

História natural da hepatite crónica pelo vírus da hepatite B

J. Areias*

Resumo

As lesões hepáticas de hepatite crónica podem ser da responsabilidade do vírus da hepatite B (VHB).

A prevalência da infecção pelo VHB varia largamente através do mundo, desde áreas altamente endémicas na maior parte dos países em vias de desenvolvimento, até áreas de baixa endemicidade nos países desenvolvidos. A nível mundial, calculam-se em mais de 300 milhões as pessoas cronicamente infectadas com o VHB. A hepatite crónica pelo VHB constitui causa importante de morte, quer por cirrose, quer por carcinoma hepatocelular.

O objectivo deste trabalho consistiu na revisão da epidemiologia, história natural e prognóstico da hepatite crónica pelo VHB.

Palavras chave: vírus da hepatite B, hepatite crónica B, história natural.

Abstract

Chronic hepatitis is an etiologically diverse syndrome that may be precipitated by hepatitis B virus (HBV).

Chronic hepatitis B virus (HVB) is a world-wide health problem. More than 300 millions persons are chronically infected with this virus. Chronic hepatitis B is a serious disorder that may lead to cirrhosis, hepatic failure, and hepatocellular carcinoma.

Chronic hepatitis is defined by biochemical (elevated serum aminotransferase levels) or clinical evidence of liver disease of at least 6 months duration, and liver biopsy confirmation of unresolving hepatic inflammation.

The purpose of this study was to review epidemiology, natural history and prognosis of chronic hepatitis B.

Key words: *chronic hepatitis B, hepatitis B virus, natural history.*

Generalidades sobre infecção e biologia molecular do vírus da hepatite B (VHB)

A hepatite crónica B constitui causa importante de morte, quer por cirrose, quer por carcinoma hepatocelular^{1,2,3}.

A nível mundial, calculam-se em mais de 300 milhões as pessoas cronicamente infectadas com o vírus da hepatite B (VHB), das quais mais de 250 000 morrem anualmente de doença hepática crónica associada com o VHB^{4,5}.

A prevalência da infecção pelo VHB varia largamente através do mundo, desde áreas altamente endémicas na maior parte dos países em vias de desenvolvimento, até áreas de baixa endemicidade nos países desenvolvidos^{5,6}. Nos Estados Unidos e na Europa, a hepatite crónica B é relativamente pouco comum, mas é causa importante de morbidade e de mortalidade por doença hepática.

Um estudo populacional seroepidemiológico⁵ recentemente levado a cabo nos Estados Unidos mostrou que 0,43% da população era Ag HBs positiva, indicando que aproximadamente 1 milhão de americanos está cronicamente infectado com o VHB.

O VHB, identificado em 1965 por Blumberg⁷, é um hepadnavírus^{8,11}. Os hepadnavírus são vírus hepatotrópicos que incluem não somente o VHB humana, mas também o vírus da hepatite da marmota (WHV), do pato de Pequim (DHBV) e do esquilo castanho (GSHV)^{1,11,13}.

Estes vírus podem originar infecção vírica persistente, mas só o VHB e o WHV podem causar hepatite crónica activa^{12,14,15}. Estabeleceu-se também uma relação entre a infecção crónica pelo VHB e o carcinoma hepatocelular¹⁶⁻²⁵.

A estrutura do genoma vírico do VHB foi identificada em 1975 por Summers *et al.*²⁶ e definida com maior rigor em 1979, após clonagem do ADN vírico²⁷, sendo o mais pequeno genoma vírico humano conhecido^{9,28}. É constituído por uma molécula de ADN circular e parcialmente em cadeia dupla⁹. As duas cadeias de ADN têm comprimento diferente. A cadeia longa (L) tem comprimento fixo e, à excepção de uma curta interrupção, forma um círculo contínuo; a cadeia curta (S) tem comprimento variável, correspondendo a 50% da cadeia longa. A estrutura circular do genoma é assegurada essencialmente por 220 nucleotídeos da extremidade 5' de cada cadeia; esta região é chamada coesiva²⁸.

O comprimento do genoma varia segundo o subtipo do vírus. Conhece-se, desde há muito tempo, a existência de subtipos, cuja prevalência varia segundo a localização geográfica²⁹.

O determinante antigénico «a», cuja estrutura molecular não é realmente conhecida, é comum a todos os subtipos; 2 pares de determinantes exclusivos estão associa-

* Professor Auxiliar de Medicina Interna do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto; Assistente estrangeiro de Hepatologia dos Hospitais de Paris; Assistente Hospitalar Graduado de Gastrenterologia do Hospital Geral de Santo António.

dos ao determinante «a», definindo os subtipos clássicos *adw*, *adr*, *ayzv*, *ayr*²⁹.

O genoma do VHB é constituído por 4 fases de leitura aberta (*Open Reading Frame-ORF*), conservadas apesar dos diferentes subtipos víricos e localizadas na cadeia longa¹¹.

A fase de leitura aberta é uma sequência nucleotídica codificante, permitindo a transcrição e a tradução do gene.

Cada uma destas ORF codifica para proteínas do vírus. Estas diferentes ORF acavalam-se, permitindo, assim, a este pequeno genoma aumentar a sua capacidade codificante. As 4 ORF da cadeia longa são chamadas S-pré-S, C, P e X^{11,30}.

A região S ou ORFS codifica para a proteína do envelope que suporta a determinante antigénica de superfície HBs. A região S-pré-S codifica para as proteínas do envelope vírico e divide-se nas regiões S, pré-S1 e pré-S2²⁸. Pensa-se que a região pré-S2 desempenha papel importante na ligação do vírus aos hepatócitos³¹. *In vitro* tem a propriedade de se ligar com a albumina humana sérica polimerizada (PHSA)¹¹. Receptores semelhantes para a PHSA foram descritos sobre os hepatócitos³² e são específicos da albumina humana. A sua sequência N terminal codifica para a região pré-S2 e contém um epítoto dominante, localizado na superfície do envelope. Pensa-se que induz o aparecimento de anticorpos neutralizantes, inibindo a fixação directa do vírus à membrana hepatocitária, e que exerce provavelmente papel importante na ligação do vírus ao hepatócito³³.

O antígeno pré-S2 é um bom marcador de replicação vírica³⁴, correlaciona-se com a quantidade de ADN do VHB e está presente, qualquer que seja o seu estatuto, no sistema HBe. A sequência pré-S1 é essencial para o reconhecimento do receptor hepatocitário¹¹.

A hepatite crónica é uma lesão crónica do fígado caracterizada por infiltração dos espaços porta e das zonas periportais por células mononucleadas (linfócitos), necrose dos hepatócitos da lâmina limitante, bem como por fibrose portal e periportal. Nas formas mais graves, estas 3 lesões penetram no interior do lóbulo, em direcção da veia centrolobular, realizando uma topografia em pontes, estendendo-se dos espaços porta à veia centrolobular. A longo prazo, a hepatite crónica pode determinar o desenvolvimento de cirrose³⁵⁻³⁷.

Os argumentos a favor de hepatite crónica pelo VHB são os seguintes^{3,35,38,39}: (a) presença no soro do Ag HBs; (b) presença de marcadores séricos de multiplicação vírica (Ag HBe e/ou ADN do VHB); (c) ausência de anticorpos anti-Delta.

A incidência do portador crónico do VHB com hepatite crónica é de 20-30 novos casos por milhão e por ano nos países da Europa Ocidental³⁵ (países de baixa endemicidade). Menos de 10% dos habitantes encontram o VHB no fim da sua vida. A contaminação concentra-se em certos

grupos de alto risco^{5,35,40-41}, principalmente o pessoal de Saúde, os indivíduos transfundidos (em particular os hemodialisados e os hemofílicos recebendo factor anti-hemofílico), os homossexuais masculinos, os toxicómanos e os indivíduos vivendo no agregado familiar de um portador crónico do VHB³⁸. Contudo, a despeito do Ag HBe negativo, 20 a 90% desses doentes são positivos para o ADN do VHB no soro e expressão do Ag HBe no fígado. A persistência da replicação do VHB em doentes com hepatite crónica Ag HBe negativo está geralmente associada a doença hepática grave e a mau prognóstico^{42,43}.

História natural da hepatite crónica pelo VHB

A cirrose é a consequência de lesões prolongadas dos hepatócitos, qualquer que seja a sua causa. Os hepatócitos destruídos conduzem ao desenvolvimento de quantidade exagerada de tecido fibroso; produz-se, como consequência, a regeneração dos hepatócitos restantes; devido à fibrose, esta regeneração não leva à constituição de lóbulos normais, mas à formação de nódulos. A cirrose é um processo difuso^{35,37,44,45}. Em 2/3 dos portadores crónicos, o fígado ou é normal ou é o local de lesões limitadas e estáveis; nestes doentes, o risco de desenvolvimento ulterior de cirrose é pequeno³⁵. Por outro lado, em 1/3 dos portadores crónicos, o fígado é o local de uma hepatite crónica com risco de desenvolvimento ulterior de cirrose³⁵.

No decurso da infecção crónica, o VHB não é citopatogénico^{35,46,47}. As lesões hepatocitárias determinadas pela infecção crónica são a consequência da resposta da imunidade celular dirigida contra os hepatócitos que apresentam à sua superfície antígenos víricos (pensa-se que o antígeno contra o qual a reacção imunitária é dirigida é o Ag HBe)^{35,48,50}.

A história natural da infecção crónica pelo VHB^{30,35,37,51,58} compõe-se de 3 fases sucessivas (Quadro 1, Fig. 1), atendendo à relação entre o nível de replicação vírica e a actividade histológica.

Na primeira fase (fase de multiplicação vírica activa), com duração de um a vários anos, há uma forte multiplicação do VHB, traduzindo uma resposta imunitária celular insuficiente, sendo moderada a destruição dos hepatócitos. Os marcadores séricos, reflectindo a multiplicação do VHB (Ag HBe e ADN do VHB), estão presentes no soro^{35,59,60} numa percentagem elevada. Todos os graus de atingimento histológico podem corresponder a esta fase^{59,61,62}.

Na segunda fase (fase de seroconversão ou de depuração imune^{35,59,61} com duração de algumas semanas a alguns meses (por vezes 1 a 2 anos), a resposta imunitária torna-se mais vigorosa e, por esta razão, a multiplicação vírica está lentificada. Nesta fase, a destruição dos hepatócitos é mais marcada^{58,59} e existem lesões graves de hepatite crónica⁵⁹. O doente torna-se menos contagioso do que na fase precedente^{59,63}.

Na terceira fase (fase de inactivação vírica), a multiplicação vírica foi interrompida, mas o genoma vírico foi integrado no genoma do hospedeiro ^{25,51,64,65}. Não se encontram no soro partículas víricas completas. A destruição dos hepatócitos é pequena, porque o Ag HBe, não sendo sintetizado, não aparece mais à superfície dos hepatócitos ^{35,64}. A actividade das lesões hepáticas é pequena ou nula ⁵⁹. O doente é pouco ou nada contagioso. O risco de carcinoma hepatocelular, nesta fase da infecção pelo VHB, é particularmente elevado se existe uma cirrose ³⁶ e se se trata de um homem ³⁵.

Durante a terceira fase, pode assistir-se a períodos de reactivação ^{53,55,59,66-69} de várias semanas a vários meses, no decurso dos quais a multiplicação vírica se reinicia ^{70,71}. Podem produzir-se lesões hepáticas mais ou menos graves. O doente torna-se então fortemente contagioso ⁷¹.

O prognóstico da hepatite crónica activa pelo VHB é sério ^{35,45}. Na maior parte dos casos, após um intervalo de 10 a 40 anos depois da infecção inicial, desenvolve-se cirrose hepática, ^{35,59}. Por outro lado, 20% dos doentes atingidos por cirrose estão ameaçados de carcinoma hepatocelular ^{23,35,72}.

Três marcadores séricos do VHB têm sido usados como índices de replicação vírica activa: o Ag HBe, o ADN do VHB e a ADN polimerase do VHB. No momento actual, o marcador mais sensível de replicação é o ADN do VHB ^{38,73-75}. Este marcador de replicação do VHB é mais específico e mais sensível do que o Ag HBe e a ADN polimerase. O Ag HBe mede indirectamente a replicação do VHB, uma vez que circula como uma proteína solúvel independente das partículas víricas ^{76,77}.

A presença do ADN do VHB na hepatite crónica B foi sobretudo confrontada com a do Ag HBe, embora em grupos heterogêneos ^{38,75,78-80}; noutros estudos, a prevalência do ADN do VHB foi comparada à de outros marcadores de replicação vírica, como o Ag HBe intracelular ⁸¹⁻⁸⁴, e à actividade da ADN polimerase ^{38,85}. A prevalência do ADN do VHB nos doentes portadores do Ag HBe varia

entre 80 e 100%. É boa a correlação com a actividade da ADN polimerase ^{38,85}, a detecção do Ag HBe intracelular ^{82,84} e o aumento das transaminases. Quando a concentração sérica do ADN do VHB é alta, o Ag HBe tem localização principalmente nuclear e, por vezes, citoplasmática; é igualmente intranuclear quando o ADN do VHB é mais fracamente positivo.

No que respeita à actividade histológica, existe sobretudo boa correlação entre a actividade lobular e o ADN do VHB sérico ^{62,63,86}, sendo a correlação menos satisfatória com a actividade inflamatória periportal ⁸⁶. Pelo contrário, quando existe cirrose hepática associada a hepatite crónica num doente Ag HBe positivo, a prevalência é inferior, variando entre 43 e 54% ⁸⁷. É habitual observar-se, nos doentes em que o Ag HBe é positivo e o ADN do VHB negativo, seroconversão rápida do Ag HBe em anticorpo anti-HBe ^{75,88}.

Vários autores ^{43,79,89-91} estudaram os doentes portadores do anticorpo anti-HBe. A maior parte deles são portadores crónicos do Ag HBe e não têm ADN vírico circulante; nestes casos, a ADN polimerase está habitualmente ausente do soro ⁴² e não se encontra Ag HBe intracelular ^{42,92}. No entanto, certo número de doentes, tendo Ac anti-HBe e doença crónica do fígado, são também portadores do ADN do VHB ^{42,43,76,87,92}; nestes casos, a ADN polimerase não é igualmente detectada ⁹², e o Ag HBe intracelular está presente ou ausente ^{42,84}.

Habitualmente, nas regiões onde a infecção pelo VHB é adquirida na idade adulta, em particular no Ocidente, há ligação estreita entre a presença do Ag HBe e a do ADN do VHB ⁸⁷. Por outro lado, no Sul da Europa, Sudeste da Ásia e África, regiões onde a infecção é adquirida no período neonatal ou durante a infância, existe discordância com os resultados observados na Europa do Norte, muitas vezes com a presença de Ac anti-HBe associada à presença do ADN do VHB ^{52,78,87}.

Recentemente, vários autores ^{43,93-95} mostraram, em doentes originários da bacia do Mediterrâneo ou da Ásia, que é possível detectar simultaneamente o ADN do

QUADRO 1

Características biológicas, serológicas, histológicas e de infecciosidade da hepatite crónica pelo vírus da hepatite B

	Fase de alta replicação	Fase de baixa replicação	Fase não replicativa
Ag Hbs ^a	+	+	+
Ag HBe ^b	+	+/-	-
Ac anti-HBe ^c	-	-/+	+
ADN-VHB ^d	+	+/-	-
ALT sérica	↑	N ou ↑	N ou ↑
Inflamação hepática	Presente	Mínima	Ausente
Infecciosidade	+	Mínima	Nula

^a AgHbs = Antígeno de superfície do VHB; ^b AgHBE = Antígeno «e» do VHB; ^c anti-HBe = Anticorpo do antígeno «e» do VHB; ^d = ácido deoxyribonucleico do VHB

VHB e o Ac anti-HBe no soro. Esta situação particular está ligada ao aparecimento de uma modificação nucleotídica, determinando a existência de um *codon stop* TAG na extremidade carboxi terminal da região pré-C e impedindo, assim, a síntese do Ag HBe. Esta hepatite é geralmente mais grave e progride mais rapidamente para cirrose ⁴³.

O ADN do VHB não é detectado se o Ac anti-HBc for o único marcador sérico presente ou, então, só excepcionalmente é detectado ⁵⁹. Do mesmo modo, nos doentes portadores dos anticorpos anti-HBc e anti-HBs, o ADN do VHB não é detectado, excepto, talvez, nos doentes imunodeficientes ^{96,97}, nos quais poderia estar presente em cerca de 10% dos casos.

A reactivação da replicação vírica foi descrita nos doentes portadores do Ag HBs ^{55,66,98,100}. Esta reactivação pode ser espontânea ou ligada a diminuição da imunidade celular ^{66,100}. A reactivação está, por vezes, associada à elevação das transaminases ou a sintomas mimetizando hepatite vírica aguda ^{99,101}. Em numerosos casos, a reactivação é evidente porque se acompanha de reaparecimento do Ag HBe no soro e não constitui, por isso, verdadeiro problema diagnóstico ^{99,101}. Todavia, em alguns casos, o doente permanece seropositivo para o Ac anti-HBe e a reactivação é unicamente marcada pelo reaparecimento do ADN do VHB no soro.

Admite-se que a persistência do Ag HBe esteja associada à elevação persistente das transaminases e ao desenvolvimento de lesões histológicas graves, enquanto que a seroconversão do antígeno em anticorpo anti-HBe é seguida de diminuição da actividade biológica e histológica da doença ^{35,54}. Do mesmo modo, a depuração do ADN

do VHB circulante está associada à normalização das transaminases na maior parte dos doentes nos quais a hepatite crónica B não se complica com infecção D ⁵⁹.

Existem também, como vimos, os doentes seropositivos para o ADN do VHB e Ac anti-HBe: estes doentes têm importante elevação das transaminases e lesões histológicas graves ^{43,89}, contrariamente aos seronegativos para o ADN do VHB e que estão no estágio de portador crónico. Estes resultados sugerem que a presença do ADN do VHB tem valor prognóstico significativo, independente dos outros marcadores.

Bonino *et al.* ⁴² mostraram que os doentes seropositivos para os Ac anti-HBe e ADN do VHB evoluíam no sentido de hepatite crónica, ao contrário dos indivíduos seronegativos para o ADN do VHB, nos quais as transaminases eram normais. Pelo contrário, a replicação vírica activa, indicada pela presença do ADN do VHB, não está sempre associada a actividade histológica importante ⁵⁹.

Chu *et al.* ⁵² mostraram que tais doentes tinham, no início, tolerância imunitária *vis-a-vis* do VHB (que pode evoluir para a fase de depuração imunitária, caracterizada por diminuição da concentração do ADN do VHB), ligada a destruição imunitária dos hepatócitos, local de replicação activa do VHB.

No decurso da hepatite crónica B, a presença do ADN do VHB está, pois, directamente correlacionada com a do Ag HBe. Na evolução, a depuração do ADN do VHB precede ou coincide habitualmente com a do Ag HBe mas, em certos doentes, o ADN do VHB pode permanecer no soro durante período limitado, enquanto que o Ac anti-HBe já é detectável. Além do mais, o ADN do VHB sérico permanece detectável em número variável de doentes

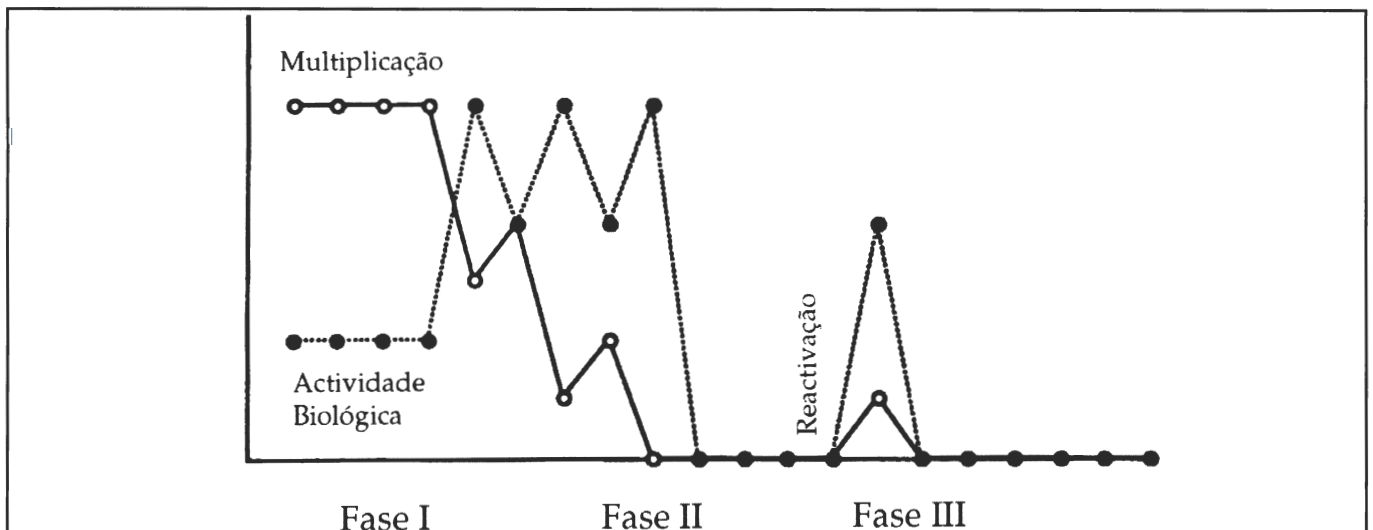


Fig. 1 - História natural de hepatite crónica B. Durante a fase I, a actividade da hepatite é pequena e a multiplicação vírica é elevada. Durante a fase II, a actividade da hepatite aumenta, e a multiplicação vírica diminui; durante esta fase, podem ocorrer episódios de exacerbação da hepatite crónica (hepatite de seroconversão). Durante a fase III, a actividade da hepatite crónica desaparece, desaparecendo igualmente a multiplicação vírica; durante esta fase, podem ocorrer episódios de reactivação da hepatite crónica.

seropositivos para o Ag HBs e Ac anti-HBe. Este perfil é sobretudo observado nas regiões geográficas onde a infecção pelo VHB é endêmica⁸⁹.

Nos doentes seropositivos para o Ag HBe, a pesquisa por PCR do ADN do VHB no soro é sempre positiva¹⁰². Além do mais, o ADN do VHB é frequentemente posto em evidência por PCR nos doentes seropositivos para os Ac anti-HBe (até 70% dos casos)¹⁰².

O controlo e eventual eliminação da transmissão da infecção pelo VHB são possíveis com o uso apropriado de vacinas¹⁰³. A prevenção da infecção crónica tem a vantagem potencial de reduzir a associação de doença hepática crónica e carcinoma hepatocelular. Em todo o mundo, estratégias para o uso eficaz da vacina da hepatite B têm sido desenvolvidas e estão a ser implementadas naquelas áreas onde a transmissão vertical é a fonte predominante da infecção. Infelizmente, a maior parte das infecções ocorre entre adultos de difícil acesso que adquirem a infecção antes de se aperceberem de que constituem um grupo de risco. A epidemiologia das infecções pelo VHB está constantemente em movimento entre os vários grupos de risco, o que vem reforçar a necessidade da vacinação. A aproximação global deste problema, que visaria a eliminação do VHB, deve dirigir-se contra as infecções adquiridas durante a juventude. A epidemiologia das infecções pelo VHB nos Estados Unidos⁶ indica que a transmissão da infecção pode ser eliminada.

Hepatite crónica B e hepatocarcinoma

O carcinoma hepatocelular (CHC) desenvolve-se a partir dos hepatócitos, sendo um dos cancros mais frequentes em todo o mundo^{113,114}. A incidência anual por 100.000 pessoas é de 1 a 5 nos países da Europa Ocidental³⁵. O cancro afecta principalmente o homem (80 a 90% dos casos) após os 40 a 50 anos^{18,35}. Na maior parte dos casos, o fígado extratumoral é cirrótico^{19,23} e o carcinoma hepatocelular desenvolve-se 20 a 40 anos após a infecção inicial nos doentes em que a multiplicação vírica foi quase sempre interrompida³⁵. Cerca de 10% dos indivíduos contaminados tornam-se portadores crónicos do VHB³⁵. A infecção crónica pelo VHB exerce um papel fundamental na etiologia do carcinoma hepatocelular^{25,65,113,115-118}.

A maior parte dos carcinomas hepatocelulares ocorre durante o curso da cirrose hepática^{25,65,113,116}. A hepatite crónica B é um factor de risco maior para o desenvolvimento de CHC associado a cirrose. Marcellin *et al.*²³ identificaram sequências de ADN do VHB no fígado da maior parte dos doentes com CHC e cirrose em França, incluindo doentes seronegativos para o Ag HBs.

Nas Filipinas, o carcinoma hepatocelular é um dos tumores malignos mais frequentes nas crianças entre os 5 e os 14 anos de idade¹⁶; com o vírus sujeito a um período de incubação curto e estando as crianças menos expostas

a carcinogénios ambientais durante a juventude, o CHC constitui, assim, um bom modelo para estudar o potencial carcinogénico do VHB.

Existe uma relação estreita entre infecção pelo VHB e CHC, documentada em estudos clínicos, epidemiológicos e de Virologia Molecular^{16-25,116,119-122}.

Estudos de Virologia Molecular demonstraram a integração do ADN do VHB nos tecidos de CHC^{65,117}, tendo sido estes estudos realizados sobretudo nos adultos. Parece haver um modelo de integração único nas crianças estudadas com CHC¹⁶, o que constitui um bom modelo de carcinogénese. Os fragmentos mais conservados no genoma do VHB integrado foram fragmentos contendo o gene do antigénio de superfície e o gene X.

O VHB é também a determinante mais importante de CHC em quase todos os países do mundo, sendo o risco de 10 a 100 vezes mais alto para os portadores do Ag HBs, comparado com os não portadores^{120,121}. Marcellin *et al.*²³ encontraram uma baixa incidência de marcadores séricos do VHB e ADN do VHB hepático em doentes com CHC desenvolvido em fígado histologicamente normal. Lai *et al.*²¹ concluíram que uma proporção substancial de doentes seronegativos para o Ag HBs e seropositivos para os Ac anti-HBs com doença hepática crónica e carcinoma hepatocelular tem sequências de ADN do VHB no fígado, podendo a integração desempenhar papel no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Lok *et al.*²² demonstraram igualmente que, apesar do longo intervalo entre o início da hepatite B e o desenvolvimento de CHC, a replicação do VHB persistiu na maior parte dos doentes com CHC, embora em níveis baixos. No entanto, existe uma diferença marcante da incidência do CHC no sexo masculino e no sexo feminino, a despeito de semelhanças na prevalência do Ag HBs em ambos os sexos. Isto leva a pensar no eventual papel do ambiente hormonal e também em factores ambientais, nomeadamente a ingestão de bebidas alcoólicas e o consumo de tabaco. O estudo de Kalayci *et al.*¹⁹ confirmou que a infecção pelo VHB está mais vezes associada ao CHC na presença de cirrose, apesar de haver também uma incidência elevada de infecção pelo VHB mesmo na ausência de cirrose.

Parecem existir dois mecanismos de carcinogénese⁶⁵: mecanismo directo e indirecto. A carcinogénese vírica começa com a integração do ADN do VHB no ADN genómico da célula do hospedeiro (mecanismo directo), com deleções e translocações de pequenas porções do ADN vírico. A consequência é a necrose e a inflamação (mecanismo indirecto) que vão agir como promotores da carcinogénese. A necrose e a inflamação determinam o aparecimento de mitoses, o que vai constituir um possível factor promotor do CHC.

Portadores crónicos do Ag HBs têm maior risco de desenvolver CHC do que os indivíduos que são imunes ao

VHB ou não infectados. A transformação neoplásica requer geralmente um factor promocional, tal como crescimento anárquico e expansão clonal das células hepáticas.

No entanto, qualquer que seja o mecanismo patogénico, ele envolve uma longa história de replicação activa do VHB, bem como necro-inflamação na presença de cirrose ¹²³.

Bibliografia

1. Hoofnagle JH, Alter HJ. Chronic viral hepatitis. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, eds. *Viral hepatitis and Liver disease*. New York: Grune & Stratton 1984: 97-113.
2. Maynard JE, Kane MA, Hadler SC. Global control of hepatitis B through vaccination: role of hepatitis B vaccine in the Expanded Programme on Immunization. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Suppl. 3): 574-578.
3. Tandon BN, Acharya SK. Viral diseases involving the liver. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 1987; 1:211-230.
4. Rizzetto M. Hepatitis Delta: the virus and the disease. *J Hepatol* 1990; 11: S145-S148.
5. Margolis HS, Alter MJ, Hadler SC. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. *Sem Liver Dis* 1991; 11: 84-92.
6. Lecour H. Hepatite vírica. Epidemiologia e diagnóstico. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 1983.
7. Blumberg B, Alter H, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA*, 1965; 191: 541-546.
8. Elfassi E. Broad specificity of the hepatitis B enhancer function. *Virology* 1987; 160: 259-262.
9. Miller RH. Comparative molecular biology of the hepatitis viruses. *Sem Liv Dis* 1991; 11: 113-120.
10. Robinson WS, Marion P, Feitelson M, et al. The hepadnavirus group: hepatitis B and related viruses. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE, eds. *Viral hepatitis 1981 (Int. Symp.)*. Philadelphia: Franklin Institute Press, 1982: 57-68.
11. Zarski JP, Thelu MA, Rachail M et al. Biologie moléculaire du virus de l'hépatite B. Première partie: structure, organisation génétique, réplication, transcription. *Gastroenterol Clin Biol* 1991; 15: 489-496.
12. Freeman JS, Gilbert AR, Dixon RJ, et al. Experimental duck hepatitis B infection: pathology and evolution of hepatic and extrahepatic infection. *Hepatology* 1988; 8: 507-513.
13. Korba B, Cole PJ, Gerin JL. Mitogen-induced replication of woodchuck hepatitis virus in cultured peripheral blood lymphocytes. *Science* 1988; 241: 1213-1216.
14. Imazeki F, Yaginuma K, Omata M, et al. Integrated structures of duck hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma. *J Virol* 1988; 62: 861-865.
15. Korba B, Wells F, Tennant BC, et al. Hepadnavirus infection of peripheral blood lymphocytes in vivo: woodchuck and chimpanzee models of viral hepatitis. *J Virol* 1986; 58: 1-8.
16. Chang MH, Chen PJ, Chen JY, et al. Hepatitis B virus integration in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in childhood. *Hepatology* 1991; 13: 316-320.
17. Hsu HC, Wu MZ, Chang MH, et al. Childhood hepatocellular carcinoma develops exclusively in hepatitis B surface antigen carriers in 3 decades in Taiwan - report of 51 cases strongly associated with rapid development of liver cirrhosis. *J Hepatol* 1987; 5: 260-267.
18. Kaklamani E, Trichopoulos D, Tzonou A, et al. Hepatitis B and C viruses and their interaction in the origin of hepatocellular carcinoma. *JAMA* 1991; 265: 1974-1976.
19. Kalayci C, Johnson PJ, Da Vieste, et al. Hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma in the non-cirrhotic liver. *J Hepatol* 1991; 12: 54-59.
20. Kew MC, Macerollo P. Effect of age on the etiologic role of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma in blacks. *Gastroenterology* 1988; 94: 439-442.
21. Lai MY, Chen PJ, Yang PM, et al. Identification and characterization of intrahepatic hepatitis B virus DNA in HBsAg-seronegative patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Hepatology* 1990; 12: 575-581.
22. Lok ASF, Ma OCK. Hepatitis B virus replication in chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1990; 12: 582-588.
23. Marcellin P, Thiers V, Degott C, et al. Hepatocellular carcinoma with normal adjacent liver. Hepatitis B virus DNA status. *J Hepatol* 1989; 8: 249-253.
24. Oka H, Kurioka N, Kim K, et al. Prospective study of early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12: 680-687.
25. Popper H. Viral versus chemical hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 1988; 6: 229-238.
26. Summers J, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 4597-4601.
27. Charnay P, Pourcel C, Louise A, et al. Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 4597-4601.
28. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, et al. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1989; 9: 322-327.
29. Courouce-Pauty AM, Pancon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg subtype in the world. *Vox Sang* 1983; 44: 197-211.
30. Thomas HC. The hepatitis B virus and the host response. *J Hepatol* 1990; 11 (Suppl 1): S83-S89.
31. Thung SN, Gerber MA. Poly albumin receptors: their role in the attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Semin Liver Dis* 1984; 4: 69-75.
32. Thung SN, Gerber MA. Albumin binding sites on human hepatocytes. *Liver* 1983; 3: 290-294.
33. Gerber MA, Thung SN. The pre-S2 region of hepatitis B virus: more questions than answers. *Hepatology* 1989; 9: 328-330.
34. Brahm J, Alexander GJM, Fagan EA, et al. Clearance of pre-S2 antigen: a marker of successful interferon therapy in hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 1988; 24: 453-460.
35. Benhamou JP, Erlinger S. In *Maladies du Foie et des Voies Biliaires*, 1986. Flammarion, Paris.
36. International Working Party. Terminology of chronic hepatitis, hepatic allograft rejection, and nodular lesions of the liver: summary of recommendations developed by an International Working Party, supported by the World Congress of Gastroenterology, Los Angeles, 1994. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S177-S181.

37. Scheuer PJ. The nomenclature of chronic hepatitis: time for a change. *J Hepatol* 1995; 22:112-114.
38. Bonino F, Hoyer B, Nelson J, et al. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBs Ag carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in the liver. *Hepatology* 1981;1: 386-391.
39. Hsu H-C, Su I-J, Lai M-Y, et al. Biologic and prognostic significance of hepatocyte hepatitis B core antigen expressions in the natural course of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1987; 5: 45-50.
40. Bodsworth NJ, Cooper DA, Donovan B. The influence of human immunodeficiency virus type 1 infection on the development of the hepatitis B virus carrier state. *J Infect Dis* 1991;163:1138-1140.
41. McQuillan GM, Townsend TR, Fields HA et al. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in the United States 1976 to 1980. *Am J Med* 1989; 87 (suppl 3A): 5S-10S.
42. Bonino F, Rosina F, Rizzetto M et al. Chronic hepatitis in HBs Ag carriers with serum HBV DNA and anti-HBe. *Gastroenterology* 1986; 90:1268-1273.
43. Hadziyannis S, Bramou T, Makris A et al. Interferon alfa-2b treatment of HBeAg negative/serum HBV DNA positive chronic active hepatitis type B. *J Hepatol* 1990;11 (Suppl. 1): S133-S136.
44. Liaw YF, Sheen IS, Chen TJ et al. Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: a prospective study. *Hepatology* 1991;13: 627-631.
45. Moestrup T, Hansson BG, Widell A et al. Long-term follow-up of chronic hepatitis B virus infection in intravenous drug abusers and homosexual men. *BMJ* 1986; 292: 854-857.
46. Chu CM, Shyu WC, Kuo RW et al. HLA class I antigen display on hepatocyte membrane in chronic hepatitis B virus infection: its role in the pathogenesis of chronic type B hepatitis. *Hepatology* 1987; 7: 1131-1136.
47. Ferns R, Tedder RS. Human and monoclonal antibodies to hepatitis B core antigen recognize a single immunodominant epitope. *J Med Virol* 1986;19:193-196.
48. Kojima T, Bloemen J, Desmet VJ. Immune electron microscopic demonstration of hepatitis B core antigen (HBcAg) in liver cell plasma membranes. *Liver* 1987; 7:191-200.
49. Moller B, Hopf U, Stemerowicz R et al. HBcAg expressed on the surface of circulating Dane particles in patients with hepatitis B virus infection without evidence of anti-HBc formation. *Hepatology* 1989;10: 179-185.
50. Ramalho F, Brunetto MR, Rocca G et al. Serum markers of hepatitis B virus replication, liver histology and intrahepatic expression of hepatitis B core antigen. *J Hepatol* 1988; 7:14-20.
51. Bortolotti F, Cadrobbi P, Crivellaro C et al. Long-term outcome of chronic type B hepatitis in patients who acquire hepatitis B virus infection in childhood. *Gastroenterology* 1990; 99: 805-810.
52. Chu CM, Karayiannis P, Fowler MJF et al. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 1985; 5: 431-434.
53. Davis GL, Hoofnagle JH. Reactivation of chronic type B hepatitis presenting as acute viral hepatitis. *Ann Int Med* 1985;102: 762-765.
54. Dragosics B, Ferenci P, Hitchma E et al. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: a clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology* 1987; 7: 302-306.
55. Krogsgaard K, Aldershvile J, Kryger P et al. Reactivation of viral replication in anti-HBe positive chronic HBsAg carriers. *Liver* 1990;10: 54-58.
56. Krogsgaard K, Aldershvile J et al. Hepatitis B virus DNA, HBe Ag and Delta infection during the course from acute to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1985; 5: 778-782.
57. Lindh G, Weiland O, Glaumann H. The application of a numerical scoring system for evaluating the histological outcome in patients with chronic hepatitis B followed in long term. *Hepatology* 1988; 8:98-103
58. Viola LA, Barrinson IG, Coleman JC et al. Natural history of liver disease in chronic hepatitis B surface antigen carriers. *Lancet* 1981;1:1156-1159.
59. Degos F, Marcellin P, Benhamou JP. Traitement de l'hépatite chronique active due à l'infection par le virus de l'hépatite B. *Gastroenterol Clin Biol* 1988;12: 845-854.
60. Van Ditzhuijsent JM, Yap SH. Clinical aspects of hepatitis B virus DNA detection. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(Suppl171): 57-68.
61. Areias J. Prevenção da infecção vírica B e B-D do enxerto pela terapêutica com intereferão recombinante alfa antes da transplantação hepática. Dissertação de Doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 1993.
62. Knodell RG, Ishak KG, Black WC et al. Formulation and application of a numerical score system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1: 431-435.
63. Bartolomé J, Moraleda G, Molina J et al. Hepatitis B virus DNA in liver and peripheral blood mononuclear cells during reduction in virus replication. *Gastroenterology* 1990; 99:1745-1750.
64. Fattovich G, Brollo L, Alberti A et al. Long-term follow-up of anti-HBe positive chronic active hepatitis B. *Hepatology* 1988; 8:1651-1654.
65. Velosa J, Marinho R, Gouveia A et al. Factores de risco para o carcinoma hepatocelular em doentes com cirrose hepática. *GE - Jornal Português de Gastroenterologia* 1994;1:1-10.
66. Areias J, Marcellin P, Benhamou JP. Reactivação de hepatite B num doente anti-HBs positivo no decurso de uma infecção pelo HIV. *Arquivos de Medicina* 1991; 5(2):133-134.
67. Bianchi L, Gudat F. Chronic Hepatitis. In: MacSween RMM, Anthony PP, Scheuer PJ, Portman B, Burt AD, eds. *Pathology of the Liver*, 3rd edit. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
68. Levy P, Marcellin P, Martino T, Peignoux M et al. Clinical course of spontaneous reactivation of hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1990;12: 570-574.
69. Tong MJ, Sampliner RE, Govindarajan S et al. Spontaneous reactivation of hepatitis B in chinese patients with HBsAg-positive chronic active hepatitis. *Hepatology* 1987; 7: 713-718.
70. Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA et al. Detection of HBeAg/anti-HBe immune complexes in the reactivation of hepatitis B virus replication among anti-HBe chronic carriers. *Liver* 1990;10: 79-84.
71. Hess G, Gerken G, Weber C et al. Reactivation of chronic type B hepatitis: the effect on expression of serum HBV-DNA and pre-S encoded proteins. *J Med Virol* 1988; 25:197-204.
72. Marcellin P. Cirrroses post-hépatitiques virales B, BD et C. *Rev Prat (Paris)* 1991; 41(13):1149-1155.
73. Bas C, Bartolomé J, LA Banda F et al. Assessment of hepatitis B virus DNA levels in chronic HBsAg carriers with or without

- hepatitis delta virus superinfection. *J Hepatol* 1988; 6: 208-213.
74. Monjardino J, Velosa J, Thomas HC et al. Serum HBV DNA detected by PCR in dot blot negative HBV chronic carriers with active liver disease. *J Hepatol* 1991;13: 44-48.
 75. Scotto J, Hadchouel M, Hery C et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a single spot hybridization technique: comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 1983; 3: 279-284.
 76. Akahane Y, Yamanaka T, Suzuki H et al. Chronic active hepatitis with hepatitis B virus DNA and antibody against *e* antigen in the serum. Disturbed synthesis and secretion of *e* antigen from hepatocytes due to a point mutation in the precore region. *Gastroenterology* 1990; 99:1113-1119.
 77. Kuhns MC. Monitoring hepatitis B virus replication. *J Hepatol* 1990;11 (Suppl. 1): S90-S94.
 78. Lieberman HM, La Brecque DR, Kew MC et al. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test: comparison to HBe Ag/anti-HBe status in HBs Ag carriers. *Hepatology* 1983; 3: 285-291.
 79. Matsuyama Y, Omata M, Yokosuka O et al. Discordance of hepatitis B *e* antigen, antibody and hepatitis B virus deoxyribonucleic acid in serum. *Gastroenterology* 1985; 89: 1104.
 80. Walter F, Blum HE, Offensberger WB et al. Spot-blot hybridization assay for the detection of hepatitis B virus DNA in serum: factors determining its sensibility and specificity. *Hepatology* 1987; 7: 557-562.
 81. Chu C-M, Liaw Y-F. Intrahepatic expression of HBcAg in chronic HBV hepatitis: lessons from molecular biology. *Hepatology* 1990;12:1443-1445.
 82. Govindarajan S, Fong TL, Valinluck B et al. Markers of viral replication in patients with chronic hepatitis B infection. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 233-237.
 83. Hsu H-C, Lai MY, Su JJ et al. Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology* 1988; 8: 749-754.
 84. Hsu HC, Lin YH, Chang MH et al. Pathology of chronic hepatitis B virus infection in children: with special reference to the intra-hepatic expression of hepatitis B virus antigens. *Hepatology* 1988; 8: 378-382.
 85. Weller I, Fowler M, Monjardino J et al. The detection of HBV DNA in serum by molecular hybridization: a more sensitive method for the detection of complete HBV particles. *J Med Virol* 1982; 9: 273-280.
 86. Paz MOA, Brennes F, Karayiannis P et al. Chronic hepatitis B virus infection. Viral replication and patterns of inflammatory activity: serological, clinical and histological correlation. *J Hepatol* 1986;3: 371-377.
 87. Karayiannis P, Fowler MJE, Lok SF et al. Detection of serum HBV-DNA by molecular hybridization. Correlation with HB *e* Ag/anti-HBe status, racial origin, liver histology and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1985;1: 99-106.
 88. Krogsgaard K, Wantzin P, Aldershville J, Kryger P et al. Hepatitis B DNA in hepatitis B surface antigen positive blood donors. Relation to hepatitis B *e* system and outcome in recipients. *J Infect Dis* 1986;153: 298-303.
 89. Bonino F, Rizzato M, Will H. Hepatitis B virus unable to secrete *e* antigen. *Gastroenterology* 1991;100:1138-1141.
 90. Fattovich G, Farci P, Brollo L et al. Anti-HBe and HBV DNA positive chronic hepatitis B. Response to interferon therapy. *J Hepatol* 1989; 9: 529 (Abstr.).
 91. Takeda K, Akahane Y, Suzuki H et al. Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HBeAg to anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. *Hepatology* 1990;12:1284-1289.
 92. Negro F, Chiaberge E, Oliviero S. Hepatitis B virus DNA (HBV DNA) in anti-HBe positive sera. *Liver* 1984; 4:177-183.
 93. Brunetto MR, Stemler M, Bonino F et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990;10: 258-261.
 94. Carman WF, Hadziyannis S, McGarvey MJ et al. Mutation preventing formation of hepatitis B *e* antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 2: 588-591.
 95. Tanaka Y, Esumi M, Shikata T. Persistence of hepatitis B virus DNA after serological clearance of hepatitis B virus. *Liver* 1990;10: 6-10.
 96. Brechot C, Degos F, Lugassy C et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985; 3: 270-276.
 97. Brechot C, Hadchouel M, Scotto J et al. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: a direct appraisal of the chronic carrier state. *Lancet* 1981;1: 765-768.
 98. Hoofnagle JH. Alpha interferon therapy of chronic hepatitis B. Current status and recommendations. *J Hepatol* 1990;11 (Suppl. 1): S100-S107.
 99. Hoofnagle JH, Dusheiko GM, Schafer DF et al. Reactivation of chronic hepatitis B virus infection by cancer chemotherapy. *Ann Int Med* 1982; 96: 447-449.
 100. Naginton J, Cossart YE, Cohen BJ. Reactivation of hepatitis B after transplantation operations. *Lancet* 1977;1: 558-560.
 101. Davis GL, Hoofnagle JH, Waggoner JG. Spontaneous reactivation of chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1984; 86: 230-235.
 102. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology* 1990; 99: 799-804.
 103. Hadler SC, Francis DP, Maynard JE et al. Long-term immunogenicity and efficacy of hepatitis B vaccine in homosexual men. *N Engl J Med* 1986; 215: 209-214.
 104. Ferrari C, Penna A, Degliantonni A et al. Cellular immune response to hepatitis B virus antigens. An overview. *J Hepatol* 1988; 7: 21-33.
 105. Vetter D, Doffoel M et al. Aspects immunologiques de la physiopathologie des hépatites virales B. *Gastroenterol Clin Biol* 1989; 916-921 e 928-933.
 106. O'Brien CJ, Eddleston ALWF. Immunology of autoimmune and viral chronic active hepatitis. *Baillière's Clinical Gastroenterol* 1987;1: 647-674.
 107. Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigen. *Lancet* 1975; i:1405-1409.
 108. Eddleston WLF, Mondelli M, Mieli-Vergani G et al. Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1982; 2:122S-127S.
 109. Pignatelli M, Waters J, Lever AML et al. Cytotoxic T-cell responses to the nucleocapsid proteins of HBV in chronic hepatitis. *J Hepatol* 1987; 4:15-21.
 110. Wilson B, Wands J. Recent advances in the biology and immunology of hepatitis B. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 1987;1: 623-645.

111. Zarski JP, Seigneurin JM. La variabilité génétique du virus de l'hépatite B: relation éventuelle avec la pathogénicité. *Gastroenterol Clin Biol* 1991;15: 277-279.
112. Thomas HC, Slipton U, Montano L. The HLA system: its relevance to the pathogenesis of liver disease. In: *Progress in liver disease*, Vol. 16. New York: Grune & Stratton 1982: 517-527.
113. Attali P, Prod'homme S et al. Carcinome hépatocellulaire en France. Aspects cliniques, biologiques et virologiques chez 197 malades. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 9: 396-402.
114. Parkin DM, Stjernsward T, Muir S. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull World Health Organ* 1984; 62:162-182.
115. Davison FJ, Fagan EA, Portmann B et al. HBV-DNA sequences in tumor tissue in a patient with the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1990;12: 676-679.
116. Giacchino R, Pontisso P, Navone Cj et al. Hepatitis B virus (HBV)-DNA-positive hepatocellular carcinoma following hepatitis B virus infection in a child. *J Med Virol* 1987; 23:151-156
117. Shih C, Burke K, Chou MJ et al. Tight clustering of human hepatitis B virus integration sites in hepatomas near a triple-stranded region. *J Virol* 1987; 61: 3491-3498.
118. Zuckerman AJ, Harrison TJ. Hepatitis B virus chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J* 1987; 63:13-20.
119. Beasley RP, Hwang LY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Sem Liver Dis* 1984; 4:113-121.
120. Beasley RP, Kiu CC, Hwang LY et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2:1129-1133.
121. Velosa J. Infecção crónica pelo vírus da hepatite B. História natural e influência da terapêutica com interferão. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 1992.
122. Chen JY, Harrison TJ, Lee CS et al. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: analysis by hybridization with subgenomic DNA fragments. *Hepatology* 1988; 8: 518-523.
123. Bonino F, Brunetto MR, Negro F et al. Hepatitis Delta virus, a model of liver cell pathology. *J Hepatol* 1991; 13: 260-266.