



Artigo de Revisão/Review Article

Histórico das hepatites virais

History of viral hepatitis

José Carlos Ferraz da Fonseca¹

RESUMO

Introdução: A história das hepatites virais remonta milhares de anos e é fascinante. Quando o ser humano sofreu pela primeira vez a invasão do seu organismo por tais agentes, iniciou-se um ciclo natural e repetitivo capaz de infectar bilhões de seres humanos, dizimar e seqüelar milhares de vida. **Métodos:** Este artigo rever informações científicas disponíveis sobre o histórico das hepatites virais. Todas as informações foram obtidas através de extensa revisão bibliográfica, compreendendo artigos originais e de revisão e consultas na rede internet. **Resultados:** Existem relatos de surtos de icterícia epidêmica na China há mais de 5.000 anos e na Babilônia, há mais de 2.500 anos. A história catastrófica das grandes epidemias ou pandemias ictericas são conhecidas e geralmente estão associadas às grandes guerras. Na guerra da Secessão Americana, 40 mil casos ocorreram entre militares da União. Em 1885, um surto de icterícia catarral acometeu 191 trabalhadores do estaleiro de Bremen (Alemanha) após vacinação contra varíola. Em 1942, 28.585 soldados contraíram hepatite após inoculação da vacina contra a febre amarela. O número de casos de hepatite durante a Segunda Grande Guerra foi estimado em 16 milhões. Somente no século XX, foram identificados os principais agentes causadores das hepatites virais. O vírus da hepatite B foi o primeiro a ser descoberto. **Conclusões:** Neste artigo, a revisão da história das grandes epidemias ocasionadas pelos vírus das hepatites e a descoberta desses agentes revelam singulares peculiaridades, citando como exemplo, a descoberta acidental ou por acaso dos vírus da hepatite B e D.

Palavras-chaves: Histórico. Hepatites virais. Descobridores.

ABSTRACT

Introduction: The history of viral hepatitis goes back thousands of years and is a fascinating one. When humans were first infected by such agents, a natural repetitive cycle began, with the capacity to infect billions of humans, thus decimating the population and causing sequelae in thousands of lives. **Methods:** This article reviews the available scientific information on the history of viral hepatitis. All the information was obtained through extensive bibliographic review, including original and review articles and consultations on the internet. **Results:** There are reports on outbreaks of jaundice epidemics in China 5,000 years ago and in Babylon more than 2,500 years ago. The catastrophic history of great jaundice epidemics and pandemics is well known and generally associated with major wars. In the American Civil War, 40,000 cases occurred among Union troops. In 1885, an outbreak of catarrhal jaundice affected 191 workers at the Bremen shipyard (Germany) after vaccination against smallpox. In 1942, 28,585 soldiers became infected with hepatitis after inoculation with the yellow fever vaccine. The number of cases of hepatitis during the Second World War was estimated to be 16 million. Only in the twentieth century were the main agents causing viral hepatitis identified. The hepatitis B virus was the first to be discovered. **Conclusions:** In this paper, through reviewing the history of major epidemics caused by hepatitis viruses and the history of discovery of these agents, singular peculiarities were revealed. Examples of this include the accidental or chance discovery of the hepatitis B and D viruses.

Key-words: History. Viral hepatitis. Discoverers.

INTRODUÇÃO

A história das hepatites virais remonta vários milênios. Informações contidas na literatura chinesa já faziam referência à ocorrência de icterícia entre sua população há mais de cinco mil anos^{1,2}. Surtos de icterícia foram relatados na Babilônia há mais de 2.500 anos^{1,2}. Escritos de Hipócrates, que viveu provavelmente 300 a 400 anos antes de Cristo, revelam historicamente que: a icterícia seria provavelmente de origem infecciosa e o problema poderia estar no fígado; o acúmulo de líquido no abdome (ascite) poderia ser causado por alguma doença crônica nesse órgão³.

No ano de 752, carta do Papa Zacharias a São Bonifácio, Arcebispo de Mainz (Alemanha), relata à ocorrência de um surto de icterícia contagiosa entre residentes da cidade^{1,2}. Informa ainda que estava recomendando quarentena aos moradores ictericos, como forma de evitar a doença^{1,2}.

São conhecidas as epidemias de icterícia durante a guerra da Sucessão Austríaca (1743), de Napoleão no Egito (1798), Franco-Prussiana (1870) e Secessão Americana (1861-1865)^{1,2}. Durante a guerra da Secessão Americana, mais de 40.000 soldados dos exércitos da União foram atingidos².

Antes do início do século XIX, os relatos sobre a história das hepatites no Brasil são escassos, todavia no museu de Porto Velho - Rondônia, hoje desativado, encontrava-se uma urna funerária confeccionada pelos índios Aruak que habitaram esta região no período da descoberta do Brasil, ou seja, há mais de 500 anos atrás. A urna funerária de barro cozido representava um nativo pertencente à família Aruak e revela do ponto de vista médico alguns sinais e estigmas de cirrose hepática, tais como: ascite, umbigo protuso pelo aumento do volume abdominal (hérnia umbilical), ginecomastia e aranhas vasculares. Seria o primeiro registro antropológico sobre a doença *cirrose hepática de provável etiologia viral* no Brasil?

Somente no século XVIII foi introduzido pela primeira vez o termo *hepatite* por Bianchi JB, no clássico trabalho científico denominado *Historia hepatica sem Thoria et praxis omnius morborum hepatitis et bilis*, publicado em 1725².

1. Ex-Professor, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

Endereço para correspondência: Dr. José Carlos Ferraz da Fonseca. Rua Soure Q/9, C/1, Bairro Dom Pedro, 69040-570 Manaus, AM.

Telefone: 55 92 3238-4448

e-mail: drjcfonseca@gmail.com

Recebido para publicação em 25/05/2009

Aceito em 06/04/2010

Em maio de 1735, uma expedição com três dignitários da Academia Real de Ciências de Paris partiu da cidade luz com destino a Cidade de Quito (Equador) e aportando em Quito, antiga vice-república do Peru, em junho de 1736^{2,4}. A referida expedição tinha como finalidade verificar a forma da terra. Vários membros da expedição morreram em consequência das doenças tropicais, principalmente de malária⁴. Um desses dignitários, chamado Michael-Marie de La Condamine, retornando de Quito, adentrou o rio Amazonas, passando pelo Forte de São José da Barra do Rio Negro (Manaus), tendo como destino final, a Cidade de Caiena (Guiana Francesa) e posteriormente Paris, em 1745. A viagem de Quito a Caiena pelo rio Amazonas, durou aproximadamente quatro meses. Ao chegar em Caiena, e de acordo com o seu relato, apresentou todos os sinais e sintomas de doença febril icterícia aguda, que nós supomos de ter sido um quadro de hepatite aguda ocasionada pelo vírus da hepatite A⁴. La Condamine reportou pela primeira vez a descrição da árvore *quinquina*, árvore de onde se tira a quinina, até então desconhecida na Europa.

Somente em 1895, a existência de uma forma de hepatite provavelmente transmitida por via parenteral foi documentada cientificamente^{1-3,5}. Um total de 191 dos 1.289 trabalhadores do porto de Bremen (Alemanha) que receberam vacina contra a varíola (via parenteral), preparada a partir de linfa humana, desenvolveram quadro de icterícia após dois meses a oito meses da aplicação^{2,3,6}. A doença manifestava-se por fadiga, anorexia, queixas digestivas, icterícia e por vezes, intenso prurido cutâneo. Depois de excluídas outras hipóteses, Lüdman deduziu que a vacina seria a possível causa da doença icterícia, uma vez que não foi detectado um único caso entre os trabalhadores vacinados fora do estaleiro, ou entre os não vacinados, contratados posteriormente ao período de vacinação^{2,3,6}. Embora, naquele momento admitindo o eventual envolvimento de um agente infeccioso transmitido através da vacina produzida a partir de linfa humana, Lüdman concluía finalmente no seu relatório: *sinto-me incapaz de dar uma explicação para este curioso conjunto de circunstância*¹. Provavelmente, pelo período de incubação, o agente transmissor seria o ainda não descoberto, vírus da hepatite B (VHB). Contudo, não podemos excluir também como responsável pela transmissão outro vírus descoberto recentemente, o vírus da hepatite C (VHC).

Na primeira guerra mundial (1917-1919), o número de casos de hepatite, sem dúvida, ocasionado provavelmente pelo vírus da hepatite A (VHA), ganhou proporções de pandemias, acometendo milhares de soldados no front da guerra².

Com o advento da insulina parenteral, em 1922, foi notório o surgimento de inúmeros casos de icterícia em Clínicas de Diabetes na Suécia. Tal fato deu-se em razão do uso de lancetas de mola (pressão) para a dosagem da glicemia. Tal lanceta era limpa, mas não esterilizada, antes de ser novamente utilizada¹.

A transmissão da hepatite por inoculação parenteral a partir de soro humano foi somente estabelecida nos fins dos anos trinta. De acordo com Hollinger FB³, em 1937, Findlay e MacCallum descreveram casos de icterícia ocorridos dois a sete meses após a inoculação entre voluntários de vacina contra febre amarela (cepas atenuadas do vírus da febre amarela) preparada com adição de soro humano para fins de estabilização do produto. Posteriormente, outros estudos sugeriram que a adição do soro humano em vacinas seria um veículo de transmissão da doença icterícia³. Foi observado também que, o período de incubação da hepatite transmitida parenteralmente era mais longo do que o descrito na hepatite infecciosa³.

A análise de diversos surtos de *icterícia epidêmica* nos Estados Unidos, e ocorridos durante o período de 1812 e 1922, revelou dados demográficos e epidemiológicos interessantes^{2,3}. A chamada *icterícia epidêmica* acometia principalmente crianças e adultos jovens. As primeiras manifestações clínicas geralmente ocorriam sete a 10 dias após exposição a pacientes ictericos e o maior pico da doença ocorria durante o inverno^{2,3}. O curto período de incubação dessa forma de *icterícia epidêmica* ou *hepatite infecciosa* sugeria naquela época, a existência de uma nova forma de hepatite, hoje denominada de hepatite A.

No Brasil, em princípio de 1940, um surto de icterícia pós-vacinação, com diversos óbitos, foi observado no Estado do Espírito Santo, onde mais de mil casos foram investigados⁷. Dois lotes de vacina preparada com soro normal humano foram incriminados como fonte possível de infecção primária⁷.

Supomos que na região Amazônica brasileira, o emprego em massa da vacina contra a febre amarela nas décadas de quarenta e cinquenta, utilizando ainda vacinas derivadas de plasma humano e seringas e agulhas não descartáveis, tenha sido um dos veículos responsáveis pela disseminação e propagação da infecção pelo VHB e vírus da hepatite D (VHD) entre sua população. Outro provável veículo de transmissão do VHB na região Amazônica, área sabidamente endêmica de infecção pelo VHB e conseqüentemente o VHD, seria o uso de lancetas não descartáveis para fins de punção digital no diagnóstico da malária.

Entre 1979 e 1983, tive a oportunidade de observar várias vezes na zona rural do Estado do Amazonas, técnicos de órgãos governamentais, punçionarem com uma só lanceta, inúmeros pacientes febris e com suspeita de malária. Tais técnicos, após a punção, retiravam o sangue retido na lanceta através de um chumaço de algodão embebido com álcool e posteriormente punçionavam outro paciente. Outros técnicos, simplesmente passavam a lanceta no fogo de uma lamparina logo após punção digital. A referida lamparina servia também para espantar os mosquitos devido a fumaça provocada pelo combustível utilizado, no caso, o querosene.

Antes ou durante a segunda guerra mundial, diversos estudos revelaram a alta frequência de hepatite aguda, entre indivíduos transfundidos com plasma ou outros produtos sanguíneos². Em plena II guerra mundial, precisamente em 1942, uma forma epidêmica de hepatite afetou 28.585 militares americanos e com 62 mortes². O referido surto ocorreu após a aplicação de um determinado lote de vacina contra febre amarela, estabilizada com soro humano².

Estudos conduzidos após 45 anos da referida epidemia entre militares americanos, estabeleceram que tal epidemia tinha sido ocasionada pelo VHB⁸. Nesse estudo, amostras de soro coletadas em 1985 e pertencentes a veteranos militares americanos, que receberam no ano de 1942 a vacina contra febre amarela e desenvolveram icterícia (grupo I) ou não (grupo II), foram analisadas para os marcadores sorológicos de infecção para o VHB⁸. Nos dois grupos, 97% e 76% eram positivos para os anticorpos do VHB, respectivamente. O terceiro grupo de veteranos que não participou da vacinação em 1942, mas tinham sido vacinados posteriormente com a nova vacina, sem adição de plasma humano, apenas 13% foram reativos para os anticorpos contra o VHB⁸. Logo após este trágico acidente com a vacina contra a febre amarela, as autoridades americanas suspenderam temporariamente o emprego da tal vacina *adicionada com soro humano*.

Durante a grande segunda guerra mundial, finda em 1945, estima-se que aproximadamente 15 milhões de indivíduos contraíram hepatite aguda de provável transmissão fecal-oral².

Em 1942, a primeira transmissão voluntária da hepatite infecciosa deu-se entre um médico austríaco e três estudantes de medicina da Universidade de Viena^{1,3}. Os quatro ingeriram deliberadamente suco gástrico de um paciente com hepatite infecciosa. Três a quatro semanas depois, todos os voluntários apresentaram sinais e sintomas sugestivos de hepatite aguda, caracterizando assim a transmissão direta do provável agente infeccioso^{1,3}.

Nos Estados Unidos, foi relatado, em 1943, um surto de icterícia ocorrido entre um a quatro meses após transfusão de sangue ou plasma³. Baseado em diferenças epidemiológicas, observadas entre *hepatite infecciosa* e *icterícia por soro homologa*, foi introduzido em 1947, por MacCallum, o termo hepatite A e hepatite B na categoria dessas duas entidades e aceito posteriormente pela Organização Mundial de Saúde³.

Em 1965, um original artigo titulado *A new antigen in leukemia sera* e publicado no *JAMA* 191: 541-546, 1965 por Baruch Blumberg, revelou a presença do antígeno Austrália (AgAu) em soros de pacientes leucêmicos⁹. Posteriormente, foi confirmada a relação do AgAu com o vírus da hepatite B, sendo denominado posteriormente de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)¹⁰.

Em 1967, os discutidos estudos experimentais de Samuel Krugman e cols diferenciaram dois distintos tipos de agentes da hepatite entre crianças americanas portadoras de deficiência mental (Willowbrook State School for the Mentally Handicapped, New York)¹¹. Um dos agentes foi designado de MS-1, transmitido primariamente pela via fecal oral, mas que também poderia ser transmitido por inoculação de sangue obtido durante a fase de alta viremia do provável agente viral¹¹. O segundo agente foi denominado de MS-2, transmitido por via parenteral e com período de incubação mais longo que o MS-1¹¹.

No início dos anos setenta, e no fim dos anos oitenta, foram descobertos mais quatro agentes virais das hepatites (vírus hepatotrópicos). Em 1973, ou seja, oito anos após a descoberta do VHB, três pesquisadores americanos, Stephen Feinstone, Albert Kapikian e Robert Purcell, visualizaram nas fezes (microscopia eletrônica) de pacientes portadores de *hepatite infecciosa* ou *hepatite A* e na fase aguda da doença, partículas virais esféricas (27nm)¹². Todos os pacientes que apresentavam tais partículas nas fezes foram testados e demonstraram resposta sorológica para este antígeno. De acordo com os autores, tais achados sugeriam finalmente a etiologia da hepatite A¹².

Dois anos após a descoberta do VHA, estudos experimentais reportaram com sucesso a infecção de chimpanzés, quando inoculados com concentrados de fezes pertencentes a pacientes infectados pelo vírus da hepatite¹³. Depois de um determinado período, foram observadas (microscopia eletrônica) nas fezes dos chimpanzés, partículas similares ao tamanho e morfologia¹³, daquelas encontradas por Feinstone em 1973¹².

Em 1977, Mario Rizzetto e cols descreviam pela primeira vez um novo complexo imune, constituído pelo antígeno Delta (HDAg) e anticorpo antidelta (anti-HD), associado à infecção pelo VHB¹⁴. Inicialmente, os descobridores desse novo sistema, denominaram-no de sistema Delta. De acordo com os autores, tal sistema, constituído de antígeno e anticorpo, seria uma nova variante do VHB ou um

novo agente viral¹⁴. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que os anticorpos específicos do sistema delta (antidelta) eram somente detectados em portadores do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), com ou sem doença hepática, não sendo positivo dentro do grupo-controle, nos demais o HBsAg fora negativo¹⁴. Esses resultados e os obtidos através de infecções induzidas em experiência em primatas não humanos confirmaram que a expressão deste novo agente infeccioso somente ocorria em indivíduos e animais infectados pelo vírus da hepatite B (VHB)^{14,15}.

Estudos posteriores a 1977 revelaram que este novo agente viral das hepatites poderia ser encontrado em outras regiões do mundo, e que, através de estudos de transmissão parenteral em chimpanzés, o mesmo era altamente infeccioso¹⁵. Em 1983, foi proposta e aceita uma nova nomenclatura para o agente Delta: vírus da hepatite Delta, previamente designado de agente Delta¹⁵.

Em 1989, mediante sucessivos estudos de biologia molecular, Choo e cols¹⁶ identificaram o genoma do agente viral responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não-A e não-B¹⁶. Tal agente foi denominado de vírus da hepatite C e apresenta características biológicas peculiares que o diferenciam dos outros agentes virais hepatotrópicos¹⁶.

Dos cinco vírus hepatotrópicos primários, o vírus da hepatite E (VHE) somente foi identificado em 1990¹⁷. Sua identificação deu-se através de técnicas de clonagem molecular e transmissão experimental em macacos¹⁷.

De 1994 a 2001, diversos vírus foram descobertos e supostamente relacionados com a doença hepatite, tais como: vírus da hepatite G (VHG), vírus das hepatites GB-C, vírus Sanban, vírus Yonban, vírus TLMV, vírus SEN¹⁸⁻²². Dos novos vírus descobertos nos últimos anos, o VHG foi um dos mais estudados e uma sequência de estudos experimentais e clínicos revelou que esse agente infectivo não se replicaria no fígado, não teria tropismo pelo órgão e não estaria associado a doença hepática, seja aguda ou crônica²³. Até o presente momento, não se encontraram evidências que tais vírus sejam responsáveis pela patogenia da hepatite não A-não E.

Estudos bem recentes sugerem a participação de um novo vírus constituído de DNA na etiopatogenia da cirrose hepática criptogênica e do carcinoma hepatocelular (CHC)²⁴. Denominado de NV-F, este novo agente viral foi identificado no tecido hepático em 15,4% dos pacientes com carcinoma hepatocelular nativos de Taiwan²⁴.

VÍRUS DA HEPATITE B (BARUCH BLUMBERG, 1965)

Na história das grandes descobertas da medicina, a chamada descoberta *acidental* ou *por acaso* é notória e podemos citar como exemplo, a conhecida história da descoberta da penicilina (Alexander Fleming, 1929). Outro exemplo da descoberta *por acaso* na medicina, foi a do vírus da hepatite D (Delta) em 1977¹⁴. A princípio, ao estudarem por técnicas de imunofluorescência, fragmentos de tecido hepático obtido por biópsia hepática de pacientes italianos soropositivos para o HBsAg, os autores identificaram um novo sistema antígeno/anticorpo distinto do VHB¹⁴. Fica patente, com os dois exemplos acima citados, que as grandes descobertas da Medicina podem ser produtos finais de observações inesperadas. Entretanto, o maior louvor dessas descobertas científicas está na competência dos técnicos em decifrar tais achados inesperados e explaná-los corretamente.

Segundo Louis Pasteur, *o acaso favorece apenas as mentes preparadas* e a descoberta do VHB teve também caráter puramente *acidental* ou *por acaso*, como descrevemos a seguir. Em 1963, o geneticista americano Baruch Blumberg (**Figura 1**) estudando anticorpos contra lipoproteínas séricas em pacientes que tinham recebido transfusão de sangue, ou seja, com objetivos completamente diferentes dos objetivos iniciais e achados finais da pesquisa, identificaram no soro pertencente a um aborígine Australiano, a presença de um antígeno que reagia como o soro de dois doentes hemofílicos politransfundidos^{5,25}. Inicialmente, e em decorrência de suas características, foi proposto pelos autores da descoberta a este antígeno, a denominação de antígeno vermelho (*red antigen*)⁵. Subsequentemente, foi debatido e proposto dois nomes a este antígeno. O primeiro, antígeno Bethesda, local da descoberta⁵. O segundo, antígeno Austrália, local onde o paciente (aborígine) residia⁵. De acordo com Alter HJ, este antígeno só recebeu o nome de antígeno Austrália (AgAu), em razão da nomenclatura vigente na época que determinava o nome das novas imunoglobulinas humanas descobertas ao local de origem da amostra do paciente⁵. Somente em 1965, a descoberta do antígeno Austrália foi publicada no Journal of the American Medical Association (JAMA), com o título *A New antigen in Leukemia sera*⁹.

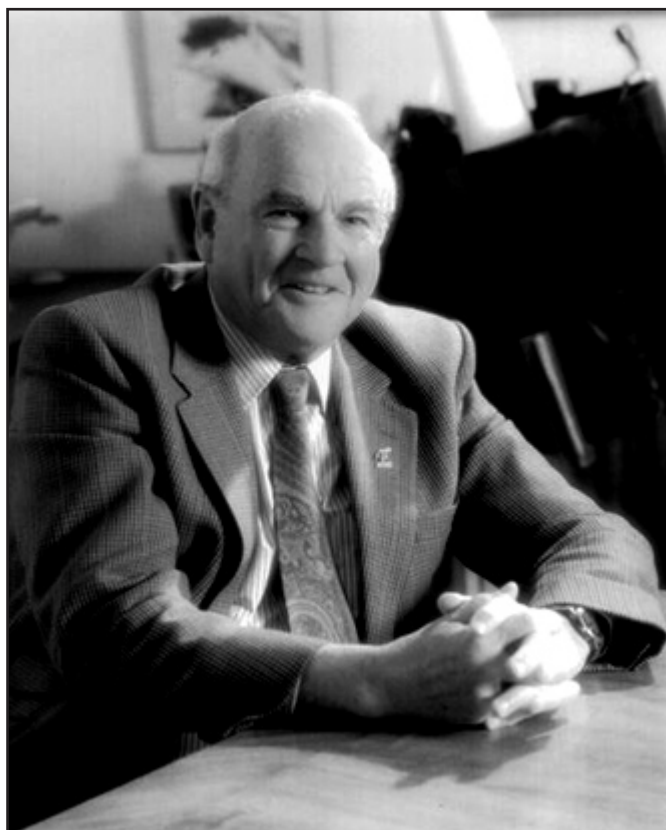


FIGURA 1 - Imagem do Baruch Blumberg, descobridor do VHB em 1965. (Foto gentilmente cedida pelo Dr. Baruch Blumberg).

A distribuição do AgAu em várias populações, como reportado no estudo inicial e pioneiro de Blumberg⁹, revelou os seguintes resultados: de um total de 1.704 amostras testadas para o AgAu, 38 (2,3%) foram positivas, sendo que a maioria foi reativa entre nativos de Taiwan, 23/3 (13%) e aborígenes australianos, 208/12 (5,7%)¹⁰. Após a descoberta do referido antígeno, e de acordo com próprio Blumberg, um questionamento o deixava perplexo e uma devida pergunta o deixava preocupado: *what is this Austrália antigen?*²⁵

Em 1966, um ano após a descoberta do antígeno Austrália, estudos revelaram a ausência deste antígeno entre 700 amostras de doadores sanguíneos, porém foi observado uma prevalência do AgAu de 11,4% entre 70 pacientes leucêmicos (politransfundidos), todos procedentes dos Estados Unidos²⁶. O mais interessante neste estudo é o seguinte informe epidemiológico dos autores sobre a positividade do AgAu entre leucêmicos: no grupo controle de 659 pacientes, apenas duas (0,3%) das 659 amostras pesquisadas foram reativas para este antígeno²⁶.

Inicialmente, Blumberg focando a associação da leucemia com o AgAu, levantou a hipótese de que a presença de tal antígeno entre pacientes leucêmicos poderia ser uma predisposição herdada para leucemia ou um agente causal ou até um fator predisponente para o desenvolvimento da leucemia²⁵. Estudos subsequentes sobre o AgAu revelaram uma alta frequência deste entre portadores da síndrome de Down institucionalizados (30%), quando comparada com pacientes leucêmicos (10%) e portadores de Down vivendo em casa (1%)²⁷. Qual a razão destes achados, já que os portadores da síndrome de Down eram todos negativos para o AgAu ao nascimento? Testando amostras de soro dos portadores de Down, ele verificou que a ALT apresentava níveis significativos e elevados entre os positivos para tal antígeno, fato não observado entre os AgAu negativo²⁷.

A peça final da ligação entre o AgAu e a hepatite aconteceu quando Barbara Werner, uma investigadora do laboratório de Blumberg, desenvolveu quadro clínico e bioquímico de hepatite aguda¹². Testada para o AgAu, ela foi positiva. Previamente, a referida investigadora tinha servido de controle negativo para o AgAu²⁵.

Em 1967, Blumberg e cols sugeriram pela primeira vez que a alta frequência do AgAu no soro de pacientes com hepatite aguda poderia estar relacionada com um suposto *virus* introduzido entre humanos por transfusões de sangue²⁷. De acordo com Blumberg, tal publicação foi rejeitada inicialmente e aceita após intensa revisão dos autores²⁵. Os revisores da Revista *Annals of Internal Medicine* informaram ao autor que os resultados encontrados não eram convincentes para suportarem a hipótese de que o AgAu estaria associado a hepatite²⁵.

Independentemente dos achados de Blumberg, em 1965 e 1967, Prince AM, em 1968, isolou outro antígeno no sangue durante o período de incubação de uma hepatite pós-transfusional²⁸. O referido antígeno foi denominado de antígeno SH, relativo à hepatite sérica²⁸. Posteriormente, comprovou-se que o antígeno SH de Prince AM era o mesmo antígeno Austrália de Blumberg.

No mesmo ano da descoberta de Prince AM, outro americano, e pertencente a equipe de Blumberg, chamado Bayer M analisou por microscopia eletrônica o soro de um portador crônico do antígeno Austrália e encontrou numerosas partículas, algumas esféricas e outras tubulares²⁵. As esféricas mediam cerca de 22nm de diâmetro, enquanto as tubulares cerca de 22nm de largura e 150nm de comprimento²⁵. Tais partículas reagiam com o soro dos pacientes convalescentes de hepatite, sugerindo que o AgAu estaria presente na sua superfície²⁵. Estudos posteriores revelaram que as partículas encontradas por Bayer eram apenas um produto da síntese em excesso do antígeno de superfície pelos hepatócitos infectados²⁵. Tais partículas seriam na realidade, invólucros virais vazios não infectivos.

Finalmente, em 1970, foi demonstrada por microscopia eletrônica em soros positivos para o antígeno Austrália, uma terceira partícula de forma esférica e medindo cerca de 42nm²⁹. Em 1971,

Almeida e cols caracterizaram o que chamaram de partícula de Dane, o pacote viral completo do VHB². A partícula de Dane constituía-se de um invólucro externo e um núcleo, sendo que o invólucro externo correspondia ao antígeno Austrália, passando posteriormente a ser designado de antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)³⁰. Estudos posteriores confirmaram que a partícula de Dane de 42nm representava o virion completo do VHB, sendo constituída por um ácido nucléico (DNA) e do antígeno central do VHB (HBcAg)²⁵.

O vírus B foi o primeiro vírus humano patogênico a ser sequenciado²⁵. Em 1972, foi descrito um novo antígeno distinto do HBsAg, sendo denominado de antígeno e do vírus da hepatite B (HBeAg), como também seu anticorpo correspondente (anti-HBe)³¹. A presença sérica do HBeAg entre portadores do VHB foi identificada como um marcador de replicação viral e de alta infectividade com o HBV-DNA³².

A primeira publicação sobre a presença do AgAu no Brasil deu-se em 1970, por Salzano FM & Blumberg BS³³. Estudando amostras de pacientes brasileiros para o referido antígeno, os autores revelaram uma prevalência de 0,5% entre indivíduos sadios, 0% entre portadores de hanseníase, de 4% entre portadores de leucemia, com prevalência total de 0,6% para o AgAu³³. Grande parte das amostras estudadas pertencia a indivíduos e pacientes nativos de Porto Alegre (RS) e Florianópolis (SC)³³. Em 1973, estudos realizados na região Amazônica Brasileira revelaram pela primeira a presença do antígeno Austrália entre a população residente na zona rural do Estado do Amazonas³⁴.

Em 1986, estudos dirigidos entre pacientes de origem italiana revelaram uma rápida e progressiva doença hepática crônica HBsAg reativa, negativa para o HBeAg e positiva para o anti-HBe³⁵. Os referidos pacientes, apesar de serem HBeAg negativos, tinham evidências de alta replicação viral e eram positivos para o HBV-DNA³⁵. Dois estudos publicados e realizados entre pacientes anti-HBe positivos originários de algumas áreas do mediterrâneo, revelaram que a maior causa da discrepância entre a presença do HBV-DNA e ausência do HBeAg estaria relacionado com a infecção de uma cepa variante do VHB incapaz de produzir o HBeAg (mutante precorre 1896)^{36,37}.

Novas descobertas com relação a biologia do VHB revelam que este vírus tem uma diversidade viral complexa e apresenta diferentes subtipos e genótipos.

Confirmada a relação da descoberta de Blumberg com o VHB, o próximo desafio dos pesquisadores seria descobrir uma vacina capaz de prevenir a doença. Uma retrospectiva na história da descoberta da vacina contra o VHB começa em 1971 com Samuel Krugman³⁸. O autor inoculou em crianças americanas portadoras de deficiência mental da escola *Willowbrook State School for the Mentally Handicapped, New York* o soro MS2 (vírus inativado pelo calor de 98° durante um minuto). Os resultados foram parciais, ou seja, sem proteção adequada³⁸.

Entre 1975 e 1976, diversos grupos de pesquisa publicaram resultados do emprego de uma vacina mais purificada, de boa tolerabilidade e eficaz³⁹. Todavia, somente em 1981 foi registrada a vacina derivada do plasma de portadores saudáveis do HBsAg³⁹. Estudos randomizados mostraram que tal vacina era bem tolerada e eficaz, protegendo os vacinados contra o VHB em 95% dos casos³⁹. Finalmente, em 1986, a vacina derivada de plasma foi substituída pela nova descoberta da medicina, a vacina contra o VHB produzida por engenharia genética, até hoje utilizada³⁹.

Em outubro de 1989, iniciamos o programa de vacinação contra o VHB em populações residentes (crianças menores que dez anos de idade) em áreas endêmicas de infecção pelos VHB e VHD na região Amazônica brasileira⁴⁰. Na primeira etapa do programa de vacinação contra o VHB, no Estado do Amazonas, estimou-se vacinar 82.020 crianças, sendo que 97,5% receberam a primeira dose, 89,6% a segunda dose e 78,1% a terceira dose⁴⁰. Entre 1990 e 1992, nos diversos estados que compreende a região Amazônica, a vacina contra o VHB foi integrada no Programa Nacional de Imunização⁴⁰. É importante salientar neste artigo que o Brasil foi o segundo país do mundo a empregar a vacinação em massa contra o VHB em áreas endêmicas, como parte de um programa do Ministério da Saúde. Em maio de 2003, 151 (79%) dos 192 países membros da Organização Mundial da Saúde (OMS) tinham a vacina contra o VHB integrada ao programa nacional de imunização³⁹.

Como podemos observar, a história da *hepatite sérica* ou do próprio VHB, inciou-se em 1895 com o estudo e publicação de Lürman dos fatos ocorridos entre trabalhadores do estaleiro de Bremen, na Alemanha. O referido estudo ainda hoje é considerado como um modelo nos estudos epidemiológicos das hepatites de etiologia viral.

A descoberta do VHB por Blumberg em 1965, merecido ganhador do prêmio Nobel de Medicina (1978) por tal achado, é considerada como um dos fatos mais importantes da medicina no último século. Contudo, a história da hepatite B ainda não pode e nem deve ser considerada como penúltimo capítulo, já que o número de portadores crônicos do VHB ainda encontra-se em fase de ascensão, apesar da existência da vacina há mais de vinte anos.

O que falta do ponto de vista científico para a história do VHB possa ser concluída? Com certeza, a expansão total e mundial da vacinação contra o VHB e a descoberta de novas drogas capazes de destruir ou suprimir o vírus definitivamente. A junção da medicina profilática e terapêutica seria o suporte ideal para que possamos num futuro bem próximo, erradicar totalmente a doença ocasionada pelo VHB e quem sabe, descrever outra história.

VÍRUS DA HEPATITE A (STEPHEN FEINSTONE, 1973)

Em 1973, oito anos após a descoberta do VHB, por Baruch Blumberg, três pesquisadores americanos, Stephen Feinstone, Albert Kapikian e Robert Purcell (**Figura 2**) visualizaram nas fezes (microscopia eletrônica) de pacientes portadores de *hepatite infecciosa* ou *hepatite A* e na fase aguda da doença partículas virais esféricas

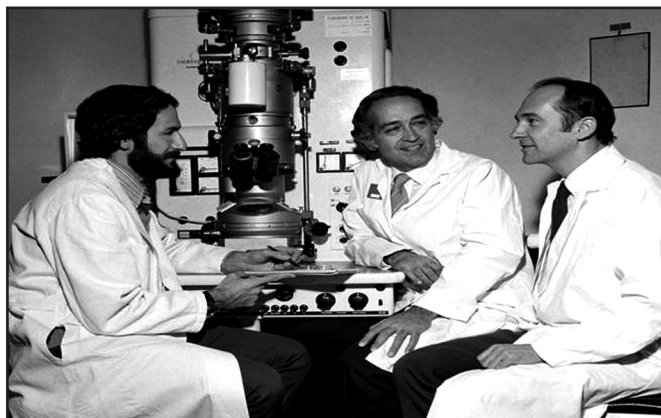


FIGURA 2 - Da esquerda para a direita observa-se Stephen Feinstone (descobridor do VHA), Al Kapikian e Robert Purcell, colaboradores maiores da descoberta do VHA em 1973. (Foto gentilmente cedida pelo Dr. Stephen Feinstone).

(27nm)²². Todos os pacientes que apresentavam tais partículas nas fezes foram testados e demonstraram resposta sorológica para este antígeno. De acordo com os autores, tais achados sugeriam finalmente a etiologia da hepatite A²².

Dois anos após a descoberta de Feinstone, Gravelle e cols, em 1975, reportaram com sucesso a infecção de chimpanzés, quando inoculados com concentrados de fezes pertencentes a pacientes infectados pelo vírus da hepatite A³¹. Depois de um determinado período, foram observadas (microscopia eletrônica) nas fezes dos chimpanzés partículas similares ao tamanho e morfologia³², daquelas encontradas por Feinstone, em 1973²².

Em 1975, Krugman S e cols pesquisaram pela primeira vez anticorpos contra o VHA em amostras de soro estocadas e pertencentes a 20 pacientes com diagnóstico de hepatite aguda tipo A⁴¹. Utilizando as técnicas de imunoadesência e fixação de complemento, os resultados revelaram-se negativos para os anticorpos contra o VHA (títulos menores que 1:5) antes da exacerbação do processo agudo nos 20 pacientes⁴¹. Todavia, uma semana a quatro semanas após o início do quadro clínico, títulos altíssimos foram observados (igual ou maior que 1:1024) entre estes⁴¹. Após alguns meses de seguimento os títulos foram maiores ou iguais que 1:81.920. Cinco a dez anos depois os títulos variavam de 1:640 a 1:20.480⁴¹.

A clonagem molecular e o sequenciamento do VHA somente ocorreram após 10 anos da descoberta deste agente viral⁴². A referida clonagem e o sequenciamento do VHA foi o primeiro passo para a produção da vacina contra este vírus.

VÍRUS DA HEPATITE D (MARIO RIZZETTO, 1977)

Em 1977, Mario Rizzetto (**Figura 3**) e cols descreviam pela primeira vez um novo sistema imunológico, constituído pelo antígeno Delta (HD_{Ag}) e anticorpo antidelta (anti-HD), associado à infecção pelo VHB. Inicialmente, os descobridores desse novo sistema denominaram-no de sistema Delta¹⁴. De acordo com os autores, tal sistema, constituído de antígeno e anticorpo, seria uma nova variante do VHB ou um novo agente viral¹⁴. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que os anticorpos específicos do sistema delta



Figura 3 - Foto do Dr. Mario Rizzetto, descobridor do VHD em 1977. (Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Rizzetto).

(antidelta) eram somente detectados em portadores do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), com ou sem doença hepática, não sendo positivo dentro do grupo-controle, nos demais o HBsAg fora negativo¹⁴. Esses resultados e os obtidos através de infecções induzidas em experiência em primatas não humanos confirmaram que a expressão deste novo agente infeccioso somente ocorria em indivíduos e animais infectados pelo vírus da hepatite B (VHB)^{14,15}.

Estudos posteriores a 1977 revelaram que este novo agente viral das hepatites poderia ser encontrado em outras regiões do mundo e que, através de estudos de transmissão parenteral em chimpanzés, o mesmo era altamente infeccioso¹⁵. Em 1983, foi proposta e aceita uma nova nomenclatura para o agente Delta: vírus da hepatite Delta, previamente designado de agente Delta¹⁵.

Na região Amazônica Ocidental brasileira, em especial no Estado do Amazonas, especificamente na calha do Rio Purus, uma forma atípica de hepatite fulminante já se fazia presente há mais de 60 anos⁴³. Durante nossos estudos científicos em busca dos conhecimentos desta entidade nosológica, no início da década de 80, ouvimos atentos dos mais idosos habitantes das calhas dos rios Purus, Solimões e Juruá que tal doença dizimava famílias inteiras nas vilas, povoados e seringais, principalmente na fase do *boom da borracha*, fim do século XIX e início do século XX⁴³. De acordo com estes relatos, as principais vítimas foram principalmente os chamados *soldados da borracha* e familiares, constituídos na maioria de imigrantes nordestinos⁴³. A *doença* começava abruptamente, o paciente tinha falta de paciência, tristeza e permanecia o tempo todo calado. Em torno de 24 horas, o paciente agitava-se, falando palavras desconexas e de baixo calão, quebrando tudo ao seu redor, mordendo as pessoas, chegando a *vomitando o fígado*. Após tal quadro, o paciente entrava em coma profundo e, geralmente após 72 horas do início da doença, morria. Talvez o relato mais interessante seria que, após a morte, o *defunto continuava quente por mais de seis horas e sangrando pelo nariz*⁴³.

Em decorrência do primeiro registro leigo e científico desta entidade ter sido no município de Lábrea (Estado do Amazonas, Brasil), tal forma de hepatite grave receberia cientificamente diversas denominações, tais como febre da Amazônia, febre negra do Rio Purus, doença de Lábrea, hepatite de Lábrea, hepatite fulminante de Lábrea, febre negra, febre negra de Lábrea⁴³.

Em 1983, foi sugerida a participação do vírus da hepatite (VHB) na etiopatogenia da hepatite fulminante de Lábrea^{44,45}. Em um dos estudos, os autores chamam a atenção para dois fatos importantes: o primeiro epidemiológico, ou seja, a ocorrência desta patologia em outras áreas da Amazônia, como no município de Codajás, rio Solimões; o outro, com relação aos aspectos evolutivos, não sendo encontrada pelos autores quaisquer diferenças que pudessem distinguir clinicamente em entidades separadas a hepatite fulminante de Lábrea da forma clássica de hepatite fulminante, e sim somente através dos estudos histopatológicos⁴⁵.

Após 1983, estudos soropidemiológicos com relação à infecção pelo VHB e vírus da hepatite D na Amazônia Ocidental revelaram dados preocupantes⁴⁶. De acordo com o referido estudo, nossa região teria uma das maiores prevalências de infecção pelo VHB e VHD no mundo, sendo considerada pelos autores como uma área de alta endemicidade⁴⁶.

Em 1985, um novo estudo sobre a etiopatogenia da hepatite de Lábrea revelou pela primeira vez a presença simultânea dos antígenos do VHB (HBsAg) e do VHD (HD_{Ag}) no tecido hepático

de pacientes com quadro histopatológico de hepatite fulminante de Lábrea⁴⁷. Nesse estudo, os autores sugerem que a etiopatogenia de tal entidade poderia estar relacionada com a coinfeção aguda pelo VHB+VHD ou pela superinfecção pelo VHD em portadores crônicos do VHB⁴⁷.

Durante certo período de tempo, acreditava-se que a etiopatogenia da hepatite fulminante de Lábrea estivesse estritamente ligada à infecção pelo VHD. Porém, em 2004, estudos revelaram a participação efetiva de outros vírus hepatotrópicos nesta entidade⁴⁸.

Endêmico na Itália no início da década de 80 (25% de prevalência entre portadores do HBsAg), foi observado uma queda significativa desta prevalência nos anos noventa (8% de prevalência entre portadores do HBsAg)^{49,50}. Similar declínio de prevalência de infecção pelo VHD foi verificado na Espanha, Taiwan e Turquia⁴⁹. De acordo com Rizzetto M, existe uma tendência de retorno da infecção pelo VHD na Europa com os mesmos níveis encontrados na década de oitenta⁴⁹. Conforme este mesmo autor, tal fato epidemiológico deve-se a imigração para a Europa de indivíduos procedentes de áreas endêmicas para o VHB e VHD, principalmente oriundos da África e Turquia⁴⁹.

VÍRUS DA HEPATITE C (QUI-LIM-CHOO, GEORGE KUO, DANIEL BRADLEY, MICHAEL HOUGHTON, 1989)

Uma doença sem um agente biológico identificado. Durante várias décadas, esta questão foi uma constante interrogação aos pesquisadores e estudiosos da história natural das hepatites pós-transfusionais não-A e não-B⁵¹⁻⁵⁹. Nos primeiros anos da década de oitenta, estudos experimentais em primatas e desenvolvidos no Centro de Controle de Atlanta EUA, revelaram a presença de um agente infectivo com 60nm de diâmetro, revestido de um invólucro lipoprotéico, genoma constituído de ácido ribonucléico (RNA), classificado inicialmente como pertencente à família *Togaviridae* e transmissível mediante sangue e hemoderivados⁵⁸. No momento da descoberta, Daniel Bradley e colaboradores o denominaram de *Agente de forma tubular*⁵⁸.

Em 1989, mediante sucessivos estudos de biologia molecular, Qui-Lim-Choo, George Kuo, Daniel Bradley e Michael Houghton (**Figura 4**) após seis anos de intensa investigação (1982-1988)⁶⁰, identificaram finalmente o genoma do agente viral (clonagem molecular direta) responsável por 80 a 90% das hepatites pós-transfusionais não-A e não-B¹⁶. Tal agente foi denominado de vírus da hepatite C¹⁶. No mesmo ano da identificação do VHC, George Kuo e cols relataram o desenvolvimento de um teste sorológico para a detecção dos anticorpos contra a infecção pelo VHC (anti-HCV total)⁶¹.

Também neste mesmo ano da descoberta do VHC, estudos publicados nos Estados Unidos revelaram a presença sérica do anti-HCV em seguimento de pacientes com história de hepatite pós-transfusional aguda e entre pacientes com hepatite crônica não-A, não-B (história de transfusão sanguínea)⁶². Na Espanha, estudos publicados em 1989 revelaram a detecção sérica do anti-HCV na maioria dos pacientes pertencentes a grupos de risco, principalmente naqueles com história de hepatite pós-transfusional não-A e não-B⁶³.

De acordo com estudo recente de revisão, Michael Houghton revela que durante as pesquisas e tentativas do isolamento molecular e caracterização do VHC (1982-1988)⁶⁰, seu grupo de pesquisa



Figura 4 - De cima para baixo e da esquerda para a direita observa-se Michael Houghton Qui-Lim Choo, George Kuo e Daniel Bradley, pesquisadores que descobriram o VHC em 1988. (Foto gentilmente cedida pelo Dr. Michael Houghton).

utilizando sonda de hibridização para os agentes virais da hepatites não-A e não- B, demonstrou pela primeira vez a estrutura circular do genoma do VHD⁶⁴.

O mesmo grupo descobridor do VHC publicou recentemente dois trabalhos relacionados ao emprego experimental de uma vacina contra o VHC em chimpanzês⁶⁰. Os resultados foram considerados bastante promissores pelos autores.

VÍRUS DA HEPATITE E (M BALAYAN, 1983; GR REYES, 1990)

Na década de cinquenta, sabia-se da existência de outra forma de hepatite não-A e não-B, de transmissão essencialmente entérica, sendo incriminada a veiculação hídrica (fornecimento de água com esgoto) como forma de transmissão. As características epidemiológicas e clínicas desta forma de hepatite de transmissão entérica diferenciavam-se da outra forma de hepatite não-A e não-B, também de transmissão primordialmente entérica, denominada posteriormente de hepatite A⁶⁵. Tais diferenças epidemiológicas e clínicas desta forma de hepatite foram observadas durante os estudos do grande surto de hepatite aguda na Somália, África em 1988⁶⁵. Nesse surto epidêmico, 11.413 indivíduos desenvolveram hepatite aguda, com um total de 146 óbitos, alta letalidade em mulheres gestantes (13,8%), maior incidência entre adultos jovens e pacientes pertencentes ao sexo feminino⁶⁵. Grande parte da população acometida residia em pequenas vilas supridas com água de rio⁶⁵. Dados referentes a este surto epidêmico foram publicados cinco anos após o surto, e o VHE foi incriminado como o seu principal agente responsável⁶⁵.

Em 1983, Balayan MS e cols reproduziram pela primeira vez quadro de hepatite aguda típica em voluntários humanos, sabidamente imunes ao VHA, após a administração oral de uma mistura de iorgute + pool de fezes humanas de casos presumidos e provenientes de um surto epidêmico de hepatite não-A e não-B. Marcadores de infecção aguda pelo VHB e VHA não foram detectados durante o curso da infecção⁶⁶. Através da imuno-microscopia eletrônica, partículas

esféricas (27nm-32nm) foram observadas nas fezes coletadas durante a fase pré e pós-clínica⁶⁶. Nesse mesmo estudo, Balayan MS e cols ao infectar (inoculação intravenosa) macacos cynomolgus com extrato de fezes humanas, contendo vírus (casos presumidos de hepatite não-A e não-B), foi observado quadro de hepatite aguda, confirmado histologicamente e enzimaticamente⁶⁶. Foi verificado também pelos autores excreção de partículas virais nas fezes dos animais inoculados e produção de anticorpos correspondentes⁶⁶.

Dos cinco vírus hepatotrópicos primários, o vírus da hepatite E somente foi clonado no início dos anos noventa, precisamente em 1990, por Reyes e cols¹⁷. Sua descoberta deu-se através de técnicas de clonagem molecular e transmissão experimental em macacos¹⁷. Entre 1991 e 1992, diversas publicações revelaram o conhecimento da organização genômica do VHE e suas estratégias de expressão⁶⁵. O isolamento de partículas do vírus E em determinadas espécies de animais, sugerem a transferência zoonótica deste vírus aos humanos⁶⁵.

Estudos atuais sugerem que o VHE possa estar incriminado na etiopatogênica das formas crônicas de hepatite⁶⁷. De acordo com o referido estudo, foram identificados 14 casos de hepatite aguda pelo VHE entre pacientes transplantados (três receberam transplante hepático, nove transplante renal, dois receberam transplante duplo de rins e pâncreas) e o seguimento revelou reatividade do HEV-RNA em todos⁶⁷. Dos 14 pacientes, oito desenvolveram hepatite crônica, confirmado pelos níveis elevados e persistentes das aminotransferases, positividade do HEV-RNA no soro e achados histológicos de hepatite crônica⁶⁷.

A vacina contra o VHE continua em fase de estudos experimentais e clínicos⁶⁵. Todavia, aguarda-se a qualquer momento, a produção desta vacina em escala industrial.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece aos Drs. Baruch Blumberg, Steve Feinstone, Mario Rizzetto e Michael Houghton pelo envio de suas fotos e a devida permissão para publicá-las neste artigo.

REFERÊNCIAS

- Freitas J. Hepatites Virais: Perspectiva histórica. Acessado no site <http://www.aidsportugal.com/hepatite>, em 10 de março de 2009 às 22:33h.
- Reuben A. Landmarks in hepatology: the thin red line. *Hepatology* 2002; 36:770-773.
- Hollinger FB. The five viruses: a perspective. AASLD Postgraduate Course "Viral hepatitis A to F: An Update; 1994. p 2-20.
- La Condamine MM. Journal du voyage fait par ordre du roi, a l'Equateur, servant d'introduction historique a la Mesure des trois premiers degres du meridiem, 1751 (2). Acessado no site do "Center de Recherche de sur la Littérature des Voyages, Paris- França (<http://www.crvl.org>) em 19 de março de 2009 às 5:23h.
- Alter HJ. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the Australia antigen. *J Hepatol* 2003; 39: 149-152.
- Schimid R. Viral hepatitis: Some Historical Perspectives. In: Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. 1994. p.1-7.
- Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Ministério da Saúde-Departamento Nacional de Endemias Rurais; 1969.
- Seeff LB, Beebe GW, Hoofnagle JH, Norman JE, Buskell-Bales Z, Waggoner JG, et al. A serologic follow-up of the 1942 epidemic of post-vaccination hepatitis in the United States Army. *New England J Med* 1987; 316: 965-970.
- Blumberg BS, Alter HJ, Vismich A. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541-546.
- Blumberg BS, Gerystley BJS, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Int Med* 1967; 66: 924-931.
- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200:365-373.
- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of virus like antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026-1028.
- Gravelle CR, Hornbeck CL, Maynard JE, Schable CA, Cook EH, Bradley DW. Hepatitis A: report of a common-source outbreak with recovery of a possible etiologic agent. II. Laboratory studies. *J Inf Dis* 1975; 131: 167-171.
- Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, Crivelli O, Trepò C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *GUT* 1977; 18: 997-1003.
- Rizzetto M. Hepatitis Delta: The virus and disease. *J Hepatol* 1990; 11: 145-148.
- Choo QL, Kuo G, Weiner A, Wang KS, Overby L, Bradley D, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, et al. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-1339.
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Med* 1995; 1:564-569.
- Linnen J, Wages Jr J, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, et al. Molecular cloning and disease associated with hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271:505-508.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Bioch Biophys Res Com* 1997; 241: 92-97.
- Tanaka Y, Primi D, Wang RY, Umemura T, Yeo AE, Mizokami M, et al. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and relationship to TTV family. *J Inf Dis* 2001, 183: 359-367.
- Yeh CH, Chen TC, Chang ML, Hsu CW, Yeh TS, Lee WC, et al. Identification of NV-F virus in hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2002; 79: 92-96.
- Pessoa MG, Terrault NA, Detmer J, Kolberg J, Collins M, Hassoba HM, et al. Quantitation of hepatitis G and C viruses in the liver: Evidence that hepatitis G is not hepatotropic. *Hepatology* 1998; 27: 877-880.
- Yeh CT, Tsao ML, Lin YC, Tseng IC. Identification of a novel single-stranded with human hepatitis. *J Inf Dis* 2006; 193:1089-1097.
- Blumberg BS. Hepatitis B: The hunt for a killer virus. Princeton University Press, New Jersey; 2003.
- Alter HJ, Blumberg BS. Further studies on a "new" human isoprecipitin system (Australia Antigen). *Blood* 1966; 27: 297-309.
- Blumberg BS, Gerystley BJS, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Int Med* 1967; 66:924-931.
- Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Nat Acad Sci* 1968; 60:814-819.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particules in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1:695-698.
- Almeida JD, Rubenstein D, Stott EJ. New antigen-antibody system in Australia-antigen positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2:1224-1227.
- Magnius LO, Espmark JA. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1972; 80: 335-337.
- Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver, nuclear HBcAg, viral replication and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBeAg versus anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology* 1983; 3: 656-662.

33. Salzano FM, Blumberg BS. The Australia antigen in Brazilian healthy persons and in leprosy and leukemia patients. *J Clin Pathol* 1970; 23: 39-42.
34. Bensabath G, Boshell J. Presence of Australian (Au) antigen in population groups of the interior of the State of Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1973; 15: 284-288.
35. Bonino F, Rosina F, Rizzetto M, Rizzi R, Chiaberge E, Tardanico R, et al. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. *Gastroenterology* 1986; 90: 1268-1273.
36. Brunetto MR, Stemler M, Bonino F, Schodel F, Oliveri F, Rizzetto M, et al. A new hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1990; 10:258-261.
37. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989; 1: 588-590.
38. Krugman S. Experiments at the Willowbrook State School. *Lancet* 1971; 1:966-967.
39. Blumberg BS. The Curiosities of Hepatitis B Virus, Prevention, Sex Ratio, and Demography. *Proc Am Thor Soc* 2006; 3: 14-20.
40. Fonseca JCF. Eradication of Hepatitis B virus infection in the State of Amazonas. *Newsletter of World Gastroenterology Organization*; 2007. p.1-2.
41. Krugman S, Friedman H, Lattimer C. Viral hepatitis, type A. Identification by specific complement fixation and immune adherence tests. *New Engl J Med* 1975; 292:1141-1143.
42. Ticehurst JR, Racaniello VR, Baroudy BM, Baltimore D, Purcell RH, Feinstone SM. Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proc Nat Acad Sci* 1983; 60:5885-5889.
43. Fonseca JCF, Souza RAB, Brasil LM, Araújo JR, Ferreira LCL. Hepatite Fulminante na Amazônia Brasileira. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37 (supl II): 93-95.
44. Bensabath G, Dias LB. Hepatite de Lábrea (Febre Negra de Lábrea) e outras hepatites fulminantes em Sena Madureira, Acre e Boca do Acre, Amazonas, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1983; 25: 182-194.
45. Fonseca JCF, Ferreira LCL, Guerra ALSP, Passos LM, Simonetti JP. Hepatite Fulminante e Febre Negra de Lábrea: Estudo de 5 casos procedentes de Codajás, Amazonas, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1983;16: 144-147.
46. Fonseca JCF, Simonetti SRR, Schatzmayr HG, Castejón MJ, Cesário ALO, Simonetti JP. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 469-471.
47. Fonseca JCF, Gayotto LCC, Ferreira LCL, Araújo JR, Alecrim WD, Santos RTM, et al. Labrea hepatitis-hepatitis B and Delta antigen expression in liver tissue: report of three autopsy cases. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1985; 27:224-227.
48. Fonseca JCF, Souza RAB, Brasil LM, Araújo JR, Ferreira LCL. Fulminant hepatic failure in children and adolescents in Northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 67-69.
49. Rizzetto M. Hepatitis D: the comeback? *Liver Intern* 2009; 29:140-142.
50. Rizzetto M. Hepatitis D: Thirty years after. *J Hepatol* 2009; 50: 1043-1050.
51. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New Engl J Med* 1975; 292: 767-770.
52. Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterol* 1975; 69: 1278-1285.
53. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Tabor E, Feinstone SM, Barker LF, Purcell RH. Transmission of non-A, non-B hepatitis. *Ann Int Med* 1977; 87:14-20.
54. Dienstag JL, Purcell HR, Alter HJ, Feinstone SM, Wong DC, Holland PV. Non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet* 1977; 1: 560-562.
55. Tabor E, Mitchell FD, Goudeau AM, Gerety RJ. Detection of an antigen-antibody system in serum associated with human non-A, non-B hepatitis. *J Med Virol* 1979; 4: 161-169.
56. Berman M, Alter HJ, Ishak KG, Purcell RH, Jones EA. The chronic sequelae of non-A, non-B hepatitis. *Ann Int Med* 1979; 91:1-6.
57. Tabor E, Gerety RJ. Inactivation of an agent of human non-A, non-B hepatitis by formalin. *J Inf Dis* 1980; 142:767-770.
58. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE. Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees. Physicochemical evidence that the tubule-forming agent is a small, enveloped virus. *Gastroenterol* 1985; 88:773-779.
59. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, et al. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature Med* 1995; 1:564-569.
60. Houghton M. Discovery of the hepatitis C. *Liver Intern* 2009; 29 (supl I): 82-88.
61. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
62. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 30: 1494-1500.
63. Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, López-Talavera JC, González A, Hernández JM, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2: 294-297.
64. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, et al. Structure, sequence, and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* 1986; 323: 508-514.
65. Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80: 646-658.
66. Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; 20: 23-31.
67. Aggarwal R. Hepatitis E: does it cause chronic hepatitis? *Hepatol* 2008; 48:1328-1330.