

Infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) em crianças e jovens

M. F. BARROS, S. R. MATIAS E J. A. MACHADO CAETANO

Serviço de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas (UNL)

Resumo

A infecção pelo vírus da hepatite B contraída na infância é grave pela frequente evolução para cronicidade e suas consequências. Com o objectivo de melhor caracterizar a situação em doentes portugueses, estudámos um grupo de 46 crianças de menos de 15 anos comparando-o com um grupo de jovens entre 16 e 25 anos e outro de adultos, quanto a marcadores serológicos e presença de replicação viral activa através da pesquisa de DNA de HBV em circulação por técnicas de hibridação molecular e PCR. As crianças apresentaram alta percentagem (86,9) de situações de virémia, significativamente superior em relação aos adultos. A seroconversão para anti-HBe e perda de AgHBe, embora aumente de frequência com a idade, continua a ser acompanhada de replicação viral em cerca de 50% dos casos.

A infecção crónica apesar de resposta imunitária está associada à presença de mutantes na região "core" do genoma de HBV, que poderão não ser apenas responsáveis pela fuga a essa resposta mas também por alterações na apresentação e reconhecimento antigénicos.

Palavras-chave: hepatite B crónica, crianças, mutantes HBV.

Summary

HBV chronic infection has a poor prognosis, specially if acquired during childhood. With the aim of contributing for a better knowledge of the situation among Portuguese patients we have studied a group of 46 HBV infected children under 15 years of age, comparing them to infected youths between 16 and 25 and adults over 25 years and evaluating active viral replication through HBV-DNA detection by molecular hybridisation and PCR.

Viraemia was present in 86.9% of children and in 63.1% of adults, a difference that is statistically significant ($p < 0.01$). Seroconversion to anti-Hbe increases with age but in about 50% of cases HBV-DNA is still present.

Chronic infection in spite of immune surveillance is commonly associated with mutants in core region of HBV genome capable of eluding and probably antagonizing immune response.

Key-words: chronic hepatitis B, childhood, HBV mutants.

Introdução

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV)⁽¹⁾ é grave pelo perigo de evolução para cronicidade, com danos hepáticos que podem levar a cirrose e carcinoma primário do fígado⁽²⁾. Em crianças, quer a transmissão seja vertical quer horizontal, a tendência para infecção crónica é ainda maior⁽³⁾, por imaturidade do sistema imunitário ou pela infecção por variantes virais capazes de fuga às defesas imunológicas⁽⁴⁾.

Em Portugal, avaliações da percentagem de portadores crónicos nos inícios da década de oitenta^(5,6) referem valores abaixo de 1,5%. No entanto, e não obstante esforços de prevenção em recém-nascidos, através da pesquisa de antigénio HBs em grávidas e imunoprofilaxia nas crianças no caso de a mãe ser AgHbs positivo⁽⁷⁾, a situação

poderá ter evoluído⁽⁸⁾ e o problema da infecção em crianças e jovens ser importante. Numa amostra obtida no Serviço de Imunologia da FCM (UNL), ao longo de cerca de 5 anos, em 382 soros 46 (12,8%) pertenciam a indivíduos com menos de 15 anos e 81 (20,9%) a jovens entre 16 e 25 anos. Com o objectivo de aprofundar o estudo da infecção crónica por HBV em crianças, fizémos uma comparação com jovens e adultos quanto a marcadores serológicos de infecção e quanto à presença de DNA viral circulante – tomado como indicador de replicação viral activa – realizando a pesquisa de DNA viral por hibridação molecular⁽⁹⁾ e após amplificação enzimática "in vitro", por reacção polimerásica em cadeia (PCR)^(10,11).

Tivemos ainda como objectivo uma caracterização rápida do vírus circulante quanto a variações na região C (core)⁽¹²⁾ do seu genoma, uma vez que nela reside informação para proteínas expressas pelos hepatócitos infectados e cujo reconhecimento imunológico condiciona a eliminação da infecção.

Entregue para publicação em 19/11/96.

Aceite para publicação em 09/05/97.

Doentes e Métodos

Os soros estudados foram obtidos por colheita de 5ml de sangue periférico em tubo seco, separados por centrifugação e mantidos a -20°C até utilização.

Para cada caso foi feito um registo da situação quanto a marcadores serológicos de HBV – avaliados por técnicas imunoenzimáticas de rotina: AgHBs e AgHBe, anti-corpos anti-HBc, anti-HBs e anti-HBe – bem como da idade e sexo dos doentes.

No Quadro I são resumidas as características dos doentes estudados, distribuídos por grupos etários.

QUADRO I
Distribuição dos doentes AgHBs+ por grupo etário

Período	0-15 anos	16-24	> 25	Total
1991	0	2	12	14
1992	8	8	19	35
1993	9	20	73	102
1994	16	26	67	109
1995	12	21	68	101
1996*	1	4	16	21
TOTAL	46	81	255	382

* 1.º trimestre

A pesquisa de DNA viral sérico foi feita por dois métodos: (a) hibridação molecular usando sondas marcadas por isótopos radioactivos e correspondentes à totalidade do genoma de HBV obtido a partir do plasmídeo recombinante pCP10⁽¹³⁾ e marcado por ³²P⁽¹⁴⁾; (b) amplificação enzimática "in vitro" por reacção polimerásica em cadeia (PCR) e iniciadores adequados à amplificação de uma região de 603pb situada entre as posições 1902 e 2505 do genoma viral⁽¹⁵⁾.

O DNA de HBV foi isolado a partir de 0,2ml de soro, por extracção fenólica após digestão enzimática das proteínas séricas seguindo o protocolo habitual para isolamento de ácidos nucleicos⁽¹⁶⁾, com ligeiras modificações: – ao soro adiciona-se igual volume de Tris-HCl 20mM pH=7, 5, 50mM EDTA, 150mM NaCl contendo 0,2% de sulfato de dodecil e sódio (SDS) e 0,4mg/ml de proteinase K (Sigma).

Após 2 horas a 65°C a mistura é extraída duas vezes com igual volume de fenol, clorofórmico e álcool isoamílico (25:24:1) e o DNA presente na fase aquosa precipitado por adição de dois volumes de etanol absoluto, em presença de 25µg/ml de tRNA de levedura (BRL). Depois de 12 a 16 horas a -20°C e centrifugação 30 minutos a 10.000g o precipitado é lavado em etanol a

70%, centrifugando de igual modo, e suspenso, após completa evaporação do etanol, em 60µl de Tris-HCl 10mM pH=7, 5, EDTA 1mM no caso de ser analisado por hibridação molecular ou em 40µl de H₂O no caso de PCR.

Para hidridação as amostras são depositadas sobre membrana de Nylon 0,45µ (Appligene) após aquecimento a 100°C por 10 minutos e rápido arrefecimento em gelo. Os filtros foram hibridados com 10ng/ml de sonda radioactiva (AE=5 a 8 x 10⁸ cpm/µg) seguindo o protocolo descrito por Bonino⁽⁹⁾.

Para PCR utilizaram-se 20µl de amostra em 100µl de mistura de reacção contendo tampão adequado (Pharmacia), 0,25µM de cada um dos quatro desoxiribonucleótidos, 5U de Taq DNA polimerase (Pharmacia) e 20 pmoles do seguinte par de iniciadores⁽¹⁵⁾:

5' CATGGACATTGACCCGTTAT 3' (pos 1902-1921)

5' GAATAAAGCCCCGTAAAGTT 3' (pos 2505-2486)

Depois de 30 ciclos de 30s (94°C), 60s (48°C), 60s (72°C) e uma primeira etapa de desnaturação 10 minutos a 94°C, a amplificação foi verificada por electroforese de uma alíquota em gel de agarose (Sigma) a 2%.

Para análise de variantes os amplificados foram hidrolizados pelos enzimas Ava II e MspI, seleccionados com a ajuda do programa "Genet"⁽¹⁷⁾ e os fragmentos obtidos separados por electroforese em gel de 10% de poliácridamida em TBE⁽¹⁶⁾, fotografado após coloração por brometo de etídio.

Resultados

Encontrámos uma alta percentagem de portadores crónicos com replicação viral activa em doentes com idade inferior a 15 anos. Encontrámos também mutantes na região «core» que diferem da estirpe selvagem descrita por Ono⁽¹⁸⁾ por mutações pontuais que criam ou eliminam locais de reconhecimento para enzimas de restrição e que se distinguem rapidamente por uma análise do polimorfismo dos fragmentos obtidos por hidrólise enzimática, por nós anteriormente desenvolvida e descrita^(15, 19).

Em cerca de 600 amostras de soro estudadas entre 1991 e o 1.º trimestre de 1996, 382 apresentavam AgHBs, bem como outros marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B, conforme se pode ler no Quadro II, em que os resultados da pesquisa de DNA viral circulante, nas mesmas amostras realizadas por hibridação molecular ou por PCR, são também apresentados, agrupando as amostras conforme a idade dos doentes de que foram recolhidas.

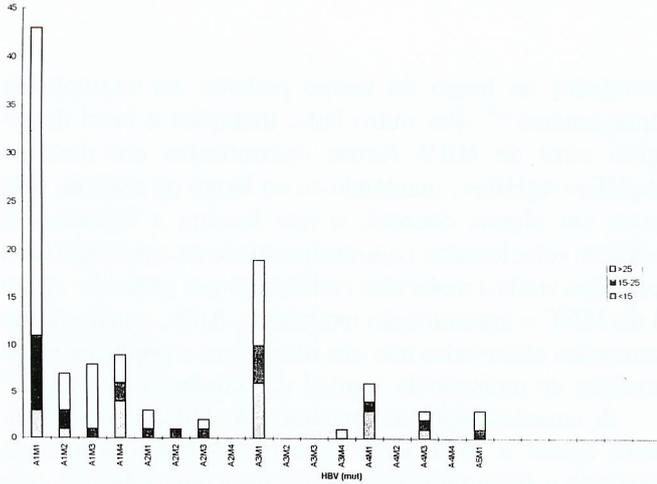


FIG. 1 – Distribuição de mutantes core de HBV nos diferentes grupos etários

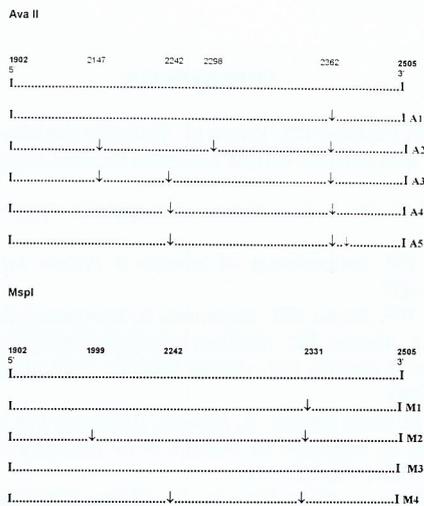


FIG. 2 – Polimorfismo na região core de HBV, A1 e M1 correspondem ao padrão da estirpe selvagem

Para além de crianças com menos de 15 anos representarem 12,8% das amostras colhidas, neste grupo verificou-se a maior prevalência de portadores crónicos de antígenos virais (32 AgHBs+AgHBe+ em 46=69,5%) e de portadores com replicação viral activa (40 em 46=86,9%).

No grupo etário entre 16 e 25 anos (cerca de um quinto do total de amostras) 38,3% eram AgHBs+AgHBe+ e 75,3% HBV DNA+. No grupo de adultos com mais de 25 anos encontrámos 66 amostras AgHBs+AgHBe+ (25,9%) e 63,1% HBV DNA+. A diferença atinge significado estatístico ($p < 0,01$ por teste de χ^2) entre o grupo de crianças e o de adultos mas não entre crianças e jovens ($p > 0,5$). A diminuição da percentagem de amostras AgHBs+AgHBe+ é acompanhada por um aumento da presença de anticorpos anti-HBe, porém a seconversão para antiHBe+ não é sinónimo de total eliminação de hepatócitos infectados e, em qualquer dos grupos, cerca de 50% de doentes anti-HBe+ são portadores de DNA viral circulante, ou mesmo mais no caso dos jovens. (Quadro II).

Quanto à presença de mutantes virais estes foram pesquisados, em particular nos doentes em que foi possível um estudo ao longo do tempo, por análise de polimorfismo de fragmentos obtidos após hidrólise enzimática de uma região de 603pb do genoma de HBV que abrange a região core, e cujas sequências aminoacídicas codificadas estão presentes simultaneamente na proteína do core do viriões e no antígeno e.

Em 18 amostras de crianças, 15 apresentavam mutações em relação à sequência "selvagem" descrita por Ono⁽¹⁸⁾. Em 23 soros do grupo dos jovens, 15 eram mutantes, sendo a sua distribuição relativa representada na

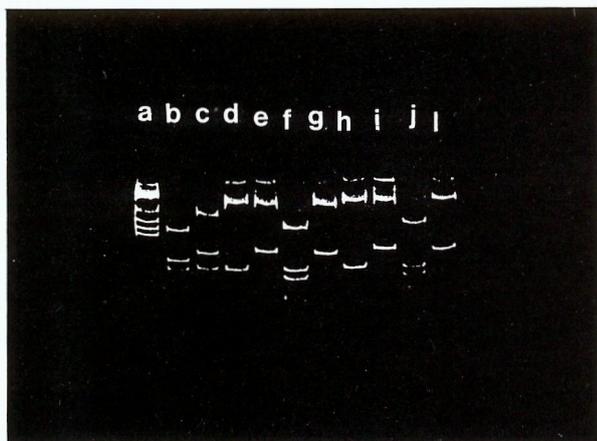
QUADRO II
Marcadores serológicos e DNA viral circulante nos doentes testados

Ano	Grupo 0 a 15 anos					Total	Grupo 16 a 25 anos					Total	Grupo > 25 anos					Total	TOTAL
	s+e+ DNA+	s+αe+ DNA+	s+αe+ DNA-	s- DNA+	s- DNA-		s+e+ DNA+	s+αe+ DNA+	s+αe+ DNA-	s- DNA+	s- DNA-		s+e+ DNA+	s+αe+ DNA+	s+αe+ DNA-	s- DNA+	s- DNA-		
1991	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	3	1	8	0	12	14		
1992	6	1	1	0	0	8	6	0	2	0	8	3	4	12	0	19	35		
1993	6	1	2	0	0	9	11	5	4	0	20	24	26	21	2	73	102		
1994	12	2	2	0	0	16	8	9	9	0	26	14	23	29	1	67	109		
1995	7	3	1	1	0	12	4	12	4	1	21	16	35	15	2	68	101		
1996	1	0	0	0	0	1	1	3	0	0	4	6	6	4	0	16	21		
TOTAL	32	7	6	1	0	46	31	30	19	1	81	66	95	89	5	255	382		

s+ . AgHBs) e+ (AntiHBe) e+ (antiHBe)

Figura 1, bem como a distribuição de mutantes nos outros grupos etários, não se verificando diferenças aparentemente significativas, embora as amostras – em termos de doentes infectados pelo mesmo tipo de mutante – não tenham ainda dimensão adequada para análise estatística.

Os mutantes são designados por letras e números conforme os padrões de hidrólise por Ava II (A) e por Msp I (M) que se ilustram em esquema na Figura 2 e na Fotografia 1.



Fotografia 1 – Polimorfismo da região core do genoma do vírus da hepatite B

Poço a: Marcador de referência (pBRxHinf II); poços b e c: amostra hidrolizada por Ava II e MspI respectivamente, mutante A2M2; poços d e e: A1M1 (vírus selvagem); poços f e g (A3M1); h e i (A1M1); j e l (A3M1).

Discussão

Embora os nossos resultados não se refiram a estudos de prevalência na população, uma vez que as amostras recolhidas são provenientes de doentes encaminhados para o Serviço de Imunologia através de várias consultas hospitalares, é importante sublinhar a frequência de portadores crónicos e de portadores com replicação viral activa em crianças, situação que se mantém em jovens de menos de 25 anos, apesar de ser aparente alguma seroconversão espontânea de AgHBe+ para anti-HBe+,

Porém, a utilização de técnicas sensíveis para pesquisa de DNA viral como hibridação molecular e PCR indica que cerca de 50% dos doentes anti-HBe+mantém replicação e vírus circulante.

Mutações a nível da região précore^(4, 20, 21) estarão na origem da possibilidade de fuga a resposta imunitária. A análise da região core do genoma de HBV por PCR-RFLP permite um estudo das populações virais de doentes cronicamente infectados, em que poderá estar em causa não só fuga à resposta imunitária mas a possibilidade de antagonismo da actuação de células T citotóxicas^(22, 23).

Dois casos de "shift" da dominância de vírus mutante para retorno a dominância de vírus selvagem em doentes

estudados ao longo do tempo poderão ser exemplo de antagonismo⁽²⁴⁾. Por outro lado, mutações a nível da região core de HBV foram encontradas em doentes AgHBs+AgHBe+, mantendo-se ao longo de mais de dois anos em alguns doentes, o que levanta a hipótese de estarem relacionadas com incapacidade de associação dos péptidos virais a moléculas codificadas por genes de classe I do MHC e apresentação antigénica. Aliás, a maioria das mutações observadas não são silenciosas e implicam substituição de aminoácido a nível da sequência de core⁽²⁴⁾.

A caracterização de mutantes de HBV poderá também ajudar a estabelecer uma previsão em termos de resposta a imunomoduladores⁽²⁵⁾ para uma infecção cujo prognóstico é sempre reservado, e particularmente se contraída na infância.

REFERÊNCIAS

- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum from patients with Australia antigen associated hepatitis *Lancet* 1970; i: 695-698.
- Sherlock S. The natural history of hepatitis B *Postg. Med. J.* 1987; 63: 7-11.
- Shapiro CN. Epidemiology of hepatitis B *Pediatr. Inf. Dis. J.* 1993; 12: 433-437.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziannis S, Karayannis P, McGarvey M, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection *Lancet* 1989; ii: 588-590.
- Lecour H, Tomé Ribeiro, A, Amaral, Rodrigues MA. Prevalência do antígeno de superfície da hepatite B na população portuguesa. *O Médico* 1981; 98: 327-331.
- Santos Pinto A, Canas Ferreira, W., Simões ME, Baptista Marques JM. Estudo de hepatites por vírus B em Portugal. *O Médico* 1982; 102: 586-591.
- Centeno MJ, Moucho M, Martins A, Leite LP, Santos NT *Arq. Med.* 1994; 8: 73-76.
- Caetano JA. Erradicação da hepatite, B: em Portugal, um desafio ao alcance do Serviço Nacional de Saúde *Acta Médica Port.* 1990; 2: 71-74.
- Bonino F, Boyer B, Nelson J, Engel R, Verme G, Gérin J. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in liver *Hepatology* 1981; 1: 386-391.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
- Bréchet C. Polymerase chain reaction: a new tool for the study of viral infection in hepatology. *J. Hepatol* 1990; 11: 124-129.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus *Nature* 1985; 317: 489-495.
- Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, Chany C, Tiollais P. Excretion of hepatitis B surface antigen surface particles from mouse cells transformed with cloned viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1980; 77: 45-49.
- Rigby PW, Diekmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity by in vitro nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 1977; 113: 237-251.
- Barros MF, Rodrigues P, Caetano JA. Precore and core variants in chronically infected portuguese patients *Proc. V Spanish Portuguese Congress of Biochemistry.* Salamanca, September 28 -30 1994.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour 1982.
- Rodrigues P. "Genet" v. 1.0 for Windows. DGE n.º 1258, 1994.

18. Ono Y, Onda H, Sasada R, Igarashi K, Sugino Y, Nishiota K. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA subtypes adr and adw *Nuc. Ac. Res.* 1983; 11: 1747-1757.
19. Barros MF, Matias SR, Santos AC, Caetano JA. Precore and core variants of hepatitis B virus in chronically infected adults and children Proc. of the VI International symposium on Hepatitis. Madrid, January 27-30, 1996.
20. Brinetto MR, Stemler M, Schodel F, Will H, Ottonelli A, Rizetto M, Bonino F. Identification of HBV variants which cannot produce precore derived HBeAg and may be responsible for severe hepatitis. *Ital. J. Gastroent.* 1989; 21: 151-154.
21. Tong S, Li J, Vitivski L, Trépo C. Active hepatitis B replication in the presence of antiHBe is associated with viral variants containing an inactive preC region. *Virology* 1990; 176: 596-603.
22. Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, De Carli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994; 269: 407-410.
23. Nowak MA, Bangham CR. Population dynamics of Immune responses to persistent viruses. *Science* 1996; 272: 74-79.
24. Barros MF, Rodrigues P, Matias SR, Santos AC, Caetano JA Core variants of hepatitis B virus (HBV) detected by PCR-RFLP *J. Viral Hepat.* (submetido).
25. Naoumov NV, Thomas MG, Mason AL, Chokshi S, Bodicky CJ, Farzaneh F, Williams R, Perrillo RP. genomic Variations in the hepatitis B core gene: a possible factor influencing response to interferon α treatment *Gastroenterology* 1995, 108: 505-514.

Correspondência: M. F. Barros
 Serviço de Imunologia
 Faculdade de Ciências Médicas (UNL)
 Grupo de Sentena, 130
 1100 Lisboa