



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE  
B EM POPULAÇÃO INDÍGENA DOS RIOS CURUÇÁ E  
ITAQUAÍ NO VALE DO JAVARI, ESTADO DO AMAZONAS**

**LUCINETE OKAMURA KIMURA**

**MANAUS, 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUCINETE OKAMURA KIMURA**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE  
B EM POPULAÇÃO INDÍGENA DOS RIOS CURUÇÁ E  
ITAQUAÍ NO VALE DO JAVARI, ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia”, na linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e/ou Laboratorial”.

**Orientador:** Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa

**MANAUS, 2011**

Kimura, Lucinete Okamura

*K49e* Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B em população indígena dos Rios Curuçá e Itaquai no Vale do Javari, estado do Amazonas / Lucinete Okamura Kimura. - Manaus: UFAM, 2011.  
72 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade Federal do Amazonas, 2011

Orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa

1. Hepatite B – Amazonas - Epidemiologia 2. Índios – Doenças – Diagnóstico 3. Índios – Amazonas - Saúde I. Costa, Cristóvão Alves da (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(1997): 616.36-002(811.3)(043.3)

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

**LUCINETE OKAMURA KIMURA**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE  
B EM POPULAÇÃO INDÍGENA DOS RIOS CURUÇÁ E  
ITAQUAÍ NO VALE DO JAVARI, ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Promoção da Saúde na Amazônia”, na linha de pesquisa “Diagnóstico Epidemiológico, Clínico e/ou Laboratorial”.

Aprovada em 03 de fevereiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Émerson Silva Lima  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cíntia Mara Costa de Oliveira  
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

# ***Dedicatória***

À minha família, especialmente ao meu pai *in memorium*, mesmo na sua ausência e no silêncio de sua voz, as lembranças das experiências compartilhadas me dão segurança, convicção e serenidade para seguir adiante a cada dia.

# ***Agradecimentos***

A Deus, sua presença em minha vida me guia e ilumina meu coração com Sua bondade infinita.

À minha família que sempre esteve presente nos momentos mais difíceis desta jornada.

Ao Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa pela orientação, confiança e incentivo na minha formação científica.

Aos Profs. Dr. Emerson Silva Lima e Dra. Julia Ignez Salem por abrirem as portas do mundo da pesquisa a mim.

Às Profs. Dra. Cíntia Mara Costa de Oliveira e Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos pelas sugestões, críticas e auxílio na melhoria deste trabalho.

Ao Dr. Jansen Fernandes de Medeiros pelo auxílio na elucidação da estatística aplicada ao referido trabalho.

Às amigas Amélia Sicsú, Cris Lopes, Iris Cristina Pinheiro da Conceição, Grecilane Palheta Façanha, Ridenílcia Regina Nelson da Silva, Rovená Santana Edileus Vieira e Vitória Sposina, pelo companheirismo, colaboração e estímulo para vencer as adversidades encontradas.

Aos funcionários do INPA Raimundo Bezerra do Nascimento e Rosalvo Balbino da Silva pela disponibilidade, simpatia e presteza.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo espaço que me foi dado para realizar os procedimentos laboratoriais moleculares.

Aos órgãos financiadores: Ministério da Saúde (MS), Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), pelo apoio financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao diretor de Saúde da Polícia Militar do Amazonas Cel. PM Aristóteles Comte de Alencar Filho e militares da Policlínica da PM pela compreensão, incentivo e apoio.

À direção UBS Lúcio Flávio/Morro da Liberdade e colegas pela torcida na conquista deste trabalho.

Aos colegas de Mestrado turma 2009 pela amizade construída.

## RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é um dos mais sérios problemas de Saúde Pública do mundo. Estima-se que dois bilhões de pessoas estejam infectadas, com mais de 350 milhões apresentando marcadores sorológicos de infecção ativa, apesar da prevenção pela vacinação. No Brasil, a endemicidade do VHB é heterogênea, sendo a doença mais prevalente na região norte do país. Entre a população indígena, estudos soro epidemiológicos relatam altas taxas de prevalência de hepatite B na Amazônia brasileira. Pesquisas têm demonstrado que, em alguns casos, os marcadores sorológicos não são suficientes para detectar uma atividade viral e, nessas situações, os testes moleculares se mostram mais sensíveis e específicos. O presente estudo se propôs determinar a prevalência do DNA (ácido desoxirribonucléico) do vírus da hepatite B em povos de etnias indígenas habitantes dos rios Curuçá e Itaquai no Vale do Javari, Amazonas, Brasil, pertencentes às etnias Kanamary, Matis, Mayoruna, Marubo, Kulina e Korubo. Tratou-se de um estudo descritivo, transversal, do tipo detecção de caso. Foram analisadas 180 amostras pertencentes às comunidades indígenas de São Sebastião, Volta Grande, Pedro Lopes, Massapê, Remancinho e Bananeira. As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) e *semi-nested* para vírus da hepatite B, gene S. A prevalência encontrada para o DNA-VHB gene S foi de 51,1% (92/180). Entre as amostras positivas para DNA-VHB PCR, 18/49 (36,7%) pertenciam à etnia Marubo, 68/125 (54,4%) à Kanamary e 6/6 (100%) a outras etnias. Quanto aos dados sócio-demográficos dos casos positivos para DNA-VHB PCR, pôde-se verificar que não houve diferença significativa ao nível de 5% em relação ao gênero ( $p=0,889$ ). No entanto, quando se analisou a idade foi observado que os indígenas com PCR positiva para DNA-VHB apresentavam menores mediana de idade ( $p<0,001$ ) de 23 anos, sugerindo ser a atividade sexual uma das principais formas de transmissão do VHB. Não foi constatada nenhuma diferença estatística em relação às fontes de contágio e à presença do DNA-VHB, como também aos aspectos clínicos, com exceção da febre ( $p<0,001$ ). A alta prevalência do DNA-VHB de 75% (15/20) em gestantes ( $p=0,009$ ) demonstra associação com a transmissão vertical. Os resultados comprovam a alta prevalência do DNA-VHB no Vale do Javari, tornando-se importante traçar estratégias de controle e prevenção mais eficazes no combate à disseminação do VHB.

Palavras Chave: vírus da hepatite B, diagnóstico do DNA-VHB PCR, prevalência do DNA-VHB, população indígena.

## ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the most serious public health problems in the world. At least two billion people are infected, with over 350 million showing serological markers of active infection, despite prevention by vaccination. In Brazil, the HBV endemicity is heterogeneous, with the most prevalent disease in the north region. Among the indigenous population, epidemiological serum studies have reported high rates of hepatitis B prevalence in the Brazilian component of the Amazon rainforest. Studies have shown that in some cases the serological markers are not enough to detect viral activity, and in these situations, molecular tests are more sensitive and specific. The proposal of this study was to determine the prevalence of DNA (deoxyribonucleic acid) of hepatitis B virus in indigenous ethnic groups (Kanamary, Matis, Mayoruna, Marubo, Kulina and Korubo) in habitants of the rivers Curuçá and Itaquai at the Javari Valley, Amazon, Brazil. This was a descriptive, cross-sectional study, such as used in case detection. One hundred and eighty (180) samples were analyzed from the indigenous communities of São Sebastião, Volta Grande, Pedro Lopes, Massapê, Remancinho and Bananeira. The samples were subjected to polymerase chain reaction (PCR) and semi-nested PCR to Hepatitis B virus, S gene. The prevalence for HBV-DNA of S gene was 51.1% (92/180). Among the PCR positive samples for HBV-DNA, 18/49 (36.7%) were from Marubo, 68/125 (54.4%) from Kanamary and 6/6 (100%) from other ethnicities. With regards to socio-demographic data, no significant difference was found ( $p=0.889$ ) in relation to gender (statistical analysis at 5%). However, when analyzing age it was observed that the natives had lower median age ( $p<0.001$ ) of 23 years old, suggesting that sexual activity was the main form of HBV transmission. There was no statistical difference found in relation to sources of infection and the presence of HBV DNA, as well as clinical aspects, with the exception of fever ( $p<0.001$ ). The high prevalence of HBV-DNA of 75% (15/20) in pregnant women ( $p=0,009$ ) demonstrates association with vertical transmission. The results confirm the high prevalence of HBV DNA in the Javari Valley, making it important to devise strategies for control and a more effective prevention in combating the spread of HBV.

Keywords: Hepatitis B virus, diagnosis of HBV-DNA PCR, prevalence of HBV-DNA, the indigenous population.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Partícula do vírus da hepatite B.....	16
<b>Figura 2</b>	Constituição do genoma do VHB com suas estruturas gênicas.....	18
<b>Figura 3</b>	Replicação do vírus da hepatite B.....	20
<b>Figura 4</b>	Distribuição geográfica da prevalência da infecção crônica pelo VHB.....	21
<b>Figura 5</b>	Mapa do Vale do Javari.....	30
<b>Figura 6</b>	Fluxo dos procedimentos do estudo.....	34
<b>Figura 7</b>	Distribuição segundo o resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	42
<b>Figura 8</b>	Resultado representativo da eletroforese em gel de agarose 1,5% das amostras amplificadas por semi-nested PCR para DNA-VHB gene S.....	48

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Marcadores sorológicos do VHB.....	26
<b>Quadro 2</b>	Sequência dos primers para amplificação do gene S.....	37
<b>Tabela 1</b>	Distribuição segundo a frequência das etnias e dos dados sociodemográficos da população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	41
<b>Tabela 2</b>	Distribuição segundo a frequência da PCR positiva para DNA-VHB em relação às etnias da população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	43
<b>Tabela 3</b>	Distribuição segundo os dados sociodemográficos em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	43
<b>Tabela 4</b>	Distribuição segundo a frequência das fontes de contágio em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	44
<b>Tabela 5</b>	Distribuição segundo a frequência dos aspectos clínicos em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	46
<b>Tabela 6</b>	Distribuição segundo a frequência da PCR positiva para DNA-VHB em relação aos afluentes e as comunidades onde residem as população indígena do Vale do Javari, Amazonas.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Anti-HBc</b>	Anticorpo contra o antígeno central do Vírus da Hepatite B
<b>Anti-HBe</b>	Anticorpo contra o antígeno e do Vírus da Hepatite B
<b>Anti-HBs</b>	Anticorpo contra o antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
<b>AMAS</b>	Associação Marubo de São Sebastião
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CONEP</b>	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeo Trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FUNAI</b>	Fundação Nacional do Índio
<b>FEPI</b>	Fundação Estadual dos Povos Indígenas
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>HBcAg</b>	Antígeno central do Vírus da Hepatite B
<b>HBeAg</b>	Antígeno e do Vírus da Hepatite B
<b>HBsAg</b>	Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>M</b>	Mol
<b>mg</b>	Miligrama
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nt</b>	Nucleotídeos
<b>NaCL</b>	Cloreto de Sódio
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>%</b>	Porcentagem
<b>pMol</b>	Picomol
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>Rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SEIND</b>	Secretaria de Estado para os Povos Indígenas
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UV</b>	Raio Ultra Violeta
<b>UNIVAJA</b>	União dos Povos Indígenas do Vale do Javari
<b>VHB</b>	Vírus da Hepatite B
<b>DNA-VHB</b>	Ácido desoxirribonucléico do Vírus da Hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da Hepatite C
<b>VHD</b>	Vírus da Hepatite Delta
<b>VHE</b>	Vírus da Hepatite E

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Hepatites virais.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Hepatite B.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 O vírus da hepatite B.....	16
2.2.2 Replicação do VHB.....	19
<b>2.3 Epidemiologia do VHB.....</b>	<b>20</b>
2.3.1 Hepatite B na Amazônia.....	22
<b>2.4 Marcadores sorológicos do VHB .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Biologia molecular do VHB.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Modelo de estudo .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Universo de estudo .....</b>	<b>29</b>
4.2.1 População de estudo.....	29
4.2.1.1 Caracterização da área de estudo.....	30
4.2.2 Participantes e critérios de elegibilidade.....	31
4.2.3 Amostras.....	33
<b>4.3 Procedimentos.....</b>	<b>34</b>
4.3.1 Fluxo de procedimento.....	34
4.3.2 Instrumentos de coleta de informações.....	35
<b>4.4 Procedimentos laboratoriais.....</b>	<b>35</b>
4.4.1 Extração do DNA do VHB.....	36
4.4.2 Procedimento molecular.....	37
4.4.2.1 Amplificação do gene S por PCR.....	37
4.4.2.2 Semi-Nested PCR.....	38
4.4.3 Eletroforese dos produtos de PCR amplificados (gene S).....	39
<b>4.5 Análise dos resultados.....</b>	<b>39</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é um problema de saúde global. Mesmo sendo uma doença passível de prevenção pela vacinação, estima-se que dois bilhões de pessoas estejam infectadas no mundo, com mais de 350 milhões apresentando marcadores sorológicos de infecção ativa. O carcinoma hepatocelular e a cirrose em seus estágios finais de evolução são os desfechos mais letais do VHB (RONCATO et al., 2008).

Na América do Sul, sobretudo Chile, Argentina, Uruguai e Sul do Brasil, a prevalência para o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) é de 0,5 a 1,1%. No Nordeste e Centro-Oeste brasileiro é de 1,5 a 3% e na região amazônica é de 5 a 15% (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

A região amazônica é caracterizada como uma das regiões do mundo de maior ocorrência da hepatite B e suas consequências. No Estado do Amazonas, as calhas dos rios Juruá, Purus e médio Solimões são consideradas as regiões de maior endemicidade, com taxas significativamente elevadas (ALECRIM et al., 1986; BENSABATH et al., 1987; FONSECA et al., 1994). Estudos soro-epidemiológicos na população indígena relatam altas taxas de prevalência (9,7%) em portadores crônicos (BRAGA et al., 2001).

Dados fornecidos pela Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS/AM), relativos aos anos de 2007, 2008 e 2009 mostram que no Estado do Amazonas foram notificados 154, 262 e 397 casos de hepatite B, respectivamente. As cidades de Manaus, Eirunepé, Lábrea, Manacapuru e Coari foram que apresentaram maiores notificações (FVS, BRASIL, 1010).

Estudos têm demonstrado que, em alguns casos, os marcadores sorológicos não são suficientes para detectar uma atividade viral. É o caso da infecção oculta pelo vírus da hepatite B (VHB) que é caracterizada por apresentar o antígeno de superfície do vírus da

hepatite B (HBsAg) negativo, com ou sem a presença do anti-HBc total (anticorpo contra o antígeno do “core” do VHB) ou associado ao anti-HBs (anticorpo contra o HBsAg), porém com positividade persistente para o ácido desoxirribonucléico (DNA) do VHB (ALLAIN, 2004; RAIMONDO et al., 2007). Esse caso ocorre devido à presença de mutações nas regiões pré-S e S do vírus, resultando na produção de vírus mutantes. O vírus não é reconhecido por anticorpos neutralizantes, podendo inclusive escapar de uma resposta imune induzida por vacina (SILVA; NIEL, 2006).

A detecção do DNA do vírus é considerada a prova mais confiável da existência de replicação e infecciosidade viral. O DNA pode ser detectado antes do surgimento de evidências bioquímicas, persistindo tanto no curso da doença aguda como da crônica (SILVA; NIEL, 2006).

No Vale do Javari, a presença do vírus da hepatite B constitui um problema de Saúde Pública, uma vez que as populações indígenas vivem isoladas e distantes geograficamente dos centros urbanos de diagnóstico. Nos últimos anos, a transmissão do VHB persiste nessas populações, tornando menor a expectativa de vida de seus portadores, resultado do difícil prognóstico da evolução da doença (CIMI/BRASIL, 2010).

Estudos no Vale do Javari são ainda escassos, segundo a FVS/AM nos anos de 2005 a 2009 foram registrados em Atalaia do Norte somente 12 casos de hepatite B (FVS, BRASIL, 2010), daí a necessidade desta pesquisa em determinar a prevalência do DNA do VHB em comunidades indígenas do Vale do Javari.

O presente trabalho forneceu, portanto, subsídios para ações governamentais na saúde indígena e na promoção do seu etnodesenvolvimento.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Hepatites virais

As hepatites são infecções causadas por vírus que possuem tropismo primário para o fígado, no qual os fenômenos inflamatórios e necróticos são responsáveis pelos sintomas mais frequentes, proeminentes e característicos. Apesar de apresentarem sintomas similares, as hepatites causam várias doenças, cada qual com aspectos epidemiológicos e evolutivos diferentes e agentes etiológicos específicos (BENSABATH et al., 1997).

A distribuição das hepatites virais é universal, variando de região para região, de acordo com os diferentes agentes etiológicos. As complicações ocorridas da doença nas formas agudas, crônicas, bem como o número de indivíduos atingidos resultam na sua importância para a saúde pública, o que torna relevante os estudos realizados (FERREIRA; SILVEIRA, 2004; BRASIL, 2006).

Os agentes etiológicos que causam hepatites virais são: vírus da hepatite A (VHA), vírus da hepatite B (VHB), vírus da hepatite C (VHC), vírus da hepatite D (VHD) e vírus da hepatite E (VHE). O VHA, o VHB e o VHC são prevalentes em toda a Amazônia enquanto que o VHD está restrito a determinadas áreas da Amazônia Ocidental (BENSABATH et al., 1997). Esses vírus têm em comum a predileção para infectar os hepatócitos, entretanto divergem quanto às formas de transmissão e consequências clínicas advindas da infecção, sendo o homem o único reservatório com importância epidemiológica (BRASIL, 2006).

Existem outros vírus que também podem causar hepatite, embora seu impacto clínico e epidemiológico seja menor, são eles: os vírus de Epstein-Barr (mononucleose infecciosa), o

do herpes simples, o citomegalovírus, o da febre amarela, o da rubéola, o de Lassa, o Ebola e o Marburg (BENSABATH et al., 1997).

Quanto às formas de transmissão as hepatites virais são classificadas em dois grupos: o primeiro, de transmissão fecal-oral (VHA e VHE), com mecanismo ligado a condições de saneamento básico, higiene pessoal, qualidade de água e dos alimentos. O segundo grupo possui diversos mecanismos de transmissão (VHB, VHC e VHD), como o parenteral, sexual, compartilhamento de objetos contaminados, acidentes perfuro-cortantes, procedimentos cirúrgicos, odontológicos e hemodiálises. A transmissão por via sexual é mais comum para o VHB que para o VHC. Os vírus das hepatites B, C, e D possuem também via de transmissão vertical. (BRASIL, 2006).

Após entrar em contato com o vírus da hepatite, o indivíduo pode desenvolver um quadro de hepatite aguda, podendo apresentar formas clínicas oligo/assintomática com manifestações clínicas ausentes ou leves e atípicas, simulando um quadro gripal. A forma sintomática apresenta febre, icterícia e colúria. Apenas os vírus B, C e D têm potencial para desenvolver formas crônicas. Os indivíduos com infecção crônica apresentam maior propensão para o desenvolvimento de cirrose e hepatocarcinoma (FOCACCIA, 2005; BRASIL, 2006).

Os últimos 50 anos foram de notáveis conquistas ao que se refere à prevenção e ao controle das hepatites virais. Os mais significativos progressos foram a identificação dos agentes virais, o desenvolvimento de testes laboratoriais, o rastreamento dos indivíduos infectados e o surgimento de vacinas protetoras (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

## 2.2. Hepatite B

### 2.2.1 O vírus da hepatite B

O VHB é um vírus DNA de fita dupla classificado na família Hepadnaviridae, gênero *Orthohepadnavirus*, espécie *Hepatitis B virus* (EL KHOURI; SANTOS, 2004; LIANG, 2009). No soro de pacientes infectados podem ser visualizados três tipos de partículas: uma partícula infecciosa esférica, chamada de partícula de Dane, com 42 nm de diâmetro (vírion); uma segunda partícula esférica, com 22 nm de diâmetro; e outra com forma tubular e de comprimento variável (Figura 1). Essas duas últimas estruturas não são infecciosas, sendo compostas apenas por proteínas de superfície (LIANG, 2009).

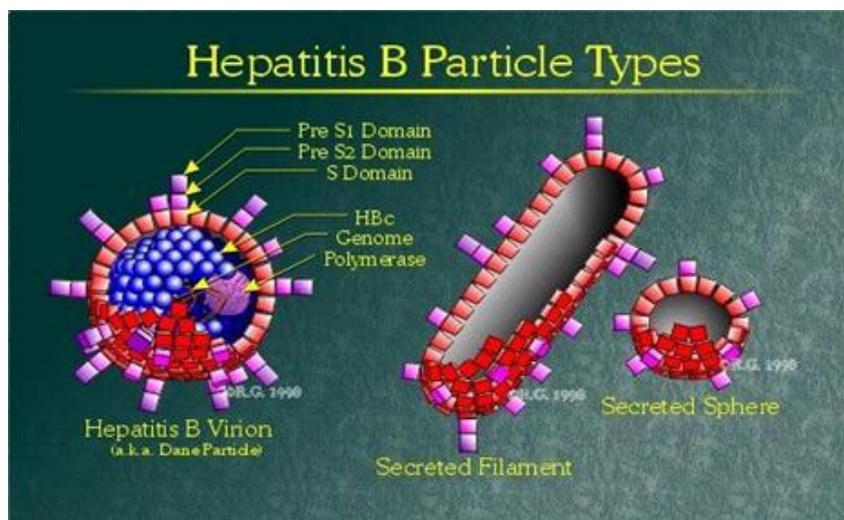


Figura 1. Partícula do vírus da hepatite B

Fonte: [http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2001/Imuno01\\_Hepatite%20B\\_files/image007.jpg](http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2001/Imuno01_Hepatite%20B_files/image007.jpg). Acesso: 11 fev 2010.

As partículas de Dane são constituídas por um envoltório lipídico externo que contém o antígeno de superfície do VHB (HBsAg) e uma região nuclear densa (core). Esse núcleo central possui uma proteína interna (Antígeno nuclear do vírus da hepatite B – HBcAg) que

induz a formação de anticorpos específicos (Anticorpo contra o antígeno do Core do vírus da hepatite B – Anti-HBc) pelos indivíduos infectados. O antígeno do core (HBcAg) não é secretado, por isso é muito difícil sua detecção no sangue circulante, diferente do que ocorre nos hepatócitos de indivíduos com doença aguda ou crônica, no qual sua presença é abundante, sendo detectado por meio da técnica da imunoperoxidase (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

Na zona central da partícula de Dane, encontra-se o ácido nucléico viral (Ácido desoxirribonucleico – DNA do VHB) e enzimas como a DNA-polimerase e a fosfoquinase. Na parte central do vírus, está presente, ainda, o antígeno “e” do vírus da hepatite B (HBeAg), que é secretado, podendo ser facilmente detectado no sangue. Este antígeno se associa à replicação e à infectividade viral e induz a formação de um anticorpo específico chamado anticorpo contra o antígeno “e” do vírus da hepatite B (Anti-HBe) que normalmente se relaciona com a parada da replicação viral (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

Conforme a figura 2, o genoma VHB é circular, com uma cadeia parcialmente duplicada (uma cadeia longa e outra um pouco mais curta) e com um genoma composto de aproximadamente 3.200 nucleotídeos. Nesse genoma identificam-se quatro estruturas gênicas: S, C, P, X que possuem diferentes funções (SILVA; PINHO, 2001).

- Gene S: inclui a p<sub>25</sub> (proteína de cadeia curta ou S), a p<sub>33</sub> (proteína de cadeia média ou pré-S<sub>2</sub>) e a p<sub>139</sub> (proteína de cadeia longa ou pré-S<sub>1</sub>). A p<sub>25</sub> é predominante e representa o principal antígeno de superfície (HBsAg) que vai induzir a formação do anticorpo contra o antígeno de superfície do VHB (Anti-HBs). O HBsAg possui diversas proteínas (determinantes antigênicos), denominadas “a”, “d”, “y”, “w”, e “r”, que, mediante suas combinações, permitem a caracterização de vários subtipos. O antígeno “a” é comum a todos os subtipos do HBsAg. As combinações mais comuns são adw, adr e ayw. Utilizando

métodos de biologia molecular essas variantes do VHB são classificadas em oito genótipos (A, B, C, D, E, F, G, H) (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

- Gene C: é precedido da região pré-C (pré-core) e codificam o antígeno do core (HBcAg) e o antígeno “e” (HBeAg) do VHB (SILVA; PINHO, 2001).

- Gene P: codifica a DNA-polimerase, uma enzima específica fundamental para a duplicação do DNA, que também possui atividade de transcrição reversa (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

- Gene X: codifica o antígeno HBx; é necessário para a replicação e transativação transcricional dos genes virais e tem um possível papel no desenvolvimento do hepatocarcinoma celular (EL KHOURI; SANTOS, 2004).

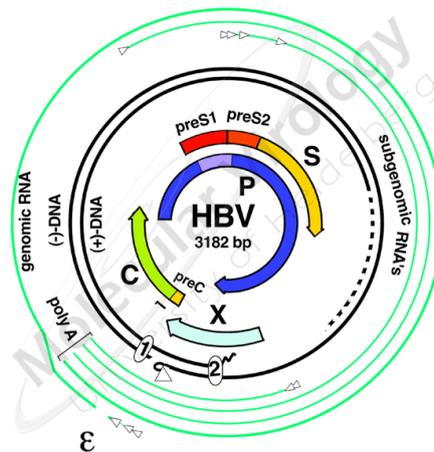


Figura 2. Constituição do genoma do VHB com suas estruturas gênicas

Fonte: <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/1-Morphology-Genome-Organization.104932.0.html>. Acesso: 13 fev 2010.

Convém registrar, que o vírus da hepatite B resiste até uma semana em superfície seca, sendo estável em temperaturas próximas de 30°C por pelo menos 6 meses e -20°C por 15 anos (PERRENOUD, 1995; HOLLINGER, 2001). O VHB é bastante resistente ao calor e a outros agentes físicos; o tratamento de plasma infectado pelo calor, a 60°C, durante cinco horas é insuficiente para inativar o vírus. A autoclavagem (121°C) durante 30 a 60 minutos e a ação do

hipoclorito de sódio destroem o poder infectante do vírus (EL KHOURI; SANTOS, 2004; RÁCZ; CANDEIAS, 2008a).

O VHB está presente em altas concentrações no sangue, e em moderada quantidades no sêmen, no fluido vaginal e na saliva (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

### 2.2.2 Replicação do VHB

O mecanismo da replicação não está completamente definido, evidências indicam que se inicia pela ligação do VHB por meio de um peptídeo codificado pela região pré-S<sub>1</sub>, a um receptor específico localizado na membrana do hepatócito, esta ligação permite que o vírus penetre no hepatócito e perca seu envoltório (CHISARI, 2000; MARINHO; AGOSTINHO, 2003).

A figura 3 ilustra o mecanismo de replicação viral, em que o DNA-VHB é liberado para dentro do núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva do DNA (incompleta). O genoma do VHB é convertido numa cadeia circular fechada de DNA com ligações covalentes superespiraladas (ccc-DNA) pela DNA polimerase vírica. O ccc-DNA é o modelo que origina o RNA mensageiro (RNAm) para a síntese das proteínas víricas e o RNA pré-genoma de 3,5 Kb que servirá de molde para a transcrição reversa (LIANG, 2009).

Enquanto isso, no citoplasma da célula hospedeira, são sintetizadas as proteínas do *core*, as quais vão encapsular o RNA pré-genoma e a DNA-polimerase. No citoplasma, particularmente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, ocorrerá a transcrição reversa do pré-genoma, sendo então sintetizada a cadeia longa do DNA viral. O pré-genoma, que produziu a cadeia longa, por meio da DNA-polimerase, produzirá a cadeia curta do DNA viral, e este capsídeo será envolvido pelo envelope externo do HBsAg e esta estrutura viral completa deixará a célula (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

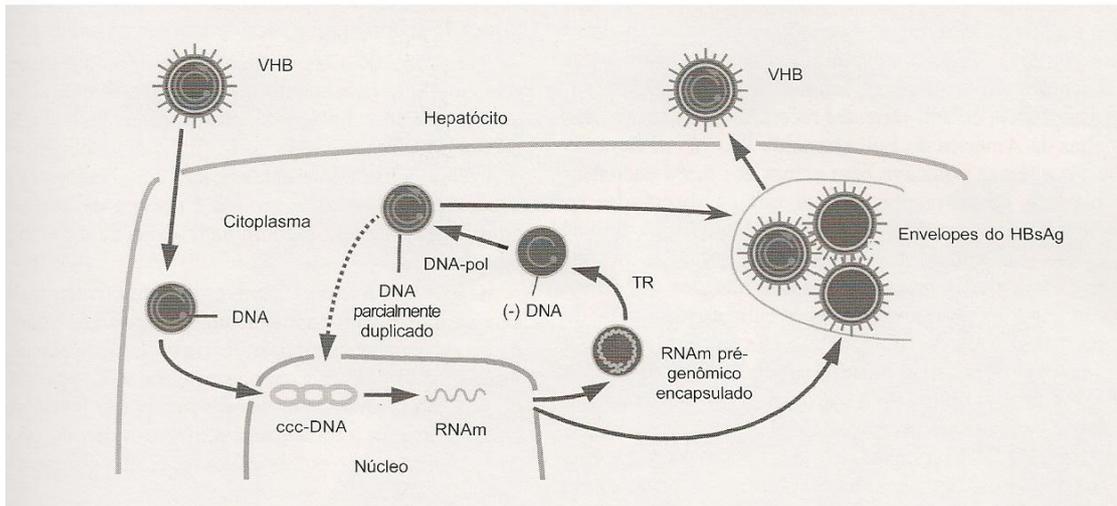


Figura 3. Replicação do Vírus da Hepatite B  
 Fonte: Gonçalves-Junior, 2005.

### 2.3 Epidemiologia do VHB

A hepatite causada pelo vírus da hepatite B (VHB) é um dos mais sérios problemas de Saúde Pública no mundo. Apesar da vacinação, testes sorológicos em serviços de hemoterapia, e programas de prevenção a doenças sexualmente transmissíveis, o número de indivíduos infectados com o VHB continua crescendo, variando de 0,1 a 20%, tornando-se endêmica em muitas partes do mundo (LEE, 1997).

A prevalência do VHB nas populações de diferentes locais apresenta grande variação, sendo que as regiões e países são classificados conforme o nível de endemicidade: alta, média e baixa. Regiões de alta endemicidade são aquelas em que mais do que 7% dos indivíduos da população são portadores crônicos de VHB e entre 50 e 90% apresentam evidências sorológicas de infecção prévia (RONCATO et al., 2008). Estão incluídos nesse grupo África, grande parte da Ásia e Ártico (LEE, 1997), e regiões da Amazônia brasileira (VICTORIA et al., 2008). Na África e a Ásia, o carcinoma hepatocelular associado à hepatite B é uma das principais causas de morte por neoplasias (GONÇALVES-JUNIOR, 2005).

Regiões com 1 a 7% de portadores crônicos e 30 a 50% de indivíduos com evidências sorológicas de infecção prévia são de endemicidade média, pertencem a este grupo sul e leste europeu, Rússia, Ásia Central, Japão, extremo norte africano e Brasil. As populações que apresentam menos de 1% de portadores crônicos e de até 20% de evidência sorológica são consideradas de baixa prevalência, são eles oeste da Europa, América do Norte, Austrália, Nova Zelândia e sudeste da América do Sul (RONCATO et al., 2008). A distribuição geográfica da prevalência da infecção crônica pelo VHB está representada na figura 4.

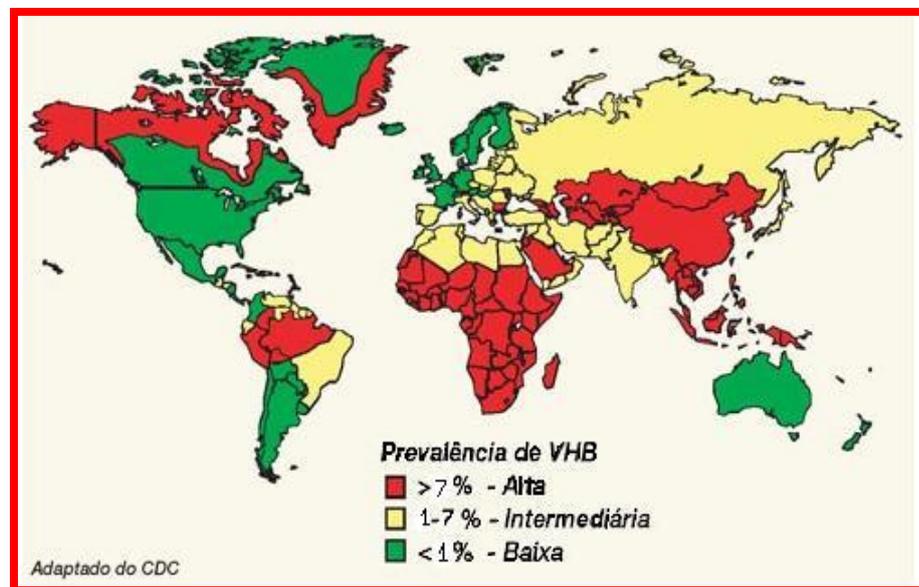


Figura 4. Distribuição geográfica da prevalência da infecção crônica pelo VHB  
 Fonte: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2041/imgs/fig-01-mat-08.jpg>. Acesso: 6 fev. 2010.

O Ministério de Saúde estima que, no Brasil, pelo menos 15% da população já teve contato com o VHB e que 1% da população apresenta doença crônica relacionada a este vírus (BRASIL, 2002).

O Brasil é classificado como área de incidência média pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no entanto estudos de prevalência detectaram diferenças de índices de infecção nas regiões geográficas: 8 a 15% na região Amazônica, 2,5% nas regiões Centro-Oeste e

Nordeste, 2% na Sudeste e 1% na região Sul (GONÇALVES-JUNIOR, 2005; COSER, et al., 2008).

Esses achados corroboram com o estudo de soroprevalência da hepatite B realizado por Clemens et al. (2000), que avaliaram a prevalência de anticorpos contra o antígeno do Core do VHB (anti-HBc) nas regiões Sudeste, Sul, Norte e Nordeste do Brasil. Na região Norte foi encontrado uma taxa de 21,45%, demonstrando uma região de alta endemicidade. Taxas menores foram encontradas na região Sudeste (5,5%), Nordeste (1,2%) e Sul (7,6%).

Frente ao exposto, verifica-se que o quadro epidemiológico da hepatite B no Brasil é influenciado pelas diferenças geográficas, climáticas, econômicas e étnicas.

### 2.3.1 Hepatite B na Amazônia

Estima-se que no Brasil a endemicidade do VHB não seja uniforme em todo país, sendo mais prevalente na região Norte, especialmente na Amazônia Ocidental (BRASIL et al., 2003).

Estudo realizado por Aquino et al. (2008), no qual estimou a prevalência dos marcadores sorológicos para a hepatite B (HBsAg, anti-HBc total e anti-HBc IgM) em indivíduos do Estado do Pará, atendidos no Laboratório de Saúde Pública, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2005, demonstrou que 3,6% indivíduos foram reativos para o HBsAg; 37,7% para o anti-HBc total e 3,1% para o anti-HBc IgM.

Paula et al. (2001), em estudo no qual analisaram comunidades ribeirinhas da Bacia Amazônica Ocidental, ao longo dos rios Purus e Acre, mostraram a alta endemicidade ao VHB, com sorologia positiva de 5,2% para HBsAg.

As pesquisas acima mencionadas corroboram com o estudo realizado no Estado do Amazonas por Brasil et al. (2003), que avaliou a prevalência de marcadores sorológicos para

o VHB em contatos domiciliares no Estado do Amazonas, foram estudados 97 pacientes e 258 familiares que tinham contato direto com os pacientes. Destes 258 familiares, 31 (12,1%) apresentaram reatividade para HBsAg e 133 (51,6%) foram reativos para Anti-HBs e/ou anti-HBc total. Dos 97 pacientes 48,5% eram portadores inativos do VHB.

Considerando a importância dos inquéritos de base populacionais no planejamento das intervenções em saúde, foi realizado um estudo por Kiesslich et al. (2003), sobre a prevalência de marcadores sorológicos e moleculares do VHB, incluindo detecção dos níveis de VHB-DNA em 1.460 gestantes residentes no interior do Estado do Amazonas. As sub-regiões do Juruá (HBsAg 8,7%, anti-HBc 75,9%, anti-HBs 73,4%) e Purus (HBsAg 4,8%, anti-HBc 70,7%, anti-HBs 70,7%) apresentaram maiores índices de marcadores sorológicos. Entre as 46 gestantes reativas para HBsAg, 36 (78,3%) foram positivas para DNA-VHB pela PCR.

A população indígena no Brasil é estimada em aproximadamente 460.000 índios, que perfaz cerca de 0,25% da população brasileira (FUNAI/BRASIL, 2010). De acordo com estudo realizado por Braga et al. (2001), em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas, encontraram uma taxa de portadores crônicos do HBsAg de 9,7%. A taxa de prevalência de infecção passada em indivíduos anti-HBc reativos foi de 54,5%, esses dados confirmam o caráter endêmico desta infecção em populações indígenas na Amazônia.

Pesquisadores acreditam que a implantação da vacinação contra hepatite B a partir de setembro de 1989, na cidade de Lábrea, Estado do Amazonas, bacia do Rio Purus, reduziu a prevalência de portadores do antígeno de superfície do VHB (HBsAg). Segundo essa pesquisa, na qual se avaliou a prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B (VHB), a taxa de prevalência do anti-HBc total encontrada foi de 49,9%; e de HBsAg foi de 3,3%. Essa taxa de prevalência de portadores do HBsAg no local identifica um padrão de endemicidade

moderada, diferente do apresentado anteriormente à introdução da vacina, no qual o HBsAg era de 15,3% (BRAGA et al., 2004).

A ocorrência de coinfeção pelo *plasmodium* com o vírus da hepatite B em área endêmica na Amazônia Brasileira estaria diretamente relacionada ao padrão de circulação desses agentes na população e à prevalência de portadores do HBsAg. Em estudo realizado no município de Lábrea, foi encontrada uma elevada prevalência de 51,4% de anticorpos contra antígenos do *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium falciparum* na população estudada, com provável predominância de casos passados por malária *vivax* e moderada endemicidade de 3,3% de HBsAg (BRAGA et al., 2005). Estudos experimentais e epidemiológicos indicam a possibilidade de transmissão do VHB por insetos hematófagos, sugerindo que esse tipo de transmissão contribua para a elevada endemicidade em regiões tropicais (IVERSSON et al., 1990; CHANTEAU et al., 1993).

O advento da biologia molecular e da reação em cadeia da polimerase (PCR) do VHB conduziu a uma revisão dos padrões sorológicos da infecção. O DNA-VHB pode ser detectado entre os indivíduos HBsAg negativos, positivo ou não para Anti-HBc total. Esse padrão sorológico molecular é denominado hepatite oculta, e está associado a vírus mutante (DATTA et al., 2007; RAIMONDO et al., 2007). No intuito de averiguar a presença de hepatite oculta na Amazônia Ocidental, associando sua presença com passado de icterícia, HBsAg negativo e anti-HBc total positivo, Barros-Júnior et al. (2008) realizaram um estudo, cujos resultados demonstraram a ocorrência da hepatite B oculta entre os pacientes, porém com taxas de prevalência abaixo do esperado para a região. De 51 pacientes anti-HBc total reativo testado, nove (17,6%) foram positivos para DNA-VHB. A detecção do DNA-VHB foi realizada por PCR, utilizando o sistema *Semi-Nested* PCR. Os pesquisadores explicam que a baixa prevalência encontrada possa ter ocorrido pelo fato de apenas ter sido utilizada a região S do genoma do VHB como alvo na PCR.

O VHB é o mais frequente causador de Insuficiência Hepática Aguda Grave (Hepatite fulminante), especialmente em regiões de alta prevalência da infecção, tal como ocorre no Japão, no sudeste asiático, em países da Europa e África, no Oriente Médio e na Amazônia. Foram descritos casos de Insuficiência Hepática Aguda Grave em paciente com infecção oculta pelo VHB, em que todos os marcadores sorológicos e virológicos do VHB estão ausentes, exceto o DNA-VHB por PCR em concentrações mínimas (PRADO, 2005).

Reforçando o uso da biologia molecular no diagnóstico do VHB, um estudo foi conduzido com 55 pacientes oriundos do oeste da Amazônia Brasileira, que eram DNA-VHB positivo, após soroconversão de HBeAg, visando descrever as características clínicas e moleculares de pacientes que eram portadores crônicos de HBsAg. A presença de esplenomegalia foi a mais frequente (40%) entre os pacientes, e três tipos de genótipos de VHB foram encontrados: A, D e F (VICTORIA et al., 2008).

De acordo com estudo realizado por Oliveira et al. (2008), um fragmento de 600 pares de base (pb) que codificam o antígeno de superfície do VHB foi amplificado e sequenciado, oriundos de cinco estados da Amazônia brasileira (Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e Tocantins). Um total de 44 sequências de nucleotídeos foi usado para estimar os parâmetros moleculares genéticos e análise filogenética, isolado de pacientes de três estágios da doença: portadores assintomáticos, hepatite aguda e doenças crônicas do fígado. A análise filogenética sugere o genótipo A, predominante na região Amazônica.

Diante do exposto, as pesquisas mostram que a região amazônica apresenta níveis de endemicidade superiores aqueles encontrados nas demais regiões brasileiras. Contudo, os principais mecanismos de propagação da hepatite B na Amazônia, ainda não foram totalmente identificados e podem envolver fatores que são específicos para a região.

## 2.4. Marcadores sorológicos do VHB

O diagnóstico sorológico baseia-se na detecção de antígenos e de anticorpos circulantes. Os marcadores disponíveis para a análises laboratoriais são os seguintes: HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc IgM e anti-HBc total.

Quadro 1

Marcadores sorológicos do VHB

Abreviatura	Definição	Significado Clínico
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Primeiro marcador da infecção por VHB</li> <li>- Aparece de um a três semanas antes dos sintomas.</li> <li>- Sua presença junto com o anti-HBc indica presença de infecção.</li> <li>- Persistência por mais de seis meses indica infecção crônica.</li> <li>- Desaparece nos primeiros seis meses da doença quando a evolução é para a cura.</li> </ul>
Anti-HBc IgG ou Total	Anticorpo IgG contra o HBcAg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Marcadores contato prévio com o vírus da hepatite B.</li> <li>- Não indica imunidade.</li> </ul>
Anti-HBc IgM*	Anticorpo IgM contra o HBcAg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Não é induzido pela vacinação.</li> <li>- *Aparece com o início dos sintomas.</li> <li>- *Marcador da infecção aguda recente.</li> <li>- *Pode persistir por seis meses</li> </ul>
HBeAg	Antígeno de replicação viral	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparece pouco antes dos sintomas.</li> <li>- Indica alta infectividade.</li> <li>- Sua persistência no soro indica replicação viral independente da fase da doença (aguda ou crônica).</li> </ul>
Anti-HBe	Anticorpo contra o HBeAg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparece dentro de poucas semanas após a perda do HBeAg.</li> <li>- Indica declínio de infectividade.</li> </ul>
Anti-HBs	Anticorpo contra o HBsAg	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aparece um a três meses após a vacinação contra a hepatite B ou após a recuperação de uma infecção aguda.</li> <li>- Indica imunidade à hepatite B.</li> </ul>

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2005.

## 2.5 Biologia molecular do VHB

A aplicação das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico dos vírus é de grande importância nos estudos do VHB, pois são utilizadas técnicas de detecção de ácidos nucleicos, que identificam sequências de nucleotídeos virais específicos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o protótipo das técnicas de amplificação de DNA alvo. A PCR emprega iniciadores curtos de oligonucleotídeos (primers) e uma DNA polimerase termoestável, como a *Taq* polimerase para amplificar segmento do DNA alvo, em geral de 100 a mil pares de bases. A PCR é feita por meio de ciclos que consistem na desnaturação, ligação de primer e extensão, sendo que cada passo ocorre em temperaturas diferentes. A progressão dos ciclos é feita por meio de um termociclador, que controla as temperaturas da reação. Após a amplificação, o produto amplificado, também chamado amplicon, é detectado por meio da eletroforese em gel, em geral de agarose. Uma das vantagens da PCR é a estabilidade do DNA que permite a identificação viral mesmo em condições em que o vírus perdeu a viabilidade (RÁCZ, 2008b).

A PCR é um método rápido, direto e extremamente sensível, pois permite detectar entre 10 e 100 cópias do vírus por mililitro de soro e apresenta alta especificidade, desde que a região genômica a ser amplificada seja encontrada apenas no vírus (SILVA; NIEL, 2006).

O teste da PCR para o DNA-VHB pode ser aplicado na avaliação da infecção pelo VHB, no diagnóstico de hepatite fulminante, no monitoramento da resposta ao tratamento e no diagnóstico da hepatite B oculta (COSER et al., 2008).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar a prevalência do DNA do vírus da hepatite B em povos de etnias indígenas habitantes dos rios Curuçá e Itaquai no Vale do Javari, Estado do Amazonas.

#### **3.2 Objetivos Específico**

3.2.1 Descrever aspectos epidemiológicos e estimar os possíveis fatores de riscos da ocorrência do vírus da hepatite B na população em estudo;

3.2.2 Analisar a prevalência do DNA-VHB nas diferentes etnias indígenas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Modelo de estudo**

Realizou-se um estudo descritivo transversal do tipo detecção de caso, no qual foi estimada a prevalência do DNA do vírus da hepatite B em povos de etnias indígenas que habitam os rios Curuçá e Itaquai no Vale do Javari no Estado do Amazonas-Brasil, realizado por meio da técnica molecular denominada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O presente estudo fez parte do projeto de maior amplitude: “Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B em população indígena do Vale do Rio Javari no Estado do Amazonas”, aprovado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), registro nº 15276, parecer nº 216/2009, aprovado no dia 24 de abril de 2009 (Anexo 2) e no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), protocolo nº 189/08, aprovado no dia 05 de dezembro de 2008 (Anexo 3).

### **4.2 Universo de estudo**

#### **4.2.1 População de estudo**

A população de estudo foram os habitantes das comunidades indígenas de São Sebastião, Volta Grande e Pedro Lopes (Rio Curuçá), Bananeira, Remancinho e Massapê (Rio Itaquai) das etnias Kanamary, Mayoruna, Marubo e Kulina, localizadas no Vale do Javari, Estado do Amazonas.

#### 4.2.1.1 Caracterização da área de estudo

A Terra Indígena Vale do Javari está localizada no município de Atalaia do Norte, no extremo ocidente do Amazonas, fronteira com o Peru (Figura 5). É uma das regiões com população indígena mais dispersa do país. Os índios estão espalhados em uma área de 8,5 milhões de hectares. Foi homologada pelo Governo Federal por meio do Decreto s/n de 30 de abril de 2001 publicado no Diário Oficial da União em 02 de maio de 2001, abrange os territórios dos povos Kanamary, Matis, Mayoruna, Marubo, Kulina, Korubo e índios isolados (FUNASA/BRASIL, 2008; UNIVAJA/BRASIL, 2010; BRASIL, 2010).

O acesso ao Vale do Javari saindo de Manaus se fez por via aérea até Tabatinga (2,40 horas) e por meio de barco até Atalaia do Norte (2 horas). Até o médio do rio Curuçá foram 13 horas e ao rio Itaquai foram 9 horas de barco com motor de 200 Hp.

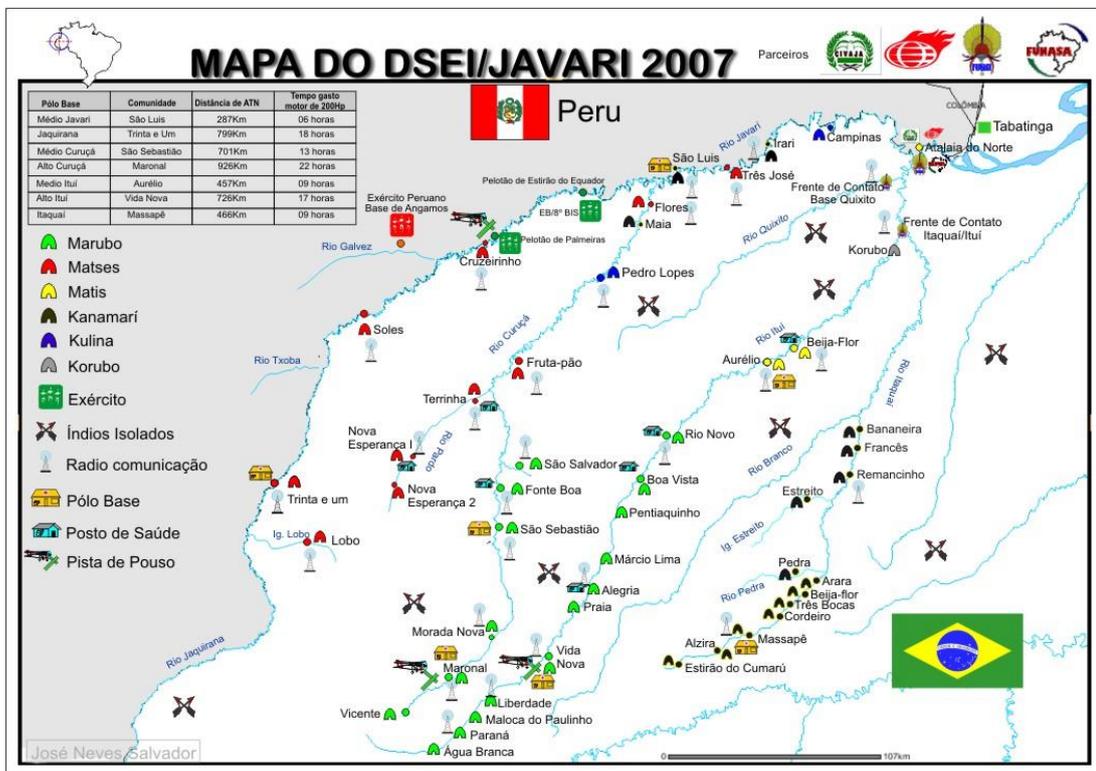


Figura 5. Mapa do Vale do Javari.  
Fonte: FUNASA, Boletim Informativo Especial, abril 2008.

O Vale do Javari representa a maior concentração de grupos autônomo numa área, com potencial da fauna e flora, recursos hídricos e biológicos de grande importância hoje para o mundo. No entanto, a intensa exploração dos seus recursos naturais pelos caçadores, pescadores e madeireiros peruanos e brasileiros com fins comerciais comprometeu a sobrevivência dos povos indígenas da região. A presença não indígena provocou inúmeras epidemias, como a hepatite, e caracterizou-se por sucessivos massacres daqueles que resistiam à invasão de seus territórios (CIMI/BRASIL, 2010).

Hoje os indígenas vivem com falta de alternativas econômicas para geração de renda, apesar das riquezas naturais que a região oferece. No campo da saúde, a situação do Vale do Javari é preocupante, caracterizada pela presença da hepatite A, B, C e D, malária, filariose, meningite e tuberculose (COIAB/BRASIL, 2010).

#### 4.2.2 Participantes e Critérios de Elegibilidade

As comunidades indígenas de São Sebastião, Volta Grande e Pedro Lopes (rio Curuçá), Massapê, Remancinho e Bananeira (rio Itaquai) foram estimadas em 582 habitantes (FUNASA/BRASIL, 2010), calculou-se o “n” amostral baseando no estudo com amostras finitas, utilizando a seguinte equação:

$$n = \frac{Z^2 \cdot \hat{p} \cdot \hat{q} \cdot N}{d^2(N-1) + Z^2 \cdot \hat{p} \cdot \hat{q}}$$

Em que:

Z = abscissa da norma padrão=1,96

N = tamanho da população padrão

p = estimativa de proporção

q = 1 - p

d = erro amostral

Considerou-se uma prevalência de 15% de positividade nesta população, com intervalo de confiança de 95% e admitindo-se um erro amostral de 5% estimou-se uma casuística de 147 amostras. A amostra foi acrescida de 10% elevando o universo de estudo para 162. O estudo foi realizado com 180 amostras.

Os participantes foram selecionados por método aleatório estratificado, pois a inclusão dos mesmos para compor a amostragem seguiu a ordem casual de chegada ao local da coleta, dependendo da anuência da comunidade indígena.

Fizeram parte da pesquisa jovens e adultos habitantes das comunidades indígenas de São Sebastião, Volta Grande e Pedro Lopes (rio Curuçá), Massapê, Remancinho e Bananeira (rio Itaquai) do Vale do Javari das etnias Kanamary, Mayoruna, Marubo e Kulina com história clínica relacionada a hepatites virais ou não, que se dispuseram a participar da pesquisa, mediante a concordância do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

A apresentação do TCLE foi realizada mediante visita do pesquisador, juntamente com representantes da Associação Marubo de São Sebastião (AMAS), União dos Povos Indígenas do Vale do Javari (UNIVAJA) e Secretaria de Estado para os Povos Indígenas (SEIND). A estratégia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e da coleta de sangue foi utilizar um cartaz contendo figuras para a obtenção da amostra sanguínea em uma linguagem simples e a mais correspondente à cultura da comunidade, em seguida fez-se a leitura do TCLE, com tradução para Kanamary, Kulina, Marubo e Mayoruna, de acordo com a língua da comunidade.

As comunidades indígenas de São Sebastião (S 05°51'37.3'' W 072°04'53.2''), Volta Grande (S 05°37'21.6'' W 072°03'26.8'') e Pedro Lopes (S 04°32'22.6'' W 071°24'04.3'') no rio Curuçá foram visitadas em setembro/2009; comunidade de Massapê (S 06°14'26.8'' W

070°36' 32.6''), Remancinho (S 05°57'55.5'' W 070°37'07.9'') e Bananeira (S 05°56'28.4'' W 070°34'52.1'') no rio Itaquai em março/2010.

#### 4.2.3 Amostra

Neste estudo foi coletado sangue venoso (5 mL), utilizando seringa e agulha 25 x 7 descartável (BD/Becton Dickinson) e adicionado em tubo *vacutainer* contendo EDTA. A coleta foi realizada por um técnico de saúde designado pela FUNASA/Atalaia do Norte. Uma vez que a localização geográfica da área não apresentou recursos para manter as amostras a -20°C, essas foram acondicionadas em container a temperatura ambiente, pois conforme Perrenoud (1995) e Hollinger (2001), o VHB é estável em temperatura próxima de 30°C por pelo menos 6 meses.

O transporte posterior da coleta foi feito utilizando o transporte aéreo, com destino à Manaus/AM. Em Manaus as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm. durante 5 minutos para separar o plasma, identificadas com o número de registro e armazenadas a -20°C.

Os procedimentos laboratoriais moleculares foram realizados no Laboratório de Virologia/Coordenação de Pesquisa em Ciências da Saúde do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPCS/INPA).

Após o término dos procedimentos laboratoriais moleculares, os resultados foram disponibilizados à SEIND, permitindo que fossem orientados na adoção de medidas preventivas e encaminhados a tratamento quando necessário.

## 4.3 Procedimentos

### 4.3.1 Fluxo de procedimento

A seqüência das etapas do estudo encontra-se ilustrada na Figura 1.

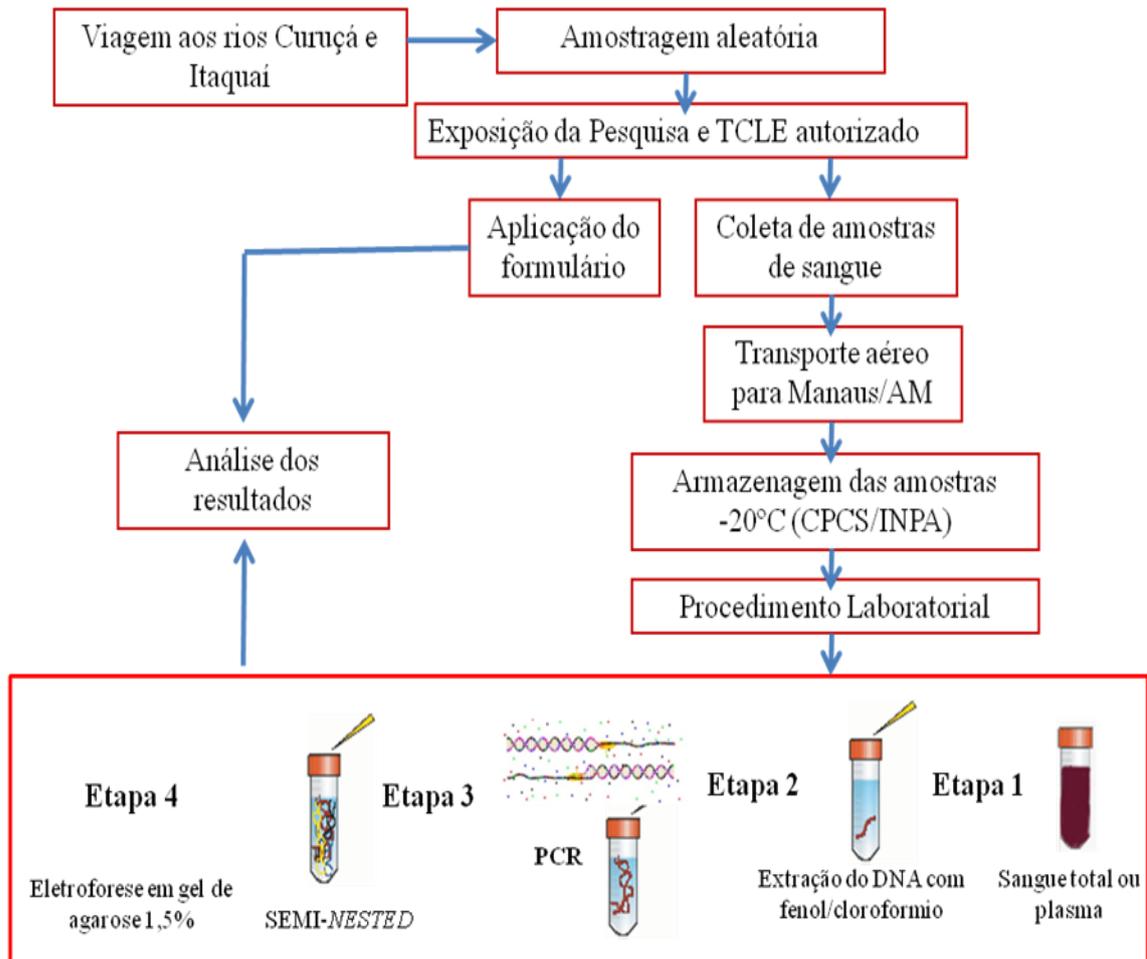


Figura 6. Fluxograma dos procedimentos do estudo

#### 4. 3.2 Instrumentos de coleta de informações

O instrumento de coleta de dados foi composto por um formulário (Apêndice 1) com dados de identificação e história clínica, o qual foi aplicado após a adesão dos indivíduos por intermédio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em caso de menores de idade o consentimento foi dado pelo responsável.

O formulário foi dividido em três partes. A Parte I continha identificação do participante envolvendo nome, idade, sexo, naturalidade, endereço e tempo em que vive no local. A Parte II foi composta por busca de fontes prováveis de contágio. A Parte III envolveu aspectos clínicos no momento da coleta da amostra, os quais foram registrados pelo pesquisador.

As informações obtidas no formulário foram transcritas para uma matriz, em um processo de codificação, na qual os dados brutos foram transformados sistematicamente e agregados em categorias para análise dos resultados.

#### **4.4 Procedimentos laboratoriais**

O método de identificação do DNA viral da hepatite B foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi feita a extração do DNA-VHB, o produto da PCR foi submetida ao *Semi-nested* PCR, com iniciadores tipo específico que amplificam segmentos do gene S do VHB, logo os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (1,0 µg/mL), visualizado em um transluminador de luz ultravioleta, segundo metodologia descrita por Oliveira (2007).

#### 4.4.1 Extração do DNA do VHB

A extração do DNA foi executada utilizando-se o método fenol/clorofórmio segundo Karasawa et al. (1995), modificado por Oliveira, (2007). Em um microtubo de 2,0 mL novo estéril, adicionou-se 250 µL de plasma, em câmara de exaustão. Adicionou-se: 3,0 µL de Tris-HCL-1,0M; 3,0 µL de EDTA-0,5M; 15 µL de SDS-10% e 50 µL de Proteinase-K (10mg/ml). A mistura foi bem homogeneizada em vórtex e incubou-se a 56°C por 2 horas. Após esse tempo, adicionou-se 1 Volume de Fenol hidratado e tamponado, homogenizou-se bem em vórtex e centrifugou-se a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Recolheu-se a fase aquosa para outro microtubo e adicionou-se 1 volume de clorofórmio hidratado. Homogenizou-se bem em vórtex e em seguida centrifugou-se a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento do clorofórmio hidratado duas vezes.

Para a precipitação do DNA viral foi adicionado à fase aquosa 0,1 Volume de NaCL 3,0 M e 2,5 Volume de etanol absoluto a -20°C. Homogeneizou-se e incubou-se a -20°C por 12 horas. Após esse período centrifugou-se a 10.000 g por 20 minutos a 4°C. Descartou-se todo o sobrenadante e deixou-se os microtubos invertidos na câmara de fluxo para evaporar todo o etanol. Resuspendeu-se o sedimento em 50 µL de tampão de resuspensão (Tampão TR: Tris-HCL 10 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0), incubou-se por cerca de 3 horas na geladeira para completa eluição e em seguida guardou-se a -20°C até o seu uso na PCR. Foi utilizada uma amostra controle positivo na extração.

Utilizou-se também neste estudo o conjunto de reagentes Easy-DNA Kit (Invitrogen) para extração do DNA das amostras positivas para VHB.

#### 4.4.2 Procedimento molecular

Uma vez extraído, o DNA viral foi submetido à técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo o protocolo Oliveira (2007). O produto amplificado foi submetido à *Semi-Nested* PCR com iniciadores tipo-específicos, que amplificam o seguimento do gene S do vírus da Hepatite B, descrito por Oliveira (2007).

Para confirmação do tipo viral, as sequências dos primers foram submetidas à análise pela ferramenta BLAST do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), na qual apresentou 100% de genoma completo para DNA-VHB e ao gene S. As sequências desses primers se encontram no Quadro 2.

Quadro 2

Sequência dos primers para amplificação do gene S.

Nome	Sequência	Qtde	Posição no genoma VHB
2821(+)	5'-GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA CA-3'	23 nt	2821-2150
783 (-)	5'-CTC ACG ATG CTG TAC AGA CTT-3'	21 nt	783-762
P1 (+)	5'-TGC CTC TCA CAT CTC GTC AA-3'	20 nt	104-123

##### 4.4.2.1 Amplificação do gene S por PCR

Neste procedimento, foram utilizados na PCR os pares iniciadores 2821 e 783, sentido senso e antissenso, respectivamente, que amplificaram o seguimento genômico S inteiro (OLIVEIRA, 2007), originando um produto de 1.200 pb. A reação de amplificação foi realizada com um volume final de 25 µL, contendo os seguintes componentes: 12,80 µL de água BioMol, 2,5 µL de tampão 10X PCR, 0,5 µL de mix dNTP (10mM), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub>

(50mM), 0,20  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu\text{l}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  de iniciador 2821 senso (10 pmoles/ $\mu\text{L}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  de iniciador 783 antissenso (10 pmoles/ $\mu\text{L}$ ), 3  $\mu\text{L}$  DNA amostra.

Na reação incluiu-se uma amostra controle positivo de DNA-VHB e uma amostra controle negativo de DNA-VHB.

As reações foram realizadas em um termociclador Biosystems®, onde se utilizou um total de 35 ciclos com a seguinte programação: a 94°C por 5 minutos (pré-aquecimento), a 94°C por 30 segundos (desnaturação), a 57,1°C por 2 minutos (hibridação), a 72°C por 30 segundos (extensão), a 72°C por 7 minutos (extensão final) e - 4 °C (CASTILHO, 2010).

#### 4.4.2.2 Semi-Nested PCR.

O produto da primeira reação da PCR foi submetido à semi-Nested PCR, o qual foi diluído em água livre de DNase e RNase na proporção 1:100. Os componentes utilizados foram os mesmos da PCR, com exceção dos iniciadores, desta vez foram utilizados os iniciadores específicos P1(+) e 783 (-), originando um produto de 680 pb (OLIVEIRA, 2007).

A mistura da reação e o produto da PCR a 1:100 foram submetidos à incubação em termociclador Biosystems®, utilizando o mesmo programa de amplificação da PCR segundo Castilho (2010).

Foi incluída na reação uma amostra controle positivo de DNA-VHB e uma amostra controle negativo de DNA-VHB.

#### 4.4.3 Eletroforese dos produtos de PCR amplificados (gene S)

Os produtos da reação da semi-*Nested* PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado em brometo de etídeo (1,0 µg/mL) e submetidos a um campo elétrico. No gel foram aplicados 5,0 µL do produto da semi-*Nested* PCR misturados com 3,0 µL de *loading buffer*. Foi utilizado o padrão de peso molecular *Ladder* de 100 pb (Invitrogen). Para migração das amostras em gel na cuba de eletroforese, foi aplicada uma voltagem de 100 volts por cerca de 1 hora.

Ao término da migração eletroforética, a visualização do fragmento de DNA foi realizada em um transluminador UV PW Sys 300 e o registro foi feito em um sistema de fotodocumentação com o equipamento Alpha DigiDoc Pro, lente Canon LA-DC 58F e máquina digital Canon Power Shop A-640.

#### 4.5 Análise dos resultados

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas de frequência, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Na estimativa da prevalência de hepatite B por meio da PCR foram calculados ainda os intervalos de confiança ao nível de 95% (IC95%).

Na análise da idade, foram calculadas a mediana e os quartis ( $Q_i$ ), pois a mesma não apresentava distribuição normal ao nível de 5% de significância. Na comparação das tabelas de dupla entrada, foi calculado o teste do qui-quadrado de *Pearson*, sendo que na impossibilidade de sua aplicação, utilizou-se o teste exato de *Fisher*. Na comparação das medianas da idade em relação ao resultado da PCR aplicou-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info versão 3.5.1 para Windows, que é desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo CDC ([www.cdc.org/epiinfo](http://www.cdc.org/epiinfo)), e o nível de significância fixado para os testes foi de 5%.

## 5. RESULTADOS

Foram analisadas 180 amostras coletadas nos rios Curuçá e Itaquá no Vale do Javari, Amazonas. Dessas amostras 49/180 (27,2%) pertenciam à etnia Marubo, 125/180 (69,4%) a Kanamary e 6/180 (3,3%) a outras etnias. A população de estudo foi constituída por 87/180 (48,3%) indivíduos do sexo masculino e 93/180 (51,7%) do feminino, segundo Tabela 1.

Tabela 1

Distribuição segundo a frequência das etnias e dos dados sociodemográficos da população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

<b>Variáveis (n = 180)</b>	<b>f<sub>i</sub></b>	<b>%</b>
<b>Etnia</b>		
Marubo	49	27,2
Kanamary	125	69,4
Outras	6	3,3
<b>Gênero</b>		
Masculino	87	48,3
Feminino	93	51,7
<b>Idade em anos completos (n = 137)</b>		
11  --- 15	6	4,4
15  --- 20	28	20,4
20  --- 25	20	14,6
25  --- 30	22	16,1
30  --- 35	16	11,7
35  --- 40	12	8,8
40  --- 45	11	8,0
45  --- 50	5	3,6
50  --- 55	7	5,1
> 55	10	7,3
Mediana	27,0	-
Q <sub>1</sub> - Q <sub>3</sub>	20 - 39	
Amplitude	11 - 77	

f<sub>i</sub> = frequência absoluta simples; Q<sub>i</sub> = quartil.

A mediana da idade entre os indivíduos estudados foi de 27 anos com amplitude de 11-77 anos, a faixa de idade de maior frequência foi de 15 a 20 anos (20,4%), e os Quartis Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub> foram de 20-39, os quais estão apresentados na Tabela 1. Entre os participantes 43 indígenas não souberam informar a idade.

Das 180 amostras analisadas pelo estudo, noventa e duas foram DNA-VHB PCR positivas para gene S, significando uma prevalência para o DNA-VHB de 51,1% com IC 95% de 43,6-58,6 e oitenta e oito foram DNA-VHB PCR negativa (48,9%) com IC 95% de 41,4-56,4, como podem ser vistas na Figura 7.

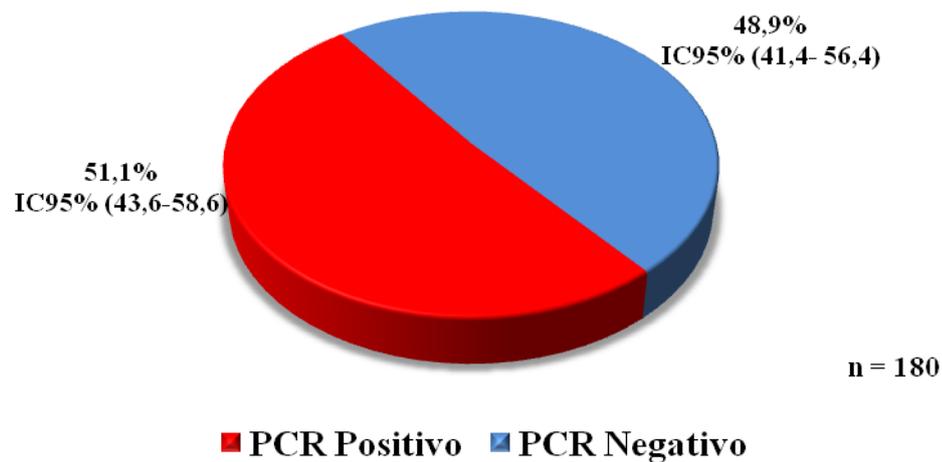


Figura 7. Distribuição segundo o resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

Entre as 92 amostras positivas para o DNA-VHB PCR, 18/49 (36,7%), com IC 95% de 23,4-51,7 pertenciam à etnia Marubo; 68/125 (54,4%), com IC 95% de 45,3-63,3 à Kanamary e 6/6 (100%) a outras etnias, conforme Tabela 2.

Tabela 2

Distribuição segundo a frequência da PCR positiva para DNA-VHB em relação às etnias da população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

<b>Etnia</b>	$f_i/n$	%	IC95%
Marubo	18/49	36,7	23,4 – 51,7
Kanamary	68/125	54,4	45,3 – 63,3
Outras	6/6	100,0	-

$f_i$  = frequência dos casos positivos por meio da PCR.

Dentro os casos para DNA-VHB PCR positivos para gene S, 50,6% foram do sexo masculino e 51,6% do feminino. Na Tabela 3 pode-se visualizar a distribuição dos dados sociodemográficos dos casos positivos e negativos para DNA-VHB. Dentre as amostras investigadas, pôde-se verificar que não houve diferença significativa ao nível de 5% em relação ao sexo ( $p= 0,889$ ). No entanto, quando se analisou a comparação da média de idade em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB foi observado que os indígenas com PCR positiva apresentavam menores média de idade ( $p<0,001$ ), em relação a PCR negativa, respectivamente, 23 anos e 33 anos.

Tabela 3

Distribuição segundo os dados sociodemográficos em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

<b>Variáveis</b>	<b>PCR</b>				Total	p
	Positivo		Negativo			
	$f_i$	%	$f_i$	%		
<b>Gênero (n = 180)</b>						0,889*
Masculino	44	50,6	43	49,4	87	
Feminino	48	51,6	45	48,4	93	
<b>Idade</b>						<b>&lt;0,001**</b>
Mediana	23,0		33,0			
Q <sub>1</sub> /Q <sub>3</sub>	18 -		22 -			

$f_i$  = frequência absoluta simples; Q<sub>i</sub> = quartil; \* Teste do qui-quadrado de *Pearson*; \*\* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney; Valor de “p” em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

Quanto às fontes de contágio em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB, no contato com pessoas suspeita de hepatite não foi constatada diferença estatística significantes ( $p=0,164$ ) ao nível de 5%. O mesmo ocorreu com suspeita de hepatite no grupo familiar, tatuagem ( $p=0,420$ ), extração dentária ( $p=0,781$ ), compartilhamento de roupa íntima, escova de dente ( $p=0,364$ ), aparelho de barbear, ferimento na pele e afastamento da aldeia ( $p=0,271$ ), como pode ser observado na Tabela 4. Estas variáveis não foram preenchidas no formulário na sua totalidade pela população em estudo.

Tabela 4

Distribuição segundo a frequência das fontes de contágio em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

Variáveis	PCR				Total	p
	Positivo		Negativo			
	f <sub>i</sub>	%	f <sub>i</sub>	%		
<b>Contato com pessoa suspeita de</b>						0,164*
Sim	18	39.1	28	60.9	46	
Não	12	60.0	8	40.0	20	
Não sabe	14	35.0	26	65.0	40	
<b>Suspeita de hepatite no grupo familiar</b>						***
Sim	20	41.7	28	58.3	48	
Não	8	57.1	6	42.9	14	
Não sabe	1	20.0	4	80.0	5	
<b>Tatuagem</b>						0.420*
Sim	34	53.1	30	46.9	64	
Não	39	46.4	45	53.6	84	
<b>Extração dentária</b>						0.781*
Sim	60	51.3	57	48.7	117	
Não	21	53.8	18	46.2	39	
<b>Compartilhou roupa íntima</b>						-
Sim	-	-	1	100.0	1	
Não	32	46.4	37	53.6	69	
<b>Compartilhou escova de dente</b>						0.364**
Sim	1	25.0	3	75.0	4	
Não	31	47.7	34	52.3	65	
<b>Aparelho de barbear</b>						-
Sim	-	-	2	100.0	2	
Não	31	47.0	35	53.0	66	
<b>Ferimento frequente na pele</b>						-
Sim	-	-	2	100.0	2	
Não	22	40.0	33	60.0	55	
<b>Afastamento da aldeia</b>						0.271*
Sim	24	53.3	21	46.7	45	
Não	17	41.5	24	58.5	41	

f<sub>i</sub> = frequência absoluta simples; \* Teste do qui-quadrado de *Pearson*; \*\* Teste exato de *Fisher*; \*\*\* Não foi possível aplicar a estatística de teste devido as restrições de *Cochran* (VIEIRA,2004).

Na Tabela 5 tem-se a distribuição segundo a frequência dos aspectos clínicos em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB, dos participantes que declararam apresentar quadro de febre, 80% (12/15) foram positivos e 20% (3/15) foram negativos, com diferença estatística de 5% ( $p<0,001$ ). Dentre os que não tinham este aspecto clínico, 28,6% (12/42) e 71,4% (30/42), respectivamente, apresentaram resultados positivos e negativos para DNA-VHB.

No estudo, 20 indígenas declararam estado de gravidez (21,5%), com positividade de 75% (15/20) para DNA-VHB, cuja diferença estatística ao nível de 5% foi de  $p=0,009$ . No entanto, não foi constatada a mesma diferença estatística para vacina contra hepatite B ( $p=0,748$ ), como também em relação a vacina contra hepatite B ( $p=0,748$ ), mal-estar no corpo ( $p=0,799$ ), náuseas ( $p=0,550$ ), icterícia, dor na região do fígado ( $p=0,146$ ), mialgia ( $p=0,552$ ), atralgia ( $p=0,832$ ) e urina escura ( $p=0,438$ ), conforme Tabela 5. Nem todos os participantes informaram no formulário o seu aspecto clínico.

Tabela 5

Distribuição segundo a frequência dos aspectos clínicos em relação ao resultado da PCR para DNA-VHB na população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

Variáveis	PCR				Total	P
	Positivo		Negativo			
	f <sub>i</sub>	%	f <sub>i</sub>	%		
<b>Febre</b>						<b>&lt;0,001*</b>
Sim	12	80,0	3	20,0	15	
Não	12	28,6	30	71,4	42	
<b>Grávida</b>						<b>0,009*</b>
Sim	15	75,0	5	25,0	20	
Não	21	40,4	31	59,6	52	
<b>Vacinado contra hepatite B</b>						<b>0,748**</b>
Sim	54	49,5	55	50,5	109	
Não	1	50,0	1	50,0	2	
<b>Mal-estar no corpo</b>						<b>0,799*</b>
Sim	13	48,1	14	51,9	27	
Não	58	50,9	56	49,1	114	
<b>Náuseas</b>						<b>0,550**</b>
Sim	3	60,0	2	40,0	5	
Não	8	50,0	8	50,0	16	
<b>Icterícia</b>						-
Sim	1	100,0	-	-	1	
Não	10	62,5	6	37,5	16	
<b>Dor na região do fígado</b>						<b>0,146*</b>
Sim	17	65,4	9	34,6	26	
Não	55	49,5	56	50,5	111	
<b>Mialgia</b>						<b>0,552*</b>
Sim	8	53,3	7	46,7	15	
Não	10	43,5	13	56,5	23	
<b>Atralgia</b>						<b>0,832*</b>
Sim	7	46,7	8	53,3	15	
Não	13	43,3	17	56,7	30	
<b>Urina escura</b>						<b>0,438**</b>
Sim	2	66,7	1	33,3	3	
Não	22	44,0	28	56,0	50	

f<sub>i</sub> = frequência absoluta simples; \* Teste do qui-quadrado de *Pearson*; \*\* Teste exato de *Fisher*; \*\*\* Não foi possível aplicar a estatística de teste devido as restrições de *Cochran* (VIEIRA,2004); Valor de “p” em negrito itálico indica diferença estatística ao nível de 5%.

Considerando-se os afluentes e as comunidades indígenas do Vale do Javari das amostras DNA-VHB PCR positivas, 24/55 amostras foram procedentes do rio Curuçá (43,6%), com IC 95% 30,3-57,7; sendo 8/37 pertencentes à comunidade indígena de São Sebastião (21,6%), 10/12 de Volta Grande (83,3%) e 6/6 de Pedro Lopes (100%). As amostras oriundas do rio Itaquá DNA-VHB PCR positivas foram 68/125, com 54,4% de prevalência, IC 95% 45,3-63,3. Destas, 32/56 eram da comunidade indígena de Massapê (57,1%), 13/38 de Remancinho (34,2%) e 23/31 de Bananeira (74,2%), como se pode observar na Tabela 6.

Tabela 6

Distribuição segundo a frequência da PCR positiva para DNA-VHB em relação aos afluentes e as comunidades onde residem as população indígena do Vale do Javari, Amazonas.

<b>Afluentes/Comunidade</b>	$f_i/n$	%	IC95%
<b>Rio Curuçá</b>	24/55	43,6	30,3 – 57,7
São Sebastião	8/37	21,6	9,8 – 38,2
Volta Grande	10/12	83,3	51,6 – 97,9
Pedro Lopes	6/6	100,0	-
<b>Rio Itaquá</b>	68/125	54,4	45,3 – 63,3
Massapê	32/56	57,1	43,2 – 70,3
Remancinho	13/38	34,2	19,6 – 51,4
Bananeira	23/31	74,2	55,4 – 88,1
<b>Geral</b>	92/180	51,1	43,6 – 58,6

$f_i$  = frequência dos casos positivos por meio da PCR.

Na Figura 8, tem-se a visualização do perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% obtido após a amplificação do DNA-VHB gene S via *semi-nested* PCR, utilizados os pares de iniciadores 2821-783 e P1-783. O produto obtido foi equivalente a 680 pb.

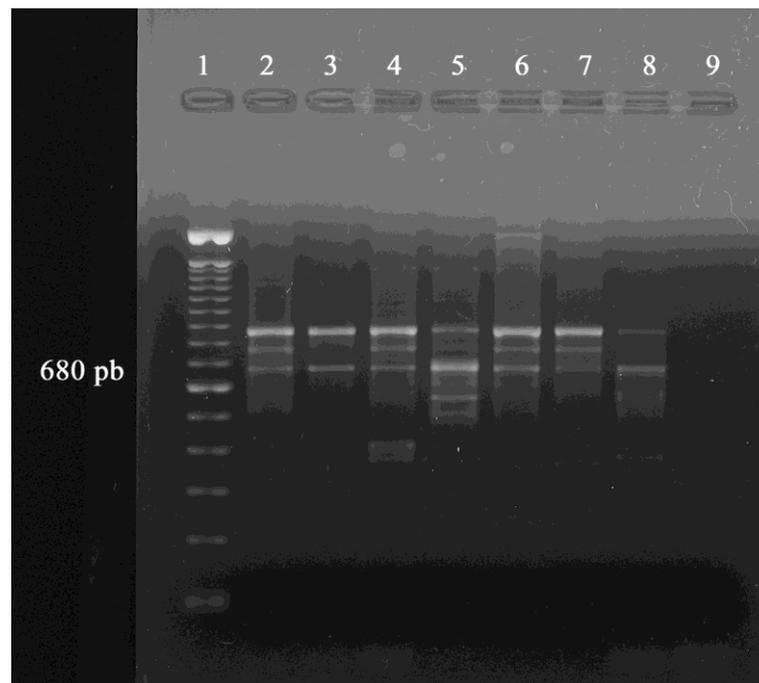


Figura 8. Resultado representativo da eletroforese em gel de agarose 1,5% das amostras amplificadas por semi-nested PCR para DNA-VHB gene S. Canal 1: marcador de PM=100 pb (Invitrogen Life Technologies); canais 2 a 7: amostras positivas; canal 8: controle positivo; canal 9: controle negativo. Bandas acima e abaixo de 680 pb são inespecíficas, decorrentes da natureza do prime e das amostras.

## 6. DISCUSSÃO

Os estudos epidemiológicos sobre a hepatite B no Brasil são escassos, mesmo sendo um problema de saúde pública. Sua frequência é ainda subestimada, considerando que muitos indivíduos infectados são assintomáticos e as infecções sintomáticas são insuficientemente notificadas, o VHB continua a se disseminar no mundo (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

A região Amazônica apresenta a mais alta endemicidade de VHB, inclusive entre as populações indígenas (AZEVEDO et al., 1996; FERRARI et al., 1999; BRAGA et al., 2001), entretanto, os aspectos epidemiológicos e a transmissão da infecção do VHB na região Amazônica não estão claros, especialmente as condições que favorecem esta alta prevalência (BENSABATH et al., 1987; FONSECA, 1988).

O resultado desse estudo confirma a alta prevalência do DNA-VHB nas comunidades indígenas dos rios Curuçá e Itaqui do Vale do Javari no Amazonas, com prevalência estimada de 51,1%. Este dado condiz com os achados de Dias (2009), realizado no município de Lábrea, Estado do Amazonas, no qual analisou 86 amostras, sendo 45,3% DNA-VHB PCR positivos para gene S e com a pesquisa de Victoria et al. (2008), no qual estudaram 55 pacientes oriundos do oeste da Amazônia Brasileira, onde 40% foram positivos para DNA-VHB PCR gene S.

Estudo de Oliveira (2007), demonstrou em 80 amostras, oriundas do ambulatório de hepatite da Fundação de Medicina Tropical e do município de Lábrea, Estado do Amazonas, uma positividade de 85% de DNA-VHB PCR para gene S, superior ao nosso estudo. Acreditamos que essa diferença de prevalência deve-se ao fato das amostras serem de pacientes com HBsAg, HBeAg ou anti-HBc-total positivas, diferente do presente estudo, no

qual foram incluídas aleatoriamente. Segundo Fonseca (2007), os marcadores sorológicos auxiliam no diagnóstico da infecção do VHB.

O resultado obtido na pesquisa de Barros-Junior et al. (2008), em 51 pacientes da Amazônia brasileira resultou em uma positividade de 17,6% para DNA-VHB PCR gene S. Este resultado apresentou-se mais baixa do que no presente estudo.

Estudo realizado por Almeida et al. (2008), na vila de Cavunge, região semiárida do estado da Bahia, nordeste do Brasil, em 11 soros de pacientes com anti-HBc positivo, encontrou 18% de DNA-VHB PCR positiva.

De acordo com estudo de Motta-Castro et al. (2008), numa comunidade Afro-brasileira em Furnas dos Dionisios em Mato Grosso do Sul, Brasil, foram encontrados 24,7% de positividade em 239 amostras para DNA-VHB PCR gene S.

Os resultados dos diferentes estudos mencionados acima reafirmam que, no Brasil, a endemicidade do VHB é muito heterogênea.

Em países asiáticos, especialmente na China, a hepatite B é endêmica. Em estudo realizado na cidade de Hainan, relata positividade para DNA-VHB de 35,2% (LUO, et al., 1991). Em outro estudo na cidade de Tongji, foi encontrado prevalência de 30% para DNA-VHB (ZHANG et al., 1993).

Em Hong Kong foi realizada uma pesquisa em três grupos populacionais. No grupo I composto por 28 pacientes com cirrose criptogênica foi encontrada positividade de 32% para DNA-VHB PCR gene S. No grupo II não foi encontrado o DNA-VHB em 49 pacientes sem doença hepática. O grupo III constituído por 26 pacientes com cirrose hepática pelo VHB apresentou positividade de 54% para DNA-VHB PCR gene S (CHAN et al., 2002).

O continente Africano é considerado de alta prevalência para VHB (LEE, 1997). Estudo realizado por Mendy et al. (2006), em Gambia, o DNA-VHB foi detectado em 77% nos pacientes com HBeAg negativo e 100% naqueles que apresentavam HBeAg positivo.

Na literatura há um grande número de trabalhos usando os marcadores sorológicos nas populações indígenas. Dentre esses, destaca-se o trabalho de Braga et al. (2001), em sete grupos indígenas do Estado do Amazonas, no qual encontrou variação de infecção passada (anti-HBc) de 19,7% entre os Jamamadi a 78,6% entre os Kanamary e média de 54,5%. Nos portadores de HBsAg variou de 0 a 20,6% entre os Kanamary, Deni, Jamamadi, Mura-Pirahã e Paumari com média de 9,7%.

Outros estudos realizados entre populações nativas da Amazônia, mostraram taxas de soropositividade do HBsAg entre 0% a 31% (ALECRIM et al., 1986; BENSABATH et al., 1987; FONSECA, 1988; BRAGA et al., 1991). Nunes et al. (2007), também avaliaram a prevalência dos marcadores sorológicos do VHB nas comunidades indígenas Apyterewa e Xingu, do grupo Parakanã no Pará, Brasil. Na aldeia Apyterewa identificaram prevalência de infecção pregressa pelo VHB de 55,7% para anti-HBc total <sup>+</sup>/ anti-HBs<sup>+</sup> e 5,4% para HBsAg. No Xingu, a prevalência foi de 49,5% e 1,1%, respectivamente.

O Vale do Javari possui seis etnias contactadas com culturas não indígenas, são elas: Kanamary, Matis, Mayoruna, Marubo, Kulina e Korubo (FUNASA/BRASIL, 2008). No presente estudo constatou-se a prevalência de 54,4% de DNA-VHB para etnia Kanamary, Marubo 36,7% e outras etnias 100%.

Os Marubos foram contactados com culturas não indígenas há 150 anos e os Kanamary há 35 anos. O perímetro de fronteira entre o Brasil e Peru facilitou o acesso ao Vale do Javari, ocasionando a exploração ambiental e a disseminação de doenças (CIMI/BRASIL, 2010; UNIVAJA/BRASIL, 2010). É discutível se este fato poderá vir a ser elemento de propagação do VHB nas aldeias.

Estudos realizado por Braga et al. (2001); Ferraroni et al. (1982, apud FERREIRA et al., 2006), em diferentes tribos Amazônicas demonstraram que a infecção pelo VHB foi menos prevalente em população indígena com menor contato com culturas não-indígenas, o

que não foi observado no presente trabalho. Entretanto, vale ressaltar que a coleta das amostras no rio Curuçá em setembro/2009 coincidiu com a entrada da Influenza A (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) no Brasil, causando medo e desconfiança na anuência dos indígenas em participar da pesquisa, o que resultou na coleta de somente 55 amostras, o que poderia ter ocorrido viés de seleção, visto que a grande maioria dos Marubos viverem aldeados nesse rio.

Ao analisar os participantes do presente estudo quanto ao gênero, houve predomínio do sexo feminino, uma vez que as mulheres cuidam dos serviços domésticos e da roça, estando mais presentes nas aldeias e os homens ausentes, caçando ou fora da aldeia. O estudo de Viana et al. (2005), no oeste do Estado do Acre, Brasil, onde os participantes eram Ameríndios e não-Ameríndios, também se caracterizou por predomínio do sexo feminino em relação ao masculino.

No presente estudo, em relação ao resultado da PCR positiva para DNA-VHB, foi constatado que não houve diferença significativa entre os gêneros. Esse dado discorda de vários estudos que indicam a prevalência no sexo masculino (ALMEIDA et al., 2008; VICTORIA et al., 2008). Entretanto, a literatura tem apontado que essa diferença parece não estar relacionada à maior suscetibilidade do sexo masculino para aquisição da infecção, mas sim aos aspectos comportamentais adotados por esses indivíduos, tais como uso de drogas, promiscuidade e a não utilização de preservativos (PELEGRINI et al., 2007).

No estudo de Nunes et al. (2007), em população indígena, a ocorrência maior foi do sexo feminino, porém, o estado de portador e de previamente infectados pelo VHB foi mais frequente no masculino. Para os pesquisadores, os homens provavelmente estão mais expostos devido à maior frequência de viagens para fora da área indígena, às perfurações para utilização de adornos e ao consumo de álcool.

A transmissão do VHB se faz através de solução de continuidade (pele e mucosas); relações sexuais; exposição percutânea (parenteral) a agulhas ou outros instrumentos

contaminados; transfusão de sangue e hemoderivados; uso de drogas intravenosas; procedimentos odonto-médico-cirúrgicos, quando não respeitadas às regras de biosseguranças; transmissão vertical e contatos domiciliares (FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

Quanto à faixa etária dos participantes no presente estudo, revelou populações jovens indígenas com mediana de 23 anos de idade positivos para DNA-VHB PCR. Esse resultado demonstra que a transmissão sexual é significativa nessa população, que conta com indivíduos potencialmente transmissores, em idade sexualmente ativa. Vários estudos reforçam esse comportamento (CLEMENS et al., 2000; PAULA et al., 2001; OLIVEIRA, 2007).

Ao analisar as fontes de contágio, tem sido sugerido que a transmissão do VHB entre familiares é importante em áreas de alta endemicidade, pois segundo Szmunn et al. (1975, apud LOBATO et al., 2006), vários fatores estão relacionados a esse fato, tais como: partilhar acessórios de higiene pessoal, número de família, presença de mais de um portador de HBsAg entre os familiares, grau de replicação dos portadores e origem étnica.

O estudo de Lobato et al. (2006) em mulheres grávidas envolvidas no programa pré-natal no município de Rio Branco, Acre, Brasil, confirma a transmissão intrafamiliar do VHB entre irmãos, seguida de pais, parceiro sexual, filhos e o uso compartilhado de escova de dente. Nesse sentido, Brasil et al. (2003) comprovam em seu estudo que os irmãos são, provavelmente, os responsáveis pela disseminação e perpetuação do vírus na família.

Diversos trabalhos sugerem que em áreas endêmicas, uma das formas de transmissão do VHB seria, mecanicamente, por meio de mosquitos (IVERSSON et al., 1990; BRAGA et al., 2005). Nesse propósito, Chanteau et al. (1993) analisaram pools da fêmea do *Simulium buissoni* pela PCR para detectar DNA-VHB e a prevalência de lesões na pele de crianças vivendo na ilha de Naku-Hiva, na Polinésia Francesa. A fêmea adulta do *Simulium buissoni* alimenta-se de sangue, resultando em reações dolorosas e alérgicas no hospedeiro. De 45 pools testados (proveniente de 10 insetos), somente 3 foram positivos para DNA-VHB usando

gene X e S. Essa pequena quantia de DNA-VHB encontrada nos insetos não prova a hipótese da transmissão direta do VHB pelo inseto *Simulium buissoni*. Por outro lado, o inseto causa coceira na lesão e a contaminação pelo contato próximo entre crianças por meio de mãos e unhas dos dedos contaminados é outra provável explicação para transmissão indireta do VHB pelo inseto *Simulium buissoni* na ilha Naku-Hiva.

No presente estudo, não foi constatado nenhuma diferença estatística significativa em relação às fontes de contágio e o resultado da PCR (contato com pessoa suspeita de hepatite no grupo familiar, tatuagem, extração dentária, compartilhamento de roupa íntima, escova de dente, aparelho de barbear, ferimento na pele e afastamento da aldeia). Torna-se importante ressaltar que nem todas as variáveis foram respondidas no formulário aplicado aos participantes, talvez pela difícil logística na execução da pesquisa, associada à dificuldade de comunicação com os indígenas, o que resultou em um número inferior à totalidade, não espelhando as prováveis fontes de contágio do VHB, portanto, serão necessárias futuras investigações visando maiores esclarecimentos.

Vários estudos relatam aspectos clínicos como fatores de risco de infecção pelo VHB. No estudo de Barros-Junior et al. (2008), foram observadas associações significativas para a presença reativa do HIV e icterícia. De acordo com estudo de Victoria et al. (2008), as manifestações clínicas encontradas em pacientes com hepatite B foram dispepsia, fadiga e perda da libido, sendo que os sinais físicos foram esplenomegalia, eritema palmar e aumento do fígado. Entretanto, Almeida et al. (2008), não detectaram nenhum aspecto clínico anormal no referido estudo.

Na avaliação dos aspectos clínicos relacionados ao resultado da PCR para DNA-PCR, o presente estudo não apresentou significância estatística para as variáveis: mal-estar no corpo, náuseas, icterícia, dor do fígado, mialgia, atralgia e urina escura. Em contrapartida, a febre apresentou significância nos participantes que declararam apresentar esse sintoma com

PCR positiva (80%). A propósito, a febre sugere a ocorrência também de outras doenças febris, não sendo exclusiva da hepatite B. Na Amazônia, a infecção pelo VHB e pelo *Plasmodium* é muito comum, ocorrendo coinfeções (BRAGA et al., 2005). Estudo realizado por Viana et al. (2005), relata também associação de história de malária e icterícia.

No Vale do Javari a presença da malária é considerada de alta endemicidade (FUNASA/BRASIL, 2008; CIMI/BRASIL, 2010). Acreditamos que serão necessários outros estudos acerca das doenças as quais apresentam o mesmo quadro de febre, em especial os arbovírus, presentes na Amazônia. Fonseca et al. (2004) em estudo realizado em crianças e adolescentes do Estado do Amazonas no Norte do Brasil, reforça essa correlação, de que vírus hepatotrópico e arbovírus em áreas endêmicas estão associados a um risco substancial de insuficiência hepática fulminante.

Em área onde a hepatite B é altamente endêmica, o vírus é frequentemente transmitido durante a infância, seja através de mães portadoras para o recém-nascido, ou durante a gravidez ou parto. A chance de transmissão aumenta à medida que se aproxima o término da gravidez e é muito maior nas portadoras agudas do que nas crônicas (ROINGEARD et al., 1993).

No presente estudo, 75% das grávidas que participaram da pesquisa apresentaram-se positivas para DNA-VHB pela PCR. Esse resultado sugere a existência da transmissão vertical do VHB no Vale do Javari, infelizmente em nosso estudo não foi possível verificar a sua ocorrência, uma vez que não incluiu amostras de recém-nascidos e crianças, tendo amplitude somente de 11 a 77 anos de idade. O percentual de 75% de DNA-VHB encontrado nas gestantes revela a vulnerabilidade à infecção e à transmissão do vírus, apesar da disponibilidade da vacina contra a hepatite B.

A infecção pelo Vírus da Hepatite B (VHB) ocorre na infância em 40% dos casos e é assintomática em 90%. Quando a infecção é adquirida no período perinatal, o risco de cronicidade é de 70 a 90% (MELLO; PIMENTEL, 2004).

Kiesslich et al. (2003) estudaram 1.460 gestantes atendidas pelo programa pré-natal, no Estado do Amazonas, das 46 gestantes reativas para o HBsAg, 78,3% foram positivas para DNA-VHB PCR. O níveis de DNA-VHB foi superior a  $10^5$  cópias/ml em 4 gestantes (8,7%). Esse achado indica infecção ativa e risco potencial de transmissão vertical. No estudo de Pelegrini et al. (2007), no município de São Bernardo do Campo, São Paulo, a gravidez mostrou-se estatisticamente significativa na associação de fator de risco e a prevalência de infecção pelo VHB.

A vacinação contra a hepatite B é a maneira mais eficaz na prevenção de infecção aguda ou crônica, e também na eliminação da transmissão do vírus em todas as faixas etárias (CDC, 2002). Ela, porém, não se mostrou significativa no presente estudo. Apesar da FUNASA desenvolver ações de campanha de imunização no Vale do Javari (FUNASA/BRASIL, 2008), não foram suficientes para evitar a presença do DNA-VHB em 49,5% dos indígenas vacinados, esses dados convalidam a necessidade de promover e readequar o programa de vacinação contra a hepatite B no Vale do Javari.

No presente estudo, a prevalência do DNA-VHB nos rios Curuçá e Itaquaí foi de 43,6% e 54,4%, respectivamente. É interessante observar que as comunidades indígenas mais próximas à cidade de Atalaia do Norte apresentaram maiores índices, conforme constatado em Pedro Lopes (100%) no rio Curuçá e Bananeira (74,2%) no rio Itaquaí, sugerindo a influência dos fatores ambientais, geográficos e epidemiológicos, em especial o contato com populações circunvizinhas não indígenas na vinculação da disseminação do VHB. Vários estudos sustentam essa hipótese (BRAGA et al., 2001; QUINTERO et al., 2001; FERREIRA et al., 2006).

Mediante o exposto, os resultados comprovam a alta prevalência do DNA-VHB no Vale do Javari, tornando-se importante traçar estratégias de diagnóstico, controle e prevenção mais eficazes no combate à disseminação do VHB. É discutível se fatores ambientais, culturais, sociais, econômicos, genéticos, geográficos ou históricos possam ter alguma influência na transmissão do VHB no Vale do Javari.

Estudos futuros serão necessários para verificar a associação entre VHB e VHD, como também identificar os genótipos do VHB que circulam no Vale do Javari, a fim de avaliar melhor a associação entre o tipo de genótipo, evolução clínica da infecção, resposta ao tratamento e origem étnica.

## 7. CONCLUSÃO

7.1 Os resultados confirmam a alta prevalência de 51,1% do DNA-VHB nas comunidades indígenas dos rios Curuçá e Itaquai do Vale do Javari;

7.2 O aumento de prevalência do DNA-VHB em jovens de idade com mediana de 23 anos indica que a atividade sexual é uma significativa via de transmissão desse vírus, nessa população;

7.3 A presença da febre como aspecto clínico estatisticamente significante, não é restrito à infecção pelo VHB, o que sugere a ocorrência de outras doenças febris que necessitam ser esclarecidas;

7.4 A alta prevalência de 75% do DNA-VHB em gestantes sugere uma associação com a transmissão vertical;

7.5 A vacinação contra a hepatite B não apresentou significância estatística na população em estudo. Dentre os indígenas vacinados 49,5% apresentaram positivos para DNA-VHB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM, W. D.; MARREIROS, L. S.; ALECRIM, M. G. C.; SANTOS, M. I. K. F. Inquérito sobre presença de HBsAg em habitantes de Lábrea, Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 1, p.58-9, 1986.

ALLAIN, J. P. Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. **Vox Sang.**, v.86, p. 83-91, 2004.

ALMEIDA, D.; TAVARES-NETO, J.; TREPO, C.; ALMEIDA, A.; MELLO, C.; CHEMIN, I.; PARANA, R. Occult B infection in the brasilian northeastern region: a preliminary report. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n. 4, p.310-12, 2008.

AQUINO, J. A.; PEGADO, K. A.; BARROS, L. P.; MACHADO, L. F. A. Soroprevalência de infecções por vírus da hepatite B e vírus da hepatite C e indivíduos do Estado do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 334-7, 2008.

AZEVEDO, R. A.; SILVA, A. E.; FERRAZ, M. L. G.; MARCOPITO, L. F.; BARUZZI, R. G. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus da hepatite B e D em crianças das tribos Caiabi e Txucarramãe do Parque Indígena do Xingu, Brasil, Central. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p. 431-9, 1996.

BARROS-JUNIOR, G. M.; BRAGA, W. S. M.; OLIVEIRA, C. M. C.; CASTILHO, M. C.; ARAÚJO, J. R. Hepatite crônica B oculta: prevalência e aspectos clínicos em população de elevada endemicidade de infecção pelo vírus da hepatite B na Amazônia ocidental brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 596-601, 2008.

BENSABATH, G.; HADLER, S. C.; SOARES, M. C. P.; FIELDS, H.; DIAS, L. B.; POPPER, H.; MAYNARD, J. E. Hepatitis Delta virus infection and Labrea hepatitis. Prevalence and role in fulminant hepatitis in the Amazon basin. **JAMA**, v. 258, n. 4, p. 479-83, 1987.

BENSABATH, G.; CARTAGENES, P. R. B.; DIAS, L. B.; CRESCENTE, J. A. B.; MIRANDA, E. C. B. M. Hepatites por vírus. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup: UEPA, Instituto Evandro Chagas, 1997.

BRAGA, W. S. M.; BRASIL, L. M.; PANULA, M.; CARVALHO, J. A. B. Epidemiological aspects of hepatitis B virus (HBV) infection in children, Beruri, Amazonas. **Acta Hepatologica**, v. 1, p. 23, 1991.

BRAGA, W. S. M.; BRASIL, L. M.; SOUZA, R. A. B.; CASTILHO, M. C.; FONSECA, J. C. 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**, v. 34, n.4, p. 349-55, 2001.

BRAGA, W. S. M.; BRASIL, L. M.; SOUZA, R. A. B.; MELO, M. S.; ROSAS, M. D. G.; CASTILHO, M. C.; FONSECA, J. C. F. Prevalência da infecção pelos vírus da hepatite B

(VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio Purus, Estado do Amazonas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, n. 1, p. 35-46, 2004.

BRAGA, W. S. M.; SILVA, E. B.; SOUZA, R. A. B.; TOSTA, C. E. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo *plasmodium* em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 218-23, 2005.

BRASIL, L. M.; FONSECA, J. C. F.; SOUZA, R. B.; BRAGA, W. S. M.; TOLEDO, L. M. Prevalência de marcadores para o vírus da hepatite B em contatos domiciliares no Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 565-70, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Programa Nacional de hepatites virais: avaliação da assistência às hepatites virais no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002, 63 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de aconselhamento em hepatites virais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 816p.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. Diário Oficial da União 2 de maio de 2001. Decreto de 30.04.2001. **Homologa a demarcação administrativa da Terra Indígena Vale do Javari, localizada nos Municípios de Atalaia do Norte, Benjamin Constant, São Paulo de Olivença e Jutai, Estado do Amazonas**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Resenha/Maio\\_05.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Resenha/Maio_05.htm)>. Acesso em: 12 out. 2010.

CASTILHO, M. C. **Aspectos epidemiológicos e da biologia molecular da hepatite B em três comunidades da Amazônia Ocidental Brasileira**. Manaus: UEA, 2010. Projeto de tese para Qualificação (Doutorado em Doenças Tropicais e Infecciosas), Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, 2010.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). Guidelines for viral hepatitis surveillance and case management. Morbidity and mortality weekly report. **Recommendations and Reports**, june, p. 1-43, 2002.

CHANTEAU, S.; SECHAN, Y.; MOULIA-PELAT, JP.; LUQUIAUD, P.; SPIEGEL, A.; BOUTIN, JP.; ROUX, JF. The blackfly *Simulium buissoni* and infection by Hepatitis B virus on a Holoendemic Island of the Marquesas Archipelago in French Polynesia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 6, p. 763-70, 1993.

CHAN, H. LY; TSANG, S. WC.; LEUNG, N. WY.; TSE, CH.; PHIL, M.; HUI, Y.; TAM, J. SL.; CHAN, F. KL.; SUNG, J. JY. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence of HBV infection. **American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 5, p. 1211-5, 2002.

CHISARI, F. V. Viruses, Immunity, and Cancer: lessons from hepatitis B. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 4, 2000.

CIMI/BRASIL. Conselho Indigenista Missionário. **I Seminário: Saúde e Gestão territorial e Aproveitamento Sustentável do Vale do Javari**. Disponível em: <htm://www.cimi.org.br>. Acesso em: 02 abr. 2010.

CLEMENS, S. A. C.; FONSECA, J. C.; AZEVEDO, T.; CAVALCANTI, A.; SILVEIRA, T. R.; CASTILHO, M. C.; CLEMENS, R. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 2000.

COIAB/BRASIL. Coordenação das Organizações Indígenas da Amazônia Brasileira. **Carta SOS Javari dos povos Indígenas do Vale do Javari**. Disponível em: <htm://www.coiab.com.br>. Acesso em: 02 abr. 2010.

COSER, T. B.; CHESKY, M.; PARIS, F.; BARTH, A. L.; SCHMITT, V. M.; MACHADO, A. B. M. P. Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de PCR “Nested” para o vírus da hepatite B (HBV). **Rev. HCPA**, v. 28, n. 1, p. 5-9, 2008.

DATTA, S.; BANERJEE, A.; CHANDRA, P. K.; CHAKRABORTY, S.; BASU, S. K.; CHAKRAVARTY, R. Detection of a premature stop codon in the surface gene of hepatitis B virus from an HBsAg and antiHBc negative blood donor. **Journal of Clinical Virology**, v. xxx, p. 1-4, 2007.

DIAS, A. L. B. **Caracterização molecular do vírus da hepatite B (VHB) em portadores de área endêmica na Amazônia Ocidental Brasileira**. Manaus: UEA, 2009. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas), Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, 2009.

EL KHOURI, M.; SANTOS, V. A. Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. **Revista do Hospital das Clínicas, São Paulo**, v. 59, n.4, p. 216–24, 2004.

EPI-INFO, **Versão 3.5.1 for Windows**. Disponível em: <www.cdc.org/epiinfo>. Acesso em: 20 ago. 2010.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, C. T. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473- 87, 2004.

FERREIRA, A.; GRECA, D.; TAVARES, E.; MORIYA, Y.; SPELLING, F.; BOEIRA, M.; SANTOS, S.; MESSIAS-REASON, I. Soroepidemiologia da hepatite B e C em índios Kaingang do Sul do Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 20, n. 4, p.230-5, 2006.

FERRARI, J. O.; FERREIRA, M. U.; TANAKA, A.; MIZOKAMI, M. The seroprevalence of hepatitis B and C in an Amerindian population in the southwestern Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 3, p. 299-302, 1999.

FOCACCIA, R. Hepatites virais. In: VERONESI, R.; \_\_\_\_\_. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FONSECA, J. C. F. Epidemiologia das hepatites B e Delta na região Amazônica. **Skopia**, v. 23, p. 28-32, 1988.

FONSECA, J. C. F.; BRASIL, L. M.; CASTILHO, M. C.; SOUZA, R. A. B.; BRAGA, W. S. M. The occurrence of increased rates of HAV, HBV and HDV infection in a isolated village, Ipixuna, Amazonas, Brasil. **Hepatology**, v. 19, p. 631, 1994.

FONSECA, J. C. F.; SOUZA, R. A. B.; BRASIL, L. M.; ARAÚJO, J. R.; FERREIRA, L. C. L. Fulminant hepatic failure in children and adolescents in Northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p.67-9, 2004.

FONSECA, J. C. F. História natural da hepatite crônica B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 672-7, 2007.

FUNAI/BRASIL. Fundação Nacional do Índio. **Etnias indígenas**. Disponível em: <htm://www.funai.gov.br/índios/fr\_conteudo.htm>. Acesso em: 07 fev. 2010.

FUNASA/BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim Informativo Especial**, abril, 2008.

FUNASA/BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Distritos Sanitários**. Disponível em: <htm://www.funasa.gov.br:portal;detalhe\_dsei.asp?strcddsei=12>. Acesso em: 20 fev. 2010.

FVS/BRASIL. Fundação de Vigilância em Saúde. **SINAN NET2008/AM**, agosto, 2010.

GONÇALVES-JUNIOR, F. L. Hepatite B. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

HOLLINGER, F. B. Hepatitis B virus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields virology**, 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001.

IVERSSON, L. B.; GRANATO, C. F. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; PANNUTI, C. S. Relationship between the prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and arbovirus in fishermen from the Ribeira Valley, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 215-20, 1990.

KARASAWA, T.; AIZAWA, Y.; ZENIYA, M.; KURAMOTO, A.; SHIRASAWA, T.; TODA, G. Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and interferon-induced seroconversion. **Journal Medical Virology**, v. 45, n. 4, p. 373-80, 1995.

KIESSLICH, D.; FRAIJI, N. A.; CRISPIM, M. A.C.; PEREIRA, F. R.; MARTINHO, A. C.; CAMPELLO, S. C. C.; ALMEIDA, T. A.; VÁSQUEZ, L. S. Prevalência de marcadores sorológicos e moleculares do vírus da hepatite B em gestantes do Estado do Amazonas, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 3, p. 155-64, 2003.

LEE, W. M. Hepatitis B virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 24, p.1733-45, 1997.

LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p.13-21, 2009.

LOBATO, C.; TAVARES-NETO, J.; RIOS-LEITE, M.; TREPO, C.; VITVITSKI, L.; PARVAZ, P.; ZOULIM, F.; D'OLIVEIRA-JUNIOR, A.; PARANÁ, R. Intrafamilial prevalence of hepatitis B virus in Western Brazilian Amazon region: Epidemiologic and biomolecular study. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 21, p.863-8, 2006.

LUO, K. X.; ZHOU, R.; HE, C.; LIANG Z. S.; JIANG, S. B.; Hepatitis B virus DNA in serum of virus carriers positive exclusively for antibodies to the hepatitis B core antigen. **Journal of Medical Virology**, v. 35, p. 55-9, 1991.

MARINHO, C.; AGOSTINHO, C. Hepatite B. Hepatites Víricas, Edição: **Núcleo de Gastroenterologia dos Hospitais Distritais**, 46-91, 2003. Disponível em: <[htm://www.aidsportugal.com/hepatites](http://www.aidsportugal.com/hepatites)>. Acesso em: 29 abr. 2010.

MELO, L. C.; PIMENTEL, R. C. B. Hepatite B. In: MARGOTTO, P. R. **Assistência ao recém-nascido de risco**. 2. ed., 2004. Disponível em: <<http://www.paulomargotto.com.br/livro.php>>. Acesso em: 15 nov. 2010.

MENDY, M. E; KAYE, S; VAN DER SANDE, M.; RAYCO-SOLON, P.; WAIGHT, P. A.; SHIPTON, D.; AWI, D.; SNELL, P.; WHITTLE, H; MCCONKEY, S. Application of real-time PCR to quantify hepatitis B virus DNA in chronic carriers in The Gambia. **Virology Journal**, v. 3, n. 23, 2006.

MOTTA-CASTRO, A. R. C.; MARTINS, R. M. B.; ARAUJO, N. M.; NIEL, C.; FACHOLI, G. B.; LAGO, B. V.; MELLO, F. C. A.; GOMES, S. A. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in an isolated Afro-Brazilian community. **Archives of Virology**, v. 153, p. 2197-205, 2008.

NUNES, H. M.; MONTEIRO, M. R. C. C.; SOARES, M. C. P. Prevalência dos marcadores sorológicos dos vírus das hepatites B e D na área indígena Apyterewa, do grupo Parakanã, Pará, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2756-66, nov, 2007.

OLIVEIRA, C. M. **Análise molecular e implicações biológicas do vírus da hepatite B, em pacientes naturais do Estado do Amazonas**. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; FARIAS, I. P.; FONSECA, J. C. F.; BRASIL, L. M.; SOUZA, R.; ASTOLFI-FILHO, S. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian. **Archives of Virology**, v. 153, p. 823-30, 2008.

PAULA, V. S.; ARRUDA, M. E.; VITRAL, C. L.; GASPARG, A. M. C. Seroprevalence of viral hepatitis in riverine communities from the Western region of the Brazilian Amazon Basin. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 96, n. 8, 2001.

PELEGRINI, A.; BARBANERA, E. E.; GONÇALVES, F. B. Incidência da infecção e de fatores de risco para os vírus das hepatites B e C em diferentes populações e a associação com diagnóstico sorológico, bioquímico e molecular. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, n. 3, p. 32-8, 2007.

PERRENOUD, B. A. F. **Morte por hepatite viral aguda no município de São Paulo: subsídio à vigilância epidemiológica**. São Paulo: USP, 1995. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 1995.

PRADO, K. D. Insuficiência hepática aguda grave. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

QUINTERO, A.; UZCATEGUI, N.; LOUREIRO, C. L.; VILLEGAS I.; ILLARRAMENDI, X.; GUEVARA, M. E. Hepatitis delta vírus genotypes I and III circulate associated with hepatitis B vírus genotype F in Venezuela. **Journal Medical Virology**, v. 64, p. 356-9, 2001.

RÁCZ, M. L.; CANDEIAS, J. A. N. Hepatites virais. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008a.

RÁCZ, M. L. Diagnóstico laboratorial das infecções virais. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008b.

RAIMONDO, G.; POLLICINO, T; CACCIOLA, I.; SQUADRITO, G. Occult hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 46, p. 160-70, 2007.

ROINGEARD, P.; DIOUF, A.; MBOUP, S.; DIADHIOU, F.; ESSEX M. Perinatal transmission of hepatitis B vírus in Senegal. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, 1993, Tokyo. **Abstract**. Tokyo, 1993, p. 143.

RONCATO, M.; BALLARDIN, P. A. Z.; LUNGE V. R. Influência dos genótipos no tratamento da hepatite B. **Rev. HCPA**, v. 28, n. 3, p.188-93, 2008.

SILVA, C. M. D.; NIEL, C. Hepatite B. In: ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. **Doenças Infeciosas: diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SILVA, L. C.; PINHO, J. R. R. Hepatite B. In: GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V. A. F. **Doenças do fígado e vias biliares**. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

UNIVAJA/BRASIL. União dos Povos Indígenas do Vale do Javari. **Atalaia do Norte**. Disponível em: <[htm://www.feis.unesp.br/grupos-associacoes/civaja/index.html](http://www.feis.unesp.br/grupos-associacoes/civaja/index.html)>. Acesso em: 21 mar. 2010.

VICTORIA, F. S.; OLIVEIRA, C. M. C.; VICTORIA, M. B.; VICTORIA, C. B.; FERREIRA, L. C. L. Characterization of HBeAg-Negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n. 1, p.27-37, 2008.

VIANA, S.; PARANÁ, R.; MOREIRA, R. C.; COMPRI, A. P.; MACEDO, V. High prevalence of hepatitis B vírus and hepatitis D virus in the western brazilian amazon. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p.808-14, 2005.

VIEIRA, S. **Bioestatística, tópicos avançados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

ZHANG, Y. Y.; HANSSON, B. G.; KUO, L. S.; WIDELL, A.; NORDENFELT, E. Hepatitis B virus DNA in serum and liver is commonly found in Chinese patients with chronic liver disease despite the presence of antibodies to HBsAg. **Hepatology**, v. 17, n. 538-44, 1993.

## APÊNDICE 1: Formulário

Projeto: Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B em população indígena do Vale do Rio Javari no Estado do Amazonas.

Formulário Localidade(GPS): \_\_\_\_\_ Data: / /

### I. Identificação do participante

1. Nome: \_\_\_\_\_ 2. Sexo: Masc.(  ) Fem.(  )
3. Idade: \_\_\_\_\_ 4. Naturalidade: \_\_\_\_\_
5. Endereço: \_\_\_\_\_
6. Tempo em que vive nesse local: \_\_\_\_\_

### II. Busca de fontes de contágio

1. Tem contato com alguém com suspeita de hepatite? Sim (  ) Não (  ) Não sabe (  )
2. No seu grupo familiar tem alguma pessoa com suspeita de hepatite? Sim (  ) Não (  ) Não sabe (  ).
3. Se sim. Qual o parentesco? Companheiro (  ) Pai (  ) Mãe (  ) Filho(a) (  )
4. Tem tatuagem? Sim (  ) Quanto tempo? \_\_\_\_\_ Fez aqui na aldeia? Sim (  ) Não (  ). Onde fez? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_
5. Fez extração dentária? Sim (  ) Não (  ). Foi feita aqui na aldeia? Sim (  ) Não (  ). Onde foi feita \_\_\_\_\_ Há quanto tempo? \_\_\_\_\_
6. Já raspou os cabelos da cabeça? Sim (  ) Não (  ). É seu costume? Sim (  ) Não (  )
7. Compartilha um dos seguintes objetos?  
Roupa íntima: Sim (  ) Não (  ). Escova de dente: Sim (  ) Não (  ).  
Aparelho de barbear: Sim (  ) Não (  ).
8. Tem ferimento freqüente na pele? Sim (  ) Não (  ).  
Qual o motivo ? (tipo de trabalho) \_\_\_\_\_
9. Já se afastou da sua aldeia por algum tempo? Sim (  ) Não (  ). Pode dizer para onde foi e quanto tempo ficou fora? Tempo: \_\_\_\_\_. Local: \_\_\_\_\_
10. Em caso de ser mãe: Quantos filhos tem? \_\_\_\_\_. Algum tem suspeita de hepatite? Sim (  ) Não (  ). Como ficou sabendo que era hepatite B? Avaliação clínica? Sim (  ) Não (  ). Se sim. Desde quando tem essa informação? \_\_\_\_\_. Quem fez esse diagnóstico clínico? \_\_\_\_\_

### III. Aspectos clínicos no momento da coleta da amostra

1. Febre: Sim (  ) Não (  ). Grávida? Sim (  ) Não (  ). Quantos meses? \_\_\_\_\_
2. Seu companheiro tem ou é suspeito de ter hepatite? Sim (  ) Não (  ) Não sabe (  ) Suspeito(  ).
3. Foi vacinado (a) contra hepatite B? Sim (  ) Não (  ) Não lembra (  )
4. Mal estar no corpo? Sim (  ) Não (  ). Náuseas: Sim (  ) Não (  ). Sinais de icterícia? Sim (  ) Não (  ).
5. Queixa de dor na região do fígado? Sim (  ) Não (  ). Mialgias? Sim (  ) Não (  ). Atralgia: Sim (  ) Não (  ). Exantema: Sim (  ) Não (  ).
6. Cor da urina: escura pela manhã? Sim (  ) Não (  ). Há quanto tempo? \_\_\_\_\_  
Cor das fezes: não escura? Sim (  ) Não (  ). Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

## ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre Esclarecido

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Estratégia de apresentação dessa atividade:** Será apresentado um cartaz contendo uma imagem em que uma técnica está procedendo à coleta em um dos braços de um rapaz. Será feita uma explicação por um técnico designado pela Federação dos Povos Indígena-FEPI, que explicará os procedimentos mínimos necessários para a obtenção da amostra sanguínea em uma linguagem simples e a mais correspondente à cultura da comunidade. Após essa apresentação, o técnico da FEPI, fará a leitura do seguinte documento, estando presente o pesquisador responsável.

Eu, Cristovão Alves da Costa pesquisador do Instituto de Pesquisa da Amazônia, do Laboratório de Virologia e Imunologia, venho me apresentar ao Sr. Maior de idade e responsável pela pessoa menor de idade, residente aqui na sua comunidade e pedir sua autorização para coletar um pouco de seu sangue. Esse sangue será usado para ajudar nas pesquisas de vírus do Projeto de Pesquisa “**Epidemiologia Molecular do Vírus da Hepatite B em População Indígena do Vale do Rio Javari no Estado do Amazonas**”. Se o Sr. autorizar esta coleta, será feito um exame no seu sangue para procurar o vírus que causa a doença chamada hepatite. A parte do sangue que não for usada será guardado no Laboratório de Virologia e Imunologia do INPA em Manaus-AM, somente até o final desse projeto, por possível necessidade de se confirmar o resultado do exame. Depois de terminado o projeto o seu sangue não será usado em mais nada de nossa pesquisa. A coleta de 5 ml de sangue será realizada em uma veia de um dos braços, fazendo possivelmente, uma leve dor quando se fura com a agulha – que é estéril (não leva nenhum bicho para dentro do seu corpo) – da seringa no ato da coleta, como um espinho na sua pele, podendo fazer uma pequena mancha roxa que desaparece em 3 a 4 dias. Antes de se fazer à coleta do sangue, precisamos que o Sr. responda perguntas sobre a sua vida do dia-a-dia aqui e fora da sua comunidade. O Sr. só responde a pergunta que o Sr. quiser responder. O Sr. concorda em responder as perguntas do nosso formulário? Se não, podemos ter, com sua permissão só o seu sangue na pesquisa.

**Risco:** Não tem risco do Sr. ficar doente por causa da retirada dessa quantidade de sangue, não vai entrar doença no seu corpo por causa disso.

**Benefícios:** 1) O sangue doado pelo Sr. vai ajudar a saber quantas pessoas da sua comunidade está com o bichinho (vírus da hepatite B) que está causando a doença conhecida como hepatite. Vamos informar aos seus líderes comunitário e esses vão levar essas informações para a FEPI e FUNAI, que providenciarão encaminhamento de tratamento para as pessoas que estiverem com a doença hepatite (Conforme a FEPI se responsabilizou – Termo de Anuência Prévia, Esclarecida, Livre e Informada, item 9.2).

Mesmo após sua autorização, terá o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, independente do motivo e sem nenhum prejuízo de atendimento clínico. Você, não terá nenhuma despesa e também não receberá pagamento nenhum por isso. A sua participação ajudará os pesquisadores a saber se o vírus que causa a doença hepatite do tipo B está presente em sua comunidade. O resultado laboratorial será enviado à Fundação Estadual dos Povos Indígenas – que se responsabilizará pelo envio aos órgãos responsáveis pelos serviços de saúde indígena que deverão proceder com o tratamento,

à Associação Marubo de São Sebastião (AMAS) ao CIVAJA, à FUNAI e ao líder de sua comunidade que deverá informar ao participante da pesquisa.

Os resultados da pesquisa serão analisados e divulgados, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato comigo pelo telefone (92) 3643-3288, de segunda a sexta-feira, das 8:45 às 17:45, ou por meio de um computador ligado na rede internet no e-mail: crvcosta@inpa.gov.br. O Sr(a) ficará com uma cópia impressa do seu consentimento.

**Consentimento Após-informação**

Eu, (nome do participante adulto ou nome do responsável por menor) \_\_\_\_\_, por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante adulto ou responsável por menor  
Ou impressão do polegar caso não saiba assinar

I

impressão  
datiloscópica (p/ não  
alfabetizado)

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável pelo projeto  
Cristóvão Alves da Costa  
INPA/CPCS: Lab. de Virologia

## ANEXO 2: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

### PARECER Nº 216/2009

**Registro CONEP: 15276** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Registro no CEP: 189/2008**

**Processo nº 25000.016051/2009-21**

**Projeto de Pesquisa:** "Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B em população indígena do vale do rio Javari no Estado do Amazonas".

**Pesquisador Responsável:** Cristovão Alves da Costa

**Instituição:** Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

**CEP de origem:** CEP; INPA

**Área Temática Especial:** População indígena

**Patrocinador:** Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde/ Organização Panamericana de Saúde.

#### Sumário Geral do Protocolo

Esta pesquisa tem por objetivo traçar um perfil epidemiológico sobre a prevalência do vírus da hepatite B na população do vale do rio Javari que se localiza a oeste do estado do Amazonas e tem uma população indígena estimada em 3.200 pessoas, divididas em 5 povos distintos culturalmente e pertencentes às etnias Mayoruna, Matis, Kanamari, Marubo e Korubo.

No Estado do Amazonas, a infecção pelo vírus das hepatites e suas seqüelas clínicas, representam um dos mais sérios problemas de Saúde Pública. Ao considerar que populações isoladas ou geograficamente distantes dos centros urbanos necessitam de atenção quanto ao estado de infecção pelo vírus da hepatite tipo B, este projeto de pesquisa se propõe a detectar por meio de técnica de biologia molecular no soro humano o vírus da hepatite B em amostra populacional de cada etnia do vale do rio Javari e apresentar aspectos epidemiológicos da ocorrência do vírus da hepatite nessa mesma a população.

Trata-se de um estudo transversal, prospectivo, qualitativo com amostragem probabilística estimada em 279 amostras de soro humano. Participarão da pesquisa adultos e crianças de ambos sexos que apresentarem, no momento da visita, quadro clínico suspeito para a doença hepatite viral tipo B. Serão excluídas pessoas sem suspeita da doença. Antes da coleta da amostra de sangue será aplicado um questionário com dados de identificação pessoal e história clínica de cada participante da pesquisa. O questionário será aplicado pela técnica de enfermagem da associação indígena, que utilizará linguagem em que as pessoas indígenas possam entender. Os dados obtidos por meio desse questionário serão organizados em um banco de dados que gerará dados epidemiológicos sobre a população em estudo. O modelo do questionário encontra-se anexado ao projeto.

As amostras de sangue de 5ml serão colhidas por punção venosa, usando-se seringa com volume de 10ml com agulha correspondente e de acordo com o perfil físico corporal de cada pessoa participante. Todos os procedimentos laboratoriais encontram-se descritos e esclarecidos que o único propósito das amostras de sangue será o de determinar a presença ou não do vírus da Hepatite B, e após o registro dos resultados, essas amostras serão destruídas por meio de autoclavagem esterilizante e descartadas biologicamente. Outro aspecto constante do projeto é que os indígenas que apresentarem positividade para o vírus da hepatite B serão encaminhados para tratamento junto ao órgão responsável pela promoção da saúde indígena – FUNASA.

Continuação do Parecer Conep 216/09.

### Local de Realização

A pesquisa será realizada, no vale do rio Javari, localizado a oeste do estado do Amazonas, nas aldeias das etnias Mayoruna, Matis, Kanamari, Marubo e Korubo estando prevista a realização de cinco vistas do pesquisador para o trabalho de campo.

### Apresentação do Protocolo

O Projeto de pesquisa encontra-se muito bem estruturado. A folha de rosto encontra-se preenchida e assinada. O cronograma prevê um período de quatro anos de duração, com início previsto para fevereiro de 2009. O orçamento apresentado estima um investimento no valor de R\$ 143.211,80 (cento e quarenta e três mil, duzentos e onze reais e oitenta centavos), financiamento aprovado pelo MS/FUNASA- Organização Panamericana de Saúde.

• Como prováveis benefícios está previsto que as comunidades dos povos Mayoruna, Marubo, Matis, Kulina e Kanamari receberão subsídios para a implementação de programas de interrupção da transmissão da hepatite B, uma vez que será detectada a enfermidade e as pessoas acometidas serão indicadas para tratamento nos órgãos de saúde. Também, será produzido um relatório direcionado às autoridades de saúde para que possam implementar ações referentes a atenção da hepatite B nas diversas comunidades no Vale do Javari e será elaborado um banco de dados das pessoas infectadas, que facilitará a veiculação do tratamento da hepatite B pelos órgãos de saúde. Quanto aos riscos, particularmente, são admissíveis dificuldades e limitações da região e conflitos locais, mas poderão ser minimizados através de consultas constantes às comunidades indígenas, sobretudo, as lideranças locais e regionais, a fim de fortalecer a colaboração das mesmas no projeto.

O modelo de TCLE apresentado está redigido em linguagem clara e objetiva e o conteúdo contempla as informações essenciais sobre a pesquisa, portanto atende os requisitos éticos previstos nas Resoluções CNS 196/1996 e 301/2000.

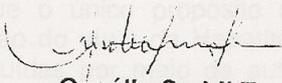
Acham-se anexados ao projeto os seguintes documentos: Parecer do CEP de aprovação do projeto de pesquisa e uma carta esclarecendo a função de pesquisador como vice coordenador do CEP, mas se ausentou por ocasião da apreciação do seu projeto de pesquisa; termo de anuência prévia devidamente assinado pelas lideranças indígenas das diferentes etnias envolvidas na pesquisa.

**Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a seguinte recomendação:**

- Que o Comitê de Ética em Pesquisa providencie junto ao pesquisador, e aprecie antes do início do estudo, a apresentação de um novo cronograma atualizado da pesquisa, estabelecendo data de início e conclusão.

**Situação : Projeto aprovado com recomendação**

Brasília, 24 de abril de 2009.

  
**Gyséle Saddi Tannous**  
 Coordenadora da CONEP/CNS/MS

### ANEXO 3: Comitê de Ética e Pesquisa – CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS COM SERES HUMANOS

### IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO

Protocolo de Pesquisa nº:	189/08	Data de entrada:	20/10/08
Título do Projeto:	Epidemiologia molecular do vírus da hepatite B em população indígena do vale do Rio Javari no Estado do Amazonas.		
Áreas do Conhecimento:	4. Ciências da Saúde		
Grupo Temático:	Grupo I - I.6 Populações Indígenas		
Data de Início:	02/2009	Data de Término:	08/2010
		Valor Orçamento:	RS 143.211,80
Pesquisador Responsável:	Cristóvão Alves da Costa		
Financiamento:	Não:	Sim:	x
		Órgão:	MS/FNS/OPS
Currículos no CNPq:	todos		
Currículos anexos ao Projeto:	do pesquisador		
Instituição Responsável:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA		
Resumo do Projeto:	<p>Esta pesquisa tem como objetivo traçar um perfil epidemiológico sobre a prevalência do vírus da hepatite B na população do vale do rio Javari que se localiza a oeste do estado do Amazonas e tem uma população indígena do vale do rio Javari que se localiza a oeste do estado do Amazonas, estimada em 3.200 pessoas divididas em 5 povos distintos culturalmente. São das etnias Mayoruna, Matis, Kanamari, Marubo e Korubo. Para esse estudo pretende-se fazer uma viagem para aldeias das diferentes etnias, totalizando cinco viagens ao longo do projeto. Serão colhidas amostras de sangue de cada etnopopulação e estas serão submetidas a um diagnóstico laboratorial de vírus por meio de métodos de biologia molecular. Os trabalhos de pesquisa viral serão desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Imunologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Também farão parte dessa pesquisa a Fundação Estadual dos Povos Indígenas - FEPI, que tratará das necessidades operacionais para a implantação deste projeto. Os dados obtidos formarão um diagnóstico geral da população em relação a prevalência do vírus da hepatite B na área de estudo.</p>		
Objetivos (conforme Projeto de Pesquisa)			
<b>4. OBJETIVOS, METAS E INDICADORES QUANTITATIVOS PARA CADA META (acrescentar ou excluir linhas conforme necessidade).</b>			
OBJETIVOS	METAS	Indicador Quantitativo	
Objetivo Geral: Pesquisa epidemiológica sobre o vírus da hepatite B em amostra populacional de etnia indígena dos povos habitantes dos vales dos rios Javari, Jaquirana, Ituí, Curuçá e Itaqui no estado do Amazonas, Brasil.			
1. Detectar por meio de técnica de	1. Detectar o vírus da hepatite tipo B em uma	Índice de	

biologia molecular no soro humano o vírus da hepatite B em amostra populacional de cada etnia do vale do rio Javari.	amostra da população ou em toda a população de cada etnia dependendo da quantidade de pessoas residentes no local.	Percentual atingido.
	2. Registro do perfil clínico da população no momento da visita para coleta de amostra sanguínea dos participantes da pesquisa.	Índice de Percentual atingido.
2. Apresentar aspectos epidemiológicos da ocorrência do vírus da hepatite na população do vale do rio javari.	1. Apresentar perfil da ocorrência do vírus da hepatite tipo B nas etnias formadoras da população do vale do Javari, AM.	Índice de Percentual atingido.

### PARECER FINAL

Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo de pesquisa teve a indicação de **APROVAÇÃO**.

Indicação: Aprovar

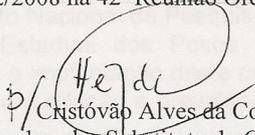
**Comentários:**

O projeto é de extrema relevância científica como também ao que se refere a implementação de políticas públicas voltadas para Saúde Indígena. Na região do vale do javari várias etnias indígenas sofrem com a infecção e seqüelas causadas pelo vírus da Hepatite tipo B. O pesquisador tem o termo de anuência das associações e comunidades das Etnias envolvidas que estão interessadas no desenvolvimento desta pesquisa e reconhece todos os procedimentos éticos tomados para garantir o resultado esperado da mesma (uma enfermeira indígena daquela região fará parte da equipe); Ressalta-se ainda todo um cuidado que o pesquisador teve na elaboração dos termos de consentimento. O protocolo está em de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares.

Informo-lhe que deverá apresentar ao CEP-INPA, ao final da pesquisa, cópia do produto fim do projeto, que servirá como relatório de conclusão da pesquisa. Assim, e conforme cronograma apresentado no protocolo, solicita-se que o mesmo seja entregue até novembro de 2010.

Data de liberação do Parecer: 05/12/2008 na 42ª Reunião Ordinária do CEP-INPA.

Atenciosamente,

  
Cristóvão Alves da Costa  
Coordenador Substituto do CEP-INPA  
PO nº 313/2004