose Portal e Porta-porta	Fibrose Perissinusoidal
16	A3F3	+	+	-	-	+	+	+++	Linfócitos, acúmulos linfóides, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos	+++	+++	+++	+	++	+	+	+	-	p/pp +++	++ Focal Z3
17	A3F3	++	+	-	-	++	++	+++	Linfócitos, neutrófilos e plasmócitos	+++	+	+	++	++	++	-	-	+	+++ p-p p	++ difuso
18	A0F1	-	-	-	-	++	++	-	Linfócitos	-	+	-	-	-	-	-	-	-	P++ fibrose importan te	-
19	A0F2	++	-	++/4	-	+	-	-	Linfócitos, qtd habitual	-	-	-	-	-	-	-	-	+<5 %	P/pp ++	-
20	A1F3	++	+	-	-	++	+	+	Linfócitos e Plasmócitos	+	+	+	-	++	+	-	-	+<5 %	P/pp +++	+ Zona 3 VCL
21	A2F2	++	-	-	-	-	++	++	Linfócitos, Eosinófilos e plasmócitos	++	+	-	+	+	+	-	-	+<5 %	P/pp ++	+ Zona 3
22	A1F0	+	+	+	-	+	-	+	Linfócitos	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ difuso
23	A2F3	-	+	-	-	+	+	++	Linfócitos, acúmulos neutrófilos, Eosinófilos e numerosos plasmócitos	++	+	+	+	+	+	+	+	-	p+++ Fibrose portal importan te	+ difuso
24	A3F3	+	+	-	-	+	+	+++	Linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, com acúmulos linfóides	+++	++	+	++	++	+	-	-	<5 %	P/pp ++	+z3

*Semiquantificação de variáveis histológicas:

Símbolo	Interpretação
*	Habitual
-	Ausente
+	Exígua/discreta: positivo em pequena quantidade de células ou pequena área.
++	Moderada: presente em um número moderado de células ou em até metade das superfícies de corte examinadas
+++	Acentuada/abundante: Positiva em numerosas células ou em mais de metade das superfícies de corte examinadas.
NA	Ainda não avaliado
p	portal
pp	Porta-porta

APÊNDICE IX
CARACTERIZAÇÃO E SEMIQUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO (1/2)

Caso nº	Metavir	Inflamação	Localização	Inflamação portal	Atividade lobular	Linfocitose Intrassinusoidal	Spill Over	Linfócitos	Acúmulos linfóides	Neutrófilos	Histiócitos	Plasmócitos	Eosinófilos
1	A1F2	+	Portal	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2	A3F3	+++	Portal e lobular	+++	+	+	++	++	+	-	-	+	+
3	A3F3	+++	Portal e lobular	+++	+	++	+++	+++	+	+	-	+	+
4	A0F0	-	Portal	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	A2F1	++	Portal e lobular	++	+	-	+	++	-	-	-	-	-
6	A3F3	+++	Portal e lobular	+++	++	+	++	++	-	-	+	+	+
7	A2F3	++	Portal e lobular	++	+	+	+	++	-	-	-	+	+
8	A1F2	+	Portal e lobular	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9	A3F3	+++	Portal e lobular	++	++	+	++	++	-	-	+	-	-
10	A3F1	+++	Portal e lobular	+++	++	+	++	++	+	-	-	+	+
11	A0F0	-	Portal	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12	A2F3	++	Portal e lobular	++	+	+	+	++	-	+	-	+	-
13	A3F3	+++	Portal e lobular	+++	+++	+++	++	++	-	-	+	-	+
14	A2F2	++	Portal e lobular	+++	++	++	+	+++	+	-	+	+	+
15	A1F1	+	Portal	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-

Caso nº	Metavir	Inflamação	Localização	Inflamação portal	Atividade lobular	Linfocitose Intrassinusoidal	Spill Over	Linfócitos	Acúmulos linfóides	Neutrófilos	Histiócitos	Plasmócitos	Eosinófilos
16	A3F3	+++	Portal e lobular	+++	+++	+	+++	+++	+	-	+	+	+
17	A3F3	++	Portal e lobular	+++	+	++	+	++	-	+	-	++	-
18	A0F1	++	Portal e lobular	+	+	-	-	++	-	-	-	-	+
19	A0F2	-	Portal	-	-	-	-	+*	-	-	-	-	-
20	A1F3	+++	Portal e lobular	++	+	-	+	+++	-	-	-	+	-
21	A2F2	++	Portal e lobular	++	+	+	-	++	-	-	-	+++	+
22	A1F0	-	Portal	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
23	A2F3	+++	Portal e lobular	++	+	+	+	++	-	+	-	+++	+
24	A3F3	+++	Portal e lobular	+++	++	++	+	+++	-	+	-	+	-

*Semiquantificação de variáveis histológicas:

Símbolo	Interpretação
*	Habitual
-	Ausente
+	Exígua/discreta: positivo em pequena quantidade de células ou pequena área.
++	Moderada: presente em um número moderado de células ou em até metade das superfícies de corte examinadas
+++	Acentuada/abundante: Positiva em numerosas células ou em mais de metade das superfícies de corte examinadas.
NA	Ainda não avaliado

APÊNDICE X

HIPERPLASIA E HIPERTROFIA DE CÉLULAS DE KUPFFER

Caso nº	Nº exame	Metavir	Hiperplasia	Hipertrofia
1	1181-10	A1F2	+	+
2	1180-10	A3F3	+	-
3	1189-10	A3F3	+	+
4	1179-10	A0F0	-	-
5	562-11	A2F1	-	-
6	398-11	A3F3	+	+
7	1177-10	A2F3	++	+
8	560-11	A1F2	++	+
9	564-11	A3F3	-	-
10	1176-10	A3F1	+	+
11	849-11	A0F0	-	-
12	399-11	A2F3	-	-
13	1182-10	A3F3	++	+
14	1174-10	A2F2	++	+
15	1175-10	A1F1	+	+
16	561-11	A3F3	+	+
17	82-12	A3F3	++	+
18	6842-14	A0F1	++	+
19	1896-15	A0F2	-	-
20	7102-14	A1F3	+	+
21	6846-14	A2F2	++	+
22	7186-14	A1F0	-	-
23	269-15	A2F3	+	+
24	1334-15	A3F3	+	+

APÊNDICE XI

AVALIAÇÃO DA DEGENERAÇÃO HIDRÓPICA, COLESTASE, DEPÓSITOS DE FERRO E HEPATÓCITOS EM VIDRO FOSCO

	Metavir	Degeneração hidrópica	Colestase	Depósitos de Ferro	Localização do ferro	Hepatócito em Vidro fosco
1	A1F2	+	-	-	-	-
2	A3F3	++	-	-	-	-
3	A3F3	+	-	-	-	++
4	A0F0	+	-	-	-	-
5	A2F1	++	-	-	-	+
6	A3F3	+	-	-	-	++
7	A2F3	+	-	-	-	+
8	A1F2	-	-	-	-	+
9	A3F3	+++	-	-	-	+
10	A3F1	+	-	-	-	-
11	A0F0	+	-	-	-	-
12	A2F3	+	-	-	-	+
13	A3F3	+	-	-	-	-
14	A2F2	-	-	-	-	-
15	A1F1	-	-	-	-	-
16	A3F3	+	-	-	-	+
17	A3F3	++	-	-	-	++
18	A0F1	-	-	-	-	++
19	A0F2	++	-	++	+ (Hepatocitário e Difuso)	+
20	A1F3	++	-	-	-	++
21	A2F2	++	-	-	-	-
22	A1F0	+	-	+	+ (Hepatocitário e Difuso)	+
23	A2F3	-	-	-	-	+
24	A3F3	+	-	-	-	+

APÊNDICE XII

LOCALIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA ESTEATOSE

Caso nº	Metavir	Degeneração moruliforme	Esteatose	Tipo de Esteatose Macro/micro	Localização Zona 1-2-3 Rappaport	Distribuição focal/difusa	Semi quantificação +/-/++/+++
1	A1F2	Não	+	Micro	1-2	Focal	+<5%
2	A3F3	Não	+	Micro	1-2	Focal	+<5%
3	A3F3	Não	-	-	-	-	-
4	A0F0	Não	-	-	-	-	-
5	A2F1	Não	+	Macro	1-2-3	Focal	+<5%
6	A3F3	Não	-	-	-	-	-
7	A2F3	Não	-	-	-	-	-
8	A1F2	Não	-	-	-	-	-
9	A3F3	Não	+	Macro	1-2-3	Focal	+<5%
10	A3F1	Não	-	-	-	-	-
11	A0F0	Não	-	-	-	-	-
12	A2F3	Não	-	-	-	-	-
13	A3F3	Não	+	Macro	2-3	Focal	+<5%
14	A2F2	Não	-	-	-	-	-
15	A1F1	Não	-	-	-	-	-
16	A3F3	Não	-	-	-	-	-
17	A3F3	Não	+	Macro	1-2-3	Focal, faixa	+
18	A0F1	Não	-	-	-	-	-
19	A0F2	Não	+	Macro e micro	1-2	Focal	+<5%
20	A1F3	Não	+	Macro	2	Focal	+<5%
21	A2F2	Não	+	Macro e micro	1	Focal	+<5%
22	A1F0	Não	-	-	-	-	-
23	A2F3	Não	-	-	-	-	-
24	A3F3	Não	-	-	-	-	-

APÊNDICE XIII

LOCALIZAÇÃO E SEMIQUANTIFICAÇÃO DA NECROSE E APOPTOSE

	Metavir	Necrose zonas de Rappaport			Apoptose
		Zona1*	Zona 2	Zona 3	
1	A1F2	-	-	-	+
2	A3F3	++	-	-	+
3	A3F3	++	-	-	+
4	A0F0	-	-	-	+
5	A2F1	+	-	-	+
6	A3F3	++	-	-	+
7	A2F3	+	-	-	+
8	A1F2	-	-	-	-
9	A3F3	++	-	-	-
10	A3F1	++	-	-	++
11	A0F0	-	-	-	-
12	A2F3	+	-	-	++
13	A3F3	++	-	-	+++
14	A2F2	++	-	-	++
15	A1F1	-	-	-	++
16	A3F3	++	-	-	+
17	A3F3	++	-	-	+
18	A0F1	-	-	-	-
19	A0F2	-	-	-	-
20	A1F3	++	-	-	+
21	A2F2	+	-	-	-
22	A1F0	-	-	-	+
23	A2F3	+	-	-	+
24	A3F3	++	-	-	+

*Necrose em saca-bocado ou hepatite de interface.

APÊNDICE XIV**AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE FIBROSE**

N	Metavir	Fibrose portal	Fibrose portal e porta-porta	Fibrose Perissinusoidal		
				Presente	Difuso	Focal
1	A1F2	+	-	+	+	
2	A3F3	-	+++	+	-	++ zona 3
3	A3F3	-	+++	+	+	
4	A0F0	-	-	+	-	+ zona 3
5	A2F1	+++	-	+	-	+ zona 3
6	A3F3	-	++	++	++	
7	A2F3	-	++	++	++	
8	A1F2	+	-	++	++	
9	A3F3	-	+	++	++	
10	A3F1	+++*	-	+	-	+ zonas 1 e 2
11	A0F0	-	-	+	-	+ zona 3
12	A2F3	-	++	++	++ VCL	
13	A3F3	-	++	++	++	
14	A2F2		++	+	-	+ Zona 1 e 3
15	A1F1	++*	-	+	-	++ zonas 1 e 3
16	A3F3	-	+++	+	-	++ zona 3
17	A3F3	-	++	+	++	
18	A0F1	++	-	-	-	
19	A0F2	-	-	-	-	
20	A1F3	-	++	+	-	+ zona 3 e VCL
21	A2F2	-	++	+	-	+ zona 3
22	A1F0	-	-	+	+	
23	A2F3	+++*	-	+	+	
24	A3F3	-	++	+	-	+ zona 3

VCL= veia centrolobular; * Fibrose portal importante

APÊNDICE XV**SEMIQUANTIFICAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPATOCITÁRIA**

N	Metavir	Regeneração Hepatocitária	Duplicidade cordões	Pseudorrosetas	Núcleos reativos	Multinucleação
1	A1F2	-	-	-	-	-
2	A3F3	++	+	-	-	-
3	A3F3	++	+	+	-	-
4	A0F0	-	+	-	-	-
5	A2F1	+	+	+	-	-
6	A3F3	+	+	+	+	+
7	A2F3	+	+	-	+	-
8	A1F2	-	+	+	-	-
9	A3F3	++	+	+	-	-
10	A3F1	++	+	+	+	-
11	A0F0	+	+	+	-	-
12	A2F3	+	+	+	+	-
13	A3F3	++	+	-	-	-
14	A2F2	+	+	-	-	-
15	A1F1	+	+	+	-	-
16	A3F3	+	+	+	+	-
17	A3F3	++	+	+	+	-
18	A0F1	-	-	-	+	-
19	A0F2	-	-	-	+	-
20	A1F3	+	-	-	+	-
21	A2F2	+	+	+	+	+
22	A1F0	-	-	+	+	-
23	A2F3	+	+	+	-	-
24	A3F3	+	+	-	+	-

APÊNDICE XVI**SEMIQUANTIFICAÇÃO DA REAÇÃO OU PROLIFERAÇÃO DUCTULAR E AGRESSÃO DUCTULAR**

N	Metavir	Proliferação ou Reação ductular	Agressão ductular
1	A1F2	-	-
2	A3F3	+	+
3	A3F3	+	+
4	A0F	-	-
5	A2F1	++	+
6	A3F3	-	-
7	A2F3	-	-
8	A1F2	-	-
9	A3F3	-	-
10	A3F1	+	-
11	A0F0	-	-
12	A2F3	+	+
13	A3F3	-	-
14	A2F2	-	-
15	A1F1	-	-
16	A3F3	+	+
17	A3F3	-	-
18	A0F1	-	-
19	A0F2	-	-
20	A1F3	-	-
21	A2F2	-	-
22	A1F0	-	-
23	A2F3	+	+
24	A3F3	-	-

APÊNDICE XVII**SEMIQUANTIFICAÇÃO DO DANO VASCULAR**

Caso Nº	Metavir	Vasculite	Proliferação Vascular	Atrofia	Trombos
1	A1F2	-	-	-	-
2	A3F3	-	-	-	-
3	A3F3	-	-	-	-
4	A0F0	-	-	-	-
5	A2F1	-	-	-	-
6	A3F3	-	-	-	-
7	A2F3	-	-	-	-
8	A1F2	-	-	-	-
9	A3F3	-	-	-	-
10	A3F1	-	-	-	-
11	A0F0	-	-	-	-
12	A2F3	-	-	-	-
13	A3F3	-	-	-	-
14	A2F2	-	-	-	-
15	A1F1	-	-	-	-
16	A3F3	-	-	-	-
17	A3F3	-	-	-	-
18	A0F1	-	-	-	-
19	A0F2	-	-	-	-
20	A1F3	-	-	-	-
21	A2F2	-	-	-	-
22	A1F0	-	-	-	-
23	A2F3	-	-	-	-
24	A3F3	-	-	-	-

APÊNDICE XVIII

RESULTADOS DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS COM QUANTIFICAÇÃO DO PADRÃO DE LOCALIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS HDAg, HBsAg E HBcAg

Controles	HDV	HBs	HBc
1	+	+	-
2	+	-	+

Nº	HDV	HDV Nuclear e peri	HDV citoplasma	HBsAg	HBsAg Citoplasma	HBsAg Membrana	HBcAg	HBcAg Nuclear	HBcAg Citoplasma
1	+	+	+	+ faixa	+	-	+++d	-	+
2	+	+	+	+++ faixa	+++	+++	++d	-	+
3	-	-	-	NA			-	-	-
4	-	-	-	NA	-	-	++d	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	NA			-	-	-
7	++	+	+	+ Faixa	++	-	+++d	-	+
8	-	-	-	NA			+d	-	+
9	+	++	++	-	-	-	++d	-	+
10	+	+	+	+++d faixa	+++	-	++d	-	+
11	-	-	-	NA			++d	-	+
12	++	+	+	NA			+d	-	+
13	+++	+	+	+++multif Faixa	+++	+	NA		
14	+++	+	++	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	-	-	-	NA			NA	-	-
16	++	+	+	NA			+d	-	+
17	++	+	+	NA			-	-	-
18	+	+	+	NA			+d	-	+
19	-	-	-	NA			-	-	-
20	-			NA			+	+	-
21	++	+	+	NA			+d	-	+
22	-	-	-	NA			++d	-	+
23	++	+	+	NA			++d	-	+
24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Multif= Multifocal; NA= Não avaliado; (+)= Positiva; (-)= Negativa.

APÊNDICE XIX

GENÓTIPOS DOS CASOS DE HBV/HDV E RESPECTIVAS CARGAS VIRAIS

Nº	Sexo	Idade	Genótipo B	Carga Viral B (PCR-RT) UI/ml	Log B	Genótipo D	Carga Viral D (PCR-RT) cópias/ml	Log D
1	M	29	F	<50	1,70	3	30975	4,49
2	F	31	F	<50	1,70	3	185977	5,27
3	F	34	F	92	1,96	3	19117	4,28
4	M	18	NA	NA	NA	3	NA	NA
5	F	24	A	234	2,37	3	12641	4,1
6	M	38	NA	979	2,99	3	16655	4,22
7	M	20	NA	210	2,32	3	114783	5,06
8	F	31	NA	<50	1,70	3	17844	4,25
9	F	27	NA	548	2,74	3	3411	3,53
10	F	25	F	577	2,76	3	162024	5,21
11	M	38	NA	88	1,94	3	< 75	1,88
12	F	31	F	1089	3,04	3	345877	5,54
13	M	30	NA	<50	1,70	3	568	2,75
14	M	21	A	<50	1,70	3	1712	3,23
15	M	25	F	101	2,0	3	2105	3,32
16	M	30	F	381	2,58	3	5921	3,77
17	M	25	NA	670	2,83	3	6797	3,77
18	M	43	NA	608	2,78	SR	NA	NA
19	M	53	A	773	2,89	SR	NA	NA
20	F	54	A	7147	3,85	SR	NA	NA
21	M	41	NA	183	2,26	SR	NA	NA
22	F	33	NA	NA	NA	SR	NA	NA
23	F	38	NA	<50	1,70	SR	NA	NA
24	F	45	NA	399	2,60	SR	NA	NA

F= Feminino; M= Masculino; NA= Não avaliado; (<)= Menor que; SR= Sem reserva de material no bloco para a realização da reação.

ANEXO I



GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

REF.: Parecer 09/11 CEP/CEPEM

Porto Velho, 20 de Junho de 2011.

Registro CAAE: 0002.0.046.000-11

Ilmo Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo

Instituição: CEPEM/IPEPATRO

Sr. Pesquisador, em sua Quarta Reunião realizada no dia 16 de Junho de 2011, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou o projeto sob sua responsabilidade intitulado: **"Estudos histopatológicos da Hepatite Delta em Rondônia: Caracterização imunohistoquímica do antígeno Delta em amostras de pacientes em acompanhamento no Ambulatório especializado de hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia"**. Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.Sa. deve encaminhar a nossa secretaria relatórios parcial e final do referido projeto enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,


Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II



CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Ofício nº 29/CEP/CEPEM Porto Velho, 29 de Julho de 2015.

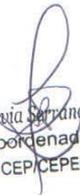
A sua Senhoria o Senhor
Dr. Juan Miguel Villalobos Salcedo
Pesquisador
Fundação Oswaldo Cruz Rondônia – FIOCRUZ/RO

Assunto: **Resposta a solicitação de Extensão de prazo para execução da pesquisa**

Senhor Pesquisador,

Em resposta a Solicitação de Extensão de prazo para execução da pesquisa intitulada: **“Estudo histopatológico da Hepatite Delta em Rondônia: Caracterização Imuno-histoquímica do Antígeno Delta em amostras hepáticas de pacientes em acompanhamento no Ambulatório Especializado de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia - CEPEM”, nº CAAE: 0002.0.046.000-11**, sob sua responsabilidade, vimos por meio deste informar que em reunião realizada no dia 17 de Julho de 2015 a Comissão de Ética do CEPEM analisou sua solicitação de extensão, bem como o Relatório Parcial do estudo e decidiu **APROVAR a extensão de prazo de 22 meses**, a contar do reingresso da aluna Anita Sperandio Porto no Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP) que ocorreu em Março de 2014, tendo em vista os problemas citados no documento de solicitação, tais como a não obtenção de todas as amostras necessárias, a realização de exames imuno-histoquímicos e genotípicos para HBV e HDV.

Atenciosamente,


Ma. Flávia Serrano Batista
Coordenadora
CEP/CEPEM

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical –CEPEM
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos- CEP
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
Av. Guaporé, 215 - Lagoa Telefone: 3219-6012 / 3216-5442
Porto Velho – RO



ANEXO III



FICHA DE PONTO ATENDIMENTO/SERVIÇO ESPECIALIZADO EM HEPATITE
CENTRO DE PESQUISA MEDICINA TROPICAL DE RONDÔNIA
FICHA 01



HRO: _____ REGISTRO: _____ Data: ____/____/201____

NOME: _____						
ENDEREÇO: _____						
DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____		IDADE:	ANOS:	MESES:	DIAS:	
COR: (1 - BRANCA 2 - AMARELA 3 - PARDA 4 - NEGRA 5 - CABOCLO 6 - ERSC 7 - ÍNDIO)						
SEXO:		NATURAL:		CIDADE:		ESTADO:
ÚLTIMA PROCEDÊNCIA:			CIDADE:		ESTADO:	
HÁ QUANTO TEMPO?		ANOS	MESES	PROFISSÃO:		

ANTECEDENTES PESSOAIS:		(0 - NÃO REFERIDO; 1 - SIM; 2 - NÃO)	
ETILISMO <input type="checkbox"/>	HEPATITE <input type="checkbox"/>	HÁ _____ MESES	
TIPO <input type="checkbox"/>	(0 - NÃO REFERIDO 1 - A; 2 - B; 3 - NANB; 4 - DELTA; 5 - OUTROS)		
OUTROS ANTECEDENTES MÓRBIDOS:		MALÁRIA <input type="checkbox"/>	TABAGISMO <input type="checkbox"/>
		ESQUITOSSOMOSE <input type="checkbox"/>	HEMATOPATIA <input type="checkbox"/>
OUTROS ANTECEDENTES MÓRBIDOS RELEVANTES:			
A. _____			
B. _____			
C. _____			
TRANSFUSÕES DE SANGUE E/OU DERIVADOS <input type="checkbox"/>		(0 - NÃO REFERIDO; 1 - SIM; 2 - NÃO)	
ÚLTIMA TRANSFUSÃO? _____		MESES OU _____ ANOS _____	
MANIPULAÇÃO/CONTATO ÚLTIMOS 6 MESES:		(0 - NÃO REFERIDO; 1 - SIM; 2 - NÃO)	
A. <input type="checkbox"/> DIÁLISE	B. <input type="checkbox"/> CIRURGIA	C. <input type="checkbox"/> INJEÇÕES/AGULHAS	
D. <input type="checkbox"/> VACINAS	E. <input type="checkbox"/> TATUAGEM	F. <input type="checkbox"/> TÓXICO INJETÁVEL	
G. <input type="checkbox"/> CONTACTOS COM DOENTES	H. <input type="checkbox"/> TRABALHOS ODONTOLÓGICOS		
I. <input type="checkbox"/> OUTROS, ESPECIFICAR.: _____	_____		

HRO: _____ REGISTRO: _____ Data: ____/____/201____

ANTECEDENTES PESSOAIS

ATIVIDADE SEXUAL:

Nº DE PARCEIROS ATUAIS:

BISSEXUAL:

HETEROSSEXUAL:

TEMPO DA ATUAL PARCERIA:

MÉDIA MENSAL DE REL. SEXUAIS:

HOMOSSEXUALIDADE:

(0 - NÃO REFERIDO 1 - SIM 2 - NÃO)

MEDICAMENTOS ATUAIS:

(0 - NÃO REFERIDO 1 - SIM 2 - NÃO)

OBSERVAÇÕES: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES: (ICTERÍCIA / HEPATITE / MARCADORES)

A. PAI

B. IRMÃOS

C. FILHOS

D. MÃE

E. CÔNJUGE

F. OUTROS

QUAIS? _____

HRO: _____ REGISTRO: _____ Data: _____ / _____ /201_____

SINTOMAS ATUAIS:

(1 - SIM 2 - NÃO)

- | | | | |
|---|---|--|-------------------------------------|
| 1. <input type="checkbox"/> ASTENIA | 2. <input type="checkbox"/> ANOREXIA | 3. <input type="checkbox"/> NÁUSEAS | 4. <input type="checkbox"/> VÔMITOS |
| 5. <input type="checkbox"/> FEBRE | 6. <input type="checkbox"/> AVERSÃO A CIGARRO | 7. <input type="checkbox"/> DORES OESTEOARTICULARES | |
| 8. <input type="checkbox"/> DORES MUSCULARES | 9. <input type="checkbox"/> CEFALÉIA ATUAL | 10. <input type="checkbox"/> DIARRÉIA | |
| 11. <input type="checkbox"/> ICTERÍCIA | 12. <input type="checkbox"/> COLÚRIA | 13. <input type="checkbox"/> ACOLIA | |
| 14. <input type="checkbox"/> PRURIDO | 15. <input type="checkbox"/> SANGRAMENTO DE PELE/MUCOSA | 16. <input type="checkbox"/> ALTERAÇÕES NEUROPSÍQUICAS | |
| 17. <input type="checkbox"/> EDEMA | 18. <input type="checkbox"/> ASCITE | 19. <input type="checkbox"/> SANGRAMENTO DIGESTIVO | |
| 20. <input type="checkbox"/> EMAGRECIMENTO | 21. <input type="checkbox"/> SINAIS DE DESNUTRIÇÃO | | |
| 22. <input type="checkbox"/> PALIDEZ CUTÂNEO-MUCOSA | 23. <input type="checkbox"/> ARANHAS VASCULARES | | |
| 24. <input type="checkbox"/> BAQUETEAMENTO | 25. <input type="checkbox"/> ERITEMA PALMAR | 26. <input type="checkbox"/> GINECOMASTIA | |
| 27. <input type="checkbox"/> CIRCULAÇÃO COLATERAL | 28. <input type="checkbox"/> PERDA DE PELOS | | |
| 29. <input type="checkbox"/> HEMORRAGIA CUTÂNEA | 30. <input type="checkbox"/> ATROFIA MUSCULAR | | |
| 31. <input type="checkbox"/> OUTROS _____ | | | |

EXAME FÍSICO GERAL:

PESO (KG) _____ ALTURA (CM) _____ TEMPERATURA (°C) _____

ESTADO GERAL (1 - BOM 2 - REGULAR 3 - MAL)

FÍGADO: A. PALPÁVEL (1 - SIM 2 - NÃO)

TAMANHO RCD _____ CM AX _____

CONSISTÊNCIA: (0 - NÃO REFERIDO 3 - NORMAL 4 - AMOLECIDO
5 - POUCO ENDURECIDO 6 - MUITO ENDURECIDO)

BAÇO: A. PALPÁVEL (1 - SIM 2 - NÃO) TAMANHO _____ CM

PULMÃO:

CORAÇÃO:

HISTÓRIA CLÍNICA RESUMIDA: _____

ANEXO IV

SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO METAVIR

Fibrose:

- 0 – Sem fibrose
- 1 – Aumento do espaço porta, mas sem formação de septos
- 2 – Alargamento dos espaços porta com raras formações de septos
- 3 – Numerosos septos sem cirrose
- 4 – Cirrose

Fibrose centrolobular:

- 0 – Ausente
- 1 – Moderada
- 2 – Acentuada

Infiltrado portal. Agregados linfocitários e folículos:

- 0 – Nenhum
- 1 – Presença em menos do que 1/3 dos espaços porta na biópsia
- 2 – Presença em 1/3 a 2/3 dos espaços porta
- 3 – Em mais de 2/3 dos espaços porta

Infiltrado portal de polimorfonucleares e plasmócitos:

- 0 – Ausente
- 1 – Presente

Lesão de ducto biliar

Presença de linfócitos dentro do ductos:

- 0 – Nenhum ou raros
- 1 – Alterações degenerativas
- 2 – Perda dos ductos biliares

Proliferação ductular:

- 0 – Ausente
- 1 – Leve
- 2 – Moderado
- 3 – Acentuado

Alterações degenerativas dos ductos biliares:

Vacuolização

Balonização.

Necrose eosinofílica:

Necrose lobular focal:

0 – Ausente ou leve

1 – Moderado

2 – Acentuado

Necrose em ponte:

0 – Ausente

1 – Presente

Alterações degenerativas – Tumefação, necrose hialina:

0 – Ausente

1 – Leve

2 – Moderado ou acentuado

Hepatócitos multinucleados, colestase intracanalicular, hiperplasia de células de Kupffer e agragados linfocitários intra-sinusoidal:

0 – Ausente

1 – Presente

Índice conclusivo da atividade global da Hepatite crônica:

0 – Sem atividade histológica

1 – Atividade leve

2 – Atividade moderada

3 – Atividade acentuada

4 – Hepatite crônica lobular

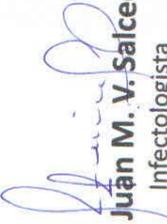
Fonte: An Algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The Metavir Cooperative Study Group. Hepatology, 1996; 24: 289-293. Adaptado.

CERTIFICADO

A Liga Acadêmica de Doenças Infecciosas e Parasitárias - LADIR confere a **MESTRANDA ANITA SPERANDIO PORTO** o certificado de participação na qualidade de palestrante no I Simpósio de Atualizações em Hepatites Virais, realizado no dia 19/05/2011, com o tema de **Estudos Histopatológicos da Hepatite Delta em Rondônia: caracterização imunohistoquímica do antígeno Delta em amostras de pacientes em acompanhamento no Ambulatório Especializado de Hepatites do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia – CEPEM.**



Porto Velho, 19 de maio de 2011.


Dr. Juan M. V. Salcedo
Infectologista
Coordenador Geral da LADIR


Danieli Grave Marini
Acadêmica de Medicina
Presidente da LADIR

ANEXO VI

 **Certificado**  n° 26897

11 a 15 de outubro de 2011 - Centro de Eventos Ruth Cardoso - Macaé - Alagoas - Brasil

Certificamos que

Porto, AS; Andrade, ZA; Salcedo, JMV;
apresentaram o trabalho

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO DA HEPATITE DELTA EM RONDÔNIA: CARACTERIZAÇÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO DELTA EM AMOSTRAS HEPÁTICAS DE PACIENTES EM
ACOMPANHAMENTO NO AMBULATÓRIO DE HEPATITES DO CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA
TROPICAL DE RONDÔNIA-CEPEM.**

na Sessão Pôsteres de **PATOLOGIA HEPÁTICA.**
Macaé, 15 de outubro de 2011.


Fernando Augusto Soares
Presidente do XXVIII Congresso Latino Americano de Patologia


Henrique de Oliveira Costa
Presidente do XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia

Promoção e Realização

 Sociedade Brasileira de Patologia

 Sociedade Latinoamericana de Patologia

ANEXO VII

AVALIAÇÃO DAS LESÕES CELULARES REVERSÍVEIS

Degeneração hidrópica

É o aumento do volume celular do hepatócito com palidez das reações tintoriais do citoplasma resultante de alterações funcionais da bomba de sódio, com retenção citoplasmática de água e deste íon. Também conhecida como tumefação celular, edema celular e degeneração hidrópica.

Esteatose

A esteatose é o acúmulo de lipídios no citoplasma na forma de vacúolos, que empurram o núcleo para a periferia. Caracteriza-se por imagens negativas, vazias, deixadas pela digestão, durante o processamento histológico em xilol e parafina, das gotículas de gordura, predominantemente triglicéridos, acumuladas nos citoplasmas dos hepatócitos.

Pode se apresentar em dois padrões:

- Esteatose microvesicular: múltiplos pequenos vacúolos de gordura no citoplasma de cada célula hepática, que se mostra claro, com núcleos em posição central.
- Esteatose macrovesicular: Grandes vacúolos de gordura em geral únicos em cada hepatócito, que rechaçam o núcleo para a periferia.

Um padrão visto mais comumente em casos agudos e fulminantes de Hepatite Delta são as “células em mórula”: Também chamadas células em aranha, representam hepatócitos exibindo intensa balonização, com contornos lobulados, imagens negativas de gotículas de gordura sob a forma microvesicular acima descrita, com núcleos aumentados de volume, lobulados, por vezes com nucléolo evidente.

Depósito de ferro

O depósito de ferro intra-hepatocitário e no citoplasma de células de Küpffer pode ocorrer em hepatopatias crônicas. É pesquisado através da coloração de Perls, que

detecta grânulos azulados no citoplasma. Esta coloração foi realizada em todos os casos e quantificada conforme a Tabela 3, acima.

Colestase

A colestase hepática é caracterizada pela deposição de pigmento bilirrubínico, e é dividida em intracelular, quando no citoplasma dos hepatócitos ou extracelular, quando em forma de “plugs” ou cilindros biliares, no interior de canálculos dilatados.

Hepatócitos em vidro fosco

São hepatócitos apresentando área eosinofílica hialina no citoplasma, com halo esbranquiçado entre esta área e a membrana citoplasmática. Representa acúmulo de HBsAg e pode ser visto por coloração de rotina (H&E).

ANEXO VIII

AVALIAÇÃO DAS LESÕES CELULARES IRREVERSÍVEIS E DA FIBROSE

Necrose hepatocelular

A necrose hepatocelular varia quanto à intensidade (Tabela 3) e localização:

- Necrose na zona 3 de Rappaport: necrose centrolobular.
- Necrose na zona 2 de Rappaport: necrose mediozonal.
- Necrose na zona 1 de Rappaport: necrose periportal.
- Necrose panacinar: necrose que quando acomete as três zonas acima.

Necrose em “saca-bocados”

Atualmente chamada de hepatite de interface, corresponde à morte de hepatócitos da interface epitélio-mesênquima, por apoptose.

Apoptose

Morte focal de hepatócitos sem processo inflamatório adjacente. Histologicamente, as células tem citoplasma encolhido, eosinofílico, denso e núcleo picnótico e hipercromático. No fígado, é conhecida como corpúsculo de Councilman.

É a primeira resposta celular a muitos eventos e acompanha hepatite viral, doença hepática alcoólica e doença hepática gordurosa não-alcoólica, doença hepática colestática, injúria por isquemia e reperfusão (CANBAY et al., 2004). Estímulos pró-apoptóticos combinados com receptores sinalizadores de morte celular promovem resposta inflamatória hepática, associados a sinalizadores extracelulares, como mediadores lipídicos (LAUBER et al., 2003).

Fibrose

A fibrose é o resultado mais temível das doenças crônicas que afetam o fígado. A neoformação de tecido conjuntivo tem padrões diferentes de acordo com a doença

hepática. A deposição de colágeno ao redor de veia centro-lobular pode ser vista na organização dos septos passivos formados por necrose hepatocelular e colapso reticulínico, na evolução das hepatites agudas para cura ou para a cronicidade, notando-se também a produção de colágeno em espaços-porta.

Nas hepatites crônicas, os septos ativos são mais largos e arredondados, com restos celulares, infiltrado inflamatório e colágeno em seu interior, podendo haver a formação de septos porta-porta e, com o passar do tempo, também porta-centro.

Para a avaliação de fibras colágenas, foi utilizada a técnica histoquímica pelo Método do Picrosirius, realizada na Plataforma de Histotecnologia do Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia. Para a caracterização da fibrose neste estudo, fizemos uma avaliação semiquantitativa da proporção e distribuição do tecido conjuntivo fibroso portal e lobular por intermédio da coloração de Picrosirius (ANDRADE et al, 1997).

A fibrose foi avaliada quanto a sua localização (portal, porta-porta, centro-porta, perissinusoidal) e feita a semiquantificação, conforme preconizado em um estudo específico anterior utilizando modelo animal (ANDRADE et al., 1997).