



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**JOSÉ NAPOLEÃO MONTE DA CRUZ**

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DOS GENÓTIPOS E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA  
ASSOCIADAS AOS ANTIVIRAIS EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA  
ATENDIDOS NOS SERVIÇOS DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2015**

**JOSÉ NAPOLEÃO MONTE DA CRUZ**

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DOS GENÓTIPOS E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA ASSOCIADAS AOS ANTIVIRAIS EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA ATENDIDOS NOS SERVIÇOS DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO CEARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho.

**Co-orientador:** Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto.

**FORTALEZA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- C963e Cruz, José Napoleão Monte da.  
Estudo da prevalência dos genótipos e mutações de resistência associadas aos antivirais em pacientes com Hepatite B crônica atendidos nos serviços de referência do Estado do Ceará./ José Napoleão Monte da Cruz. – 2015.  
84 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Patologia.  
Orientação: Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho.  
Co-Orientação: Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto.
1. Hepatite. 2. Hepatite B Crônica. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Técnicas de Genotipagem. 5. Mutação. 6. Epidemiologia Molecular. I. Título.

**JOSÉ NAPOLEÃO MONTE DA CRUZ**

**ESTUDO DA PREVALÊNCIA DOS GENÓTIPOS E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA ASSOCIADAS AOS ANTIVIRAIS EM PACIENTES COM HEPATITE B CRÔNICA ATENDIDOS NOS SERVIÇOS DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO CEARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia

Aprovada em: 25/09/2015.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Milton de Castro Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Elizabeth Lampe  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Aos meus pais,

Moisés Francisco da Cruz e

Raimunda Nonata Monte da Cruz,

Pelo amor e apoio incondicionais que me  
dispensaram nos momentos mais difíceis da  
vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivo Castelo Branco Coelho, pelo apoio, incentivo e ensinamentos. Pela paciência, confiança e compreensão dispensados a mim durante todos os momentos da realização desse trabalho. Seu exemplo de profissionalismo e competência muito contribuíram para o meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Silvia Hyppólito Bonfim, por acreditar nas minhas ideias, na minha provável capacidade, me fazendo acreditar em mais esse desafio. Obrigado pelo o apoio na busca de recursos financeiros, (FUNCAP), e de pessoas que muito contribuíram para alcançar nossos objetivos. Dedico à Senhora e ao casal Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto e Profa. Dra. Elodie Hyppólito Bonfim autores e colaboradores desse projeto.

Ao Prof. Dr. Milton de Castro Lima, um agradecimento especial, por considerá-lo o maior expoente da hepatologia cearense, sem o pensamento de desmerecer os demais. Homem possuidor de conhecimentos imensuráveis, cientista, simples, humilde, comprometido com a profissão médica, mas acima de tudo, com o paciente. Obrigado Dr. Milton por o que o senhor ensinou meu filho, Dr. Moisés, e por tudo que aprendi com o senhor.

À Profa. Dra. Elisabeth Lampe (FIOCRUZ) que me ouviu, compreendeu, auxiliou, sugeriu e acreditou nas diversas etapas da realização desse projeto.

À Profa. Dra. Márcia Paschoal (FIOCRUZ) pelo auxílio na execução dos experimentos e que contribuíram de forma fundamental, durante todo o desenvolvimento do estudo.

Ao coordenador do Mestrado de Patologia, Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra, a todos os professores e funcionários do programa, em especial, às Secretárias: Valeria Cordeiro e Paula Palácio pelas sugestões, ensinamentos e apoio dados durante o curso.

Ao Dr. Bruno Anderson, coordenador de mestrado e doutorado do Dpto. de química da UFC e ao Dr. Pedro Abreu, cientista e Prof. da UNIFOR por estarem sempre dispostos a discutir as diversas partes desse projeto. Bem como, por todo auxílio e incentivo dispensados nos momentos de dissertar e formatar esse estudo, pelo companheirismo, pelas dúvidas compartilhadas, sugestões e amizade sincera.

Aos colegas Dr. Ricardo Carvalho, Diretor, Dr. Nilton Cunha e Dr. Neilson Rolim, colegas em todos os momentos, Dr. Atualpa, Dr. Carlos Assao, Dra. Fernanda Montenegro, Dra. Elza Gadelha, Dra. Débora, Dra. Sonia Santana, Dra Elizabeth Lisboa, Dra.

Lúcia Roriz, Dra. Francisca Elizeida, Dra. Renata Yumi, Dra. Rosilene Porto, Dra. Terezinha Cisne, Dra. Beny Frota, Dra. Ângela Veras, Dra. Maria do Carmo Maciel, Dra. Daisy Arruda, Dra. Regina Murta, Dra. Mirian de Castro, Dra. Helena Sílvia, Dra. Fabrícia, enfim todos da família LACEN pela torcida declarada, pela oportunidade de aprender e ensinar um pouco das nossas hepatites, ao mesmo tempo, em que trabalhávamos.

A todas as colegas do Mestrado e Doutorado, Cristina Bezerra, Jackeline Garcia, Livia Coelho, Camila Lisieux, Mayane Melo, Leda Simões, Natália Vasconcelos, Maryanna, Bruni Maia, Ilana Ribeiro, Kelvia Miranda, Maysa Holanda, Naya de Castro, Guilherme Mota, Sara Sampaio e Neli Feitosa que muito nos apoiaram, incentivaram, auxiliaram que comigo labutaram e sofreram. Sofremos juntos! mas vencemos...

Ao Prof. Dr. Hermano Alexandre Rocha, MD, MPH- Médico Professor de Epidemiologia e Bioestatística, responsável por toda análise estatística dos dados obtidos contribuindo para resultados confiáveis e significativos do trabalho.

À minha esposa, Dra. Fátima Cruz e filhos: Dra. Rosa Cruz, Dr. Moisés Neto e Dr. Pedro Monteiro pelas palavras de apoio, confiança e incentivo. Por compreenderem minha ausência em muitos momentos, por orgulharem-se da minha árdua luta e determinação. Por me defenderem, colaborarem com esse estudo. Por serem grandes exemplos e meus alicerces, suporte fundamental para superar as adversidades da vida.

Ao Dr. Natanael Charles Monte da Cruz, representando às famílias Pessoa Monte e Dutra Cruz, em especial ao meu PAI, Moisés Francisco da Cruz que está no céu e com certeza, mandou muitas bênçãos para que esse momento acontecesse.

A todos pacientes, funcionários da recepção e coleta do LACEN-CE e FIO CRUZ-RJ que compreenderam a finalidade deste trabalho e, prontamente, se dispuseram a participar.

Obrigado Deus pela oportunidade que tive de chegar até aqui, de ter passado pelas instituições que passei, dos experimentos que realizei e ter encontrado pessoas que encontrei.

“Aprender é a única atitude de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”. (Leonardo da Vinci)

## RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) é um grave problema de saúde pública. Estimam-se em 450 milhões os portadores crônicos no mundo, em que pelo menos 600 mil pessoas morrem anualmente por doenças relacionadas com o vírus da hepatite B. A carga viral, soroconversão HBe – anti-HBe, genótipo e mutações virais específicas e adquiridas são fatores que influenciam a progressão dessa doença. O objetivo do presente estudo foi investigar a prevalência de mutações de resistência do VHB associada aos antivirais e avaliar a distribuição genotípica numa amostragem de 142 pacientes com hepatite B crônica, atendidos nos hospitais de referência do Estado do Ceará. Foram realizadas sorologias por eletroquimioluminescência (EQL), laboratório ABBOTT para HBsAg, HBeAg e anti-HBe. O resultado da triagem sorológica no total das amostras mostrou que: 142 (100%) foram sororeagentes para HBsAg (IgG), 87(61,0%) foram soro não reagentes para HBeAg e soro reagentes para anti-HBe, 55(39,0%) são soros reagentes para HBe e soro não reagente para anti-HBe. A quantificação da viremia (carga viral) foi realizada por PCR em tempo real (QPCR), no LACEN-CE. A carga viral variou entre os limites de (2.067 UI/mL a 3.410.000.000 UI/mL), com mediana de 70.403 UI/mL. Oitenta e oito (62%) do total das amostras foram submetidas à pesquisa de mutações associadas ao tratamento e genotipagem no laboratório de hepatites da FIOCRUZ-RJ, triadas para sequenciamento conforme critérios de qualidade e biossegurança de rotina desse laboratório. A identificação dos genótipos na população estudada apresentou a seguinte distribuição: F: 47 (53,4%), A: 34 (38,6%), D: 4(4,6%), E: 2(2,3%) e genótipo G: 1(1,1%). E as seguintes mutações foram detectadas: L180M (n=10 / 9,9%), M204V (n=8 / 7,9%), M204I (n=4 / 4%), G173L (n=1 / 1%), T169L (n=1 / 1%), T184I (n=1 / 1%), L80V (n=1 / 1%) enquanto que 74,3% não apresentaram mutações. No estudo foi observado que o genótipo F(53,4%) foi o mais prevalente na população pesquisada de origem indígena, seguido do genótipo A (38,6%) devido à migração de escravos africanos. E, que a maior frequência das mutações detectadas está associada a inibidores de nucleosídeos e nucleotídeos, principalmente a lamivudina.

**Palavras-chave:** Hepatites Virais. Hepatite B Crônica. PCR. Genotipagem. Mutações. Epidemiologia Molecular.

## ABSTRACT

Infection with hepatitis B virus (VHB) is a serious public health problem. An estimated 450 million chronic carriers worldwide, where at least 600,000 people die annually from diseases related to hepatitis B. Viral load, HBe seroconversion-antiHBe, and specific genotype and viral mutations are acquired factors influence the progression of the disease. The aim of this study was to investigate the prevalence of VHB resistance mutations associated with antiviral and evaluate the genotype distribution in a sample of 142 patients with chronic hepatitis B, treated in the State of Ceará referral hospitals. Patients were considered reactive serum HBsAg for at least six months. Serological tests were performed by electrochemiluminescence (EQL), ABBOTT laboratory for HBsAg, HBeAg and anti-HBe. The results of the serological screening showed that all samples: 142 (100%) were reactive serum HBsAg (IgG), 87 (61.0%) were negative to serum and serum HBeAg to anti-HBe reagent, 55 (39, 0%) are seroreactive for HBe and serum non-reactive for anti-HBe. The quantitation of viremia (viral load) was performed by real time PCR (QPCR) in LACEN-EC. The viral load varied between the limits (2067 IU / ml to 3.41 billion IU / ml), with a median of 70 403 IU / ml. Eighty-eight (62%) of all samples were submitted to analysis of mutations associated with treatment and genotyping the Hepatitis laboratory of the FIOCRUZ-RJ, screened for sequencing as quality criteria and routine laboratory biosafety this. The identification of genotypes in the population studied showed the following distribution: F: 47 (53.4%) of A: 34 (38.6%), the D: 4 (4.6%), E: 2 ( 2.3%) and G 1 (1.1%). And the following mutations were detected: L180M (n = 10 / 9.9%), M204V (n = 8 / 7.9%), M204I (n = 4/4%), G173L (n = 1/1%) , T169L (n = 1/1%), T184I (n = 1/1%), L80V (n = 1/1%) while 74.3% showed no change. In the study it was observed that the F genotype (53.4%) was the most prevalent in the research population of Indian origin, followed by genotype (38.6%) due to migration of African slaves. And, the higher frequency of the detected mutations are associated with nucleoside inhibitors and nucleotides, especially lamivudine.

**Keywords:** Viral Hepatitis. Chronic hepatitis B. PCR. Genotyping. Mutations. Molecular epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01 -</b>	A estrutura do VHB.....	21
<b>Figura 02 -</b>	Vírion e partículas subvirais do VHB.....	22
<b>Figura 03 -</b>	Ciclo de vida do vírus da Hepatite B.....	24
<b>Figura 04 -</b>	Distribuição geográfica da infecção crônica por VHB no mundo.....	29
<b>Figura 05 -</b>	Fluxograma de trabalho para quantificação da carga viral no LACEN- CE.....	41
<b>Figura 06 -</b>	Gel de agarose dos produtos amplificados.....	47
<b>Figura 07 -</b>	Géis de quantificação dos produtos de PCR purificados.....	47
<b>Figura 08 -</b>	Grupamento genético de 88 amostras de soro de pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite B e cepas de referência (representadas pelo subtipo, país de origem e nº no Genbank).....	49
<b>Figura 09 -</b>	Mutação versus tratamento em pacientes com hepatite B crônica.....	51
<b>Figura 10 -</b>	Mutação versus genótipo dos pacientes com hepatite B crônica.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - PRIMERS do VHB - Gene S e Gene da polimerase.....	43
<b>Tabela 02</b> - Dados demográficos (sexo e idade) dos pacientes com hepatite B crônica atendidos nos serviços de referência do estado do Ceará.....	45
<b>Tabela 03</b> - Frequência dos antivirais administrados aos pacientes com hepatite B crônica.....	46
<b>Tabela 04</b> - Frequência das mutações detectadas em pacientes com hepatite B crônica.....	46
<b>Tabela 05</b> - Análise descritiva do tipo de Mutação por Genótipos na população estudada.....	50
<b>Tabela 06</b> - Mutações individuais dos pacientes com hepatite B crônica.....	52
<b>Tabela 07</b> - Frequência das mutações em relação aos genótipos dos pacientes com hepatite B crônica.....	52

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01</b>	- Prevalência mundial dos genótipos do VHB.....	30
<b>Quadro 02</b>	- Quantidade de DNA proporcional ao tamanho do fragmento.....	42
<b>Quadro 03</b>	- Distribuição dos genótipos da população estudada.....	50
<b>Quadro 04</b>	- Mutação vs Tratamento em pacientes com hepatite B crônica.....	51
<b>Quadro 05</b>	- Perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo F fazendo uso de antiviral.....	55
<b>Quadro 06</b>	- Perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo A fazendo uso de antiviral.....	56
<b>Quadro 07</b>	- Perfil dos pacientes genótipo G fazendo uso de antiviral.....	56
<b>Quadro 08</b>	- Perfil dos pacientes genótipo D fazendo uso de antiviral.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina amino transferase
<b>AST</b>	Aspartato amino transferase
<b>cDNA</b>	Ácido desoxiribonucléico complementar
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos
<b>DST</b>	Doença sexualmente transmissível
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>HNAB</b>	Hepatite não-A não-B
<b>HUWC</b>	Hospital Universitário Walter Cantídeo
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IRES</b>	<i>Internal ribosome entry site</i>
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>MMLV</b>	<i>Moloney Murine Leukemia Vírus</i>
<b>NS</b>	Não-estrutural
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>pb</b>	Par de base
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>RM1</b>	Reação de digestão enzimática 1
<b>RM2</b>	Reação de digestão enzimática 2
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT</b>	Transcrição reversa
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>VHA</b>	Vírus da hepatite A
<b>VHB</b>	Vírus da hepatite B
<b>VHC</b>	Vírus da hepatite C

<b>VHD</b>	Vírus da hepatite D
<b>VHE</b>	Vírus da hepatite E
<b>PEG-INF</b>	interferon- $\alpha$ peguilado
<b>RVS</b>	resposta virológica sustentada
<b>NUCs</b>	Os Análogos de nucleosídeos
<b>LMV</b>	Lamivudina (1, 3TC, uma citosina L-nucleosídeo analógico)
<b>ADV</b>	Adefovir (2, ADV, um análogo de adenosina),
<b>ETV</b>	Entecavir (3, ETV, um análogo de guanosina carbocíclico)
<b>LdT</b>	Telbivudina (4, LdT, uma timidina-L-nucleosídeo analógico)
<b>L-FMAU</b>	Clevudine (5, L-FMAU, um analógico nucleosídico da timidina)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>As hepatites virais.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Vírus da hepatite B.....</b>	<b>19</b>
<i>1.2.1</i>	<i>Aspectos históricos.....</i>	<i>19</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Morfologia e Estrutura.....</i>	<i>21</i>
<i>1.2.3</i>	<i>Genoma e proteínas virais.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.4</i>	<i>Replicação Viral.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.5</i>	<i>Aspectos Clínicos e Patológicos.....</i>	<i>24</i>
<i>1.2.6</i>	<i>Resposta Imune à Infecção pelo VHB.....</i>	<i>26</i>
<i>1.2.7</i>	<i>Transmissão.....</i>	<i>27</i>
<i>1.2.8</i>	<i>Epidemiologia.....</i>	<i>28</i>
<i>1.2.9</i>	<i>Diagnóstico.....</i>	<i>31</i>
<i>1.2.9.1</i>	<i>Diagnóstico Sorológico e Molecular.....</i>	<i>31</i>
<i>1.2.9.2</i>	<i>Genotipagem Viral e Mutações associadas aos antivirais Genótipos e Subtipos</i>	<i>32</i>
<i>1.2.9.3</i>	<i>Mutações do VHB.....</i>	<i>34</i>
<i>1.2.10</i>	<i>Prevenção e Tratamento.....</i>	<i>35</i>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Critérios de inclusão e exclusão.....</b>	<b>38</b>
<i>3.2.1</i>	<i>Critérios de inclusão.....</i>	<i>38</i>
<i>3.2.2</i>	<i>Critérios de exclusão.....</i>	<i>39</i>
<b>3.3</b>	<b>Coleta e separação do plasma.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Quantificação da carga viral do VHB.....</b>	<b>39</b>
<i>3.4.1</i>	<i>PCR em tempo real.....</i>	<i>39</i>
<i>3.4.1.1</i>	<i>Amplificação e detecção (m2000rt).....</i>	<i>40</i>
<b>3.5</b>	<b>Genotipagem e Mutações do VHB.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6</b>	<b>Alinhamento de Sequencias e Filogenia</b>	<b>43</b>
<i>3.6.1</i>	<i>Sequenciamento</i>	<i>43</i>

3.6.2	Filogenia – Árvore Filogenética.....	44
3.7	Análise estatística.....	44
4	<b>RESULTADOS.....</b>	45
4.1	Análise Descritiva.....	45
4.2	Amplificação.....	46
4.3	Genótipos e Mutações de resistência.....	48
4.4	Mutações de acordo com o genótipo do VHB.....	53
4.4.1	<i>Genótipo “F”</i> .....	53
4.4.2	<i>Genótipo “A”</i> .....	54
4.4.3	<i>Genótipo “G” e “D”</i> .....	54
4.5	Mutações e carga viral de acordo com o genótipo do VHB.....	55
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	58
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	63
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	64
	<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....</b>	67
	<b>ANEXO A – PROTOCOLOS LABORATORIAIS.....</b>	74
	<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO E QUESTIONÁRIO.....</b>	75
	<b>ANEXO C – DECLARAÇÕES.....</b>	76
	<b>ANEXO D – PROTOCOLO DE PCR VHB – DNA.....</b>	77
	<b>ANEXO E - PROTOCOLO DE PCR VHB – DNA.....</b>	79
	<b>ANEXO F - PROTOCOLO DE PCR VHB – DNA.....</b>	81
	<b>ANEXO G – MIX.....</b>	82
	<b>ANEXO H - TABELAS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	83

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar dos sucessos significativos com as descobertas na terapia contra o VHB, uma questão crucial preocupa o mundo científico que versa sobre o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, e mesmo, resistência cruzada que estão sendo detectadas (FERIR *et al.*, 2008; PALUMBO, 2008).

Avançamos muito nessa última década em conhecimentos a cerca da variabilidade genética do VHB, sua distribuição geográfica, correlação da gravidade e evolução da infecção provocada por alguns genótipos em comparação a outros. Contudo, ainda não se considera estabelecido rotinas de tratamento baseadas nessa variabilidade visando melhorar as taxas de resposta e reduzir o impacto mundial desse grave problema de saúde pública. Torna-se importante detectar mutações de resistência aos antivirais e identificar a prevalência de genótipos do VHB.

### 1.1 As hepatites virais

A maioria das hepatites virais humanas é causada por cinco tipos de vírus, denominados de vírus da hepatite A, B, C, D e E. As características clínicas da hepatite aguda ou crônica, causadas por esses vírus, são semelhantes de modo que é necessária a realização de diferentes testes diagnósticos para que se determine o agente etiológico causador da doença (MAST; ALTER, 1993).

A hepatite A tem como agente etiológico o vírus da hepatite A (VHA). Caracteriza-se, na maioria das vezes, por uma doença branda de caráter limitado. Não há relatos de infecções crônicas por este vírus e a mortalidade é rara. A principal fonte de infecção é fezes de pessoas contaminadas podendo conter até  $10^8$  partículas infectantes (vírions) por mL. Essa contaminação ocorre na forma oral-fecal e é frequente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento que não priorizam o saneamento básico, que predominam baixas condições sócio econômicas e de higiene (VILLAREJOS *et al.*, 1982; LEDNAR *et al.*, 1985). O vírus da hepatite E é transmitido principalmente por a ingestão de alimentos ou líquidos contaminados. Ocorre, frequentemente, em grandes surtos. São desconhecidos seus reservatórios, sendo a ocorrência de surtos associada a países com condições sanitárias inadequadas (BRADLEY *et al.*, 1992; BALAYAN *et al.*, 1983; KHUROO *et al.*, 1983).

O vírus da hepatite C (VHC) foi descoberto somente em 1989 e mostrou-se como a principal causa de hepatite não-A-não-B de origem parenteral, frequentemente transmitido por sangue e produtos sanguíneos (ALTER *et al.*, 1975 e PRINCE *et al.*, 1974), (KUO *et al.*, 1989); (ALTER *et al.*, 1975 e PRINCE *et al.*, 1974), Uma de suas mais importantes características clínicas é a elevada capacidade de causar doença crônica nos pacientes infectados, podendo evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular. Devido a essa particularidade, a hepatite C chega a ser considerada por alguns estudiosos como a “Doença do século XXI”, causando preocupação em toda a comunidade médica e científica.

O vírus da hepatite D (VHD) é um vírus defectivo, incapaz de ser replicado sem auxílio de outro vírus, ocorrendo sua infecção somente em associação com VHB. Desse modo, pessoas co-infectadas, VHB-VHD, podem apresentar doença aguda grave e um maior risco de ocorrer hepatite fulminante que aquelas infectadas somente com VHB. O modo de transmissão dos dois vírus é semelhante, contudo há baixa transmissão sexual e rara ocorrência de transmissão vertical. A distribuição mundial do VHD encontra-se, na maioria das vezes, associada a áreas onde a prevalência de infecção crônica pelo VHB é alta, contudo observa-se alguns países com alta prevalência de VHB onde a ocorrência de infecções por VHD é rara (CAREDDA *et al.*, 1987; HADLER *et al.*, 1984; RIZZETTO, 1983; PURCELL; GERIN, 1983).

Mesmo com os avanços tecnológicos no que diz respeito ao diagnóstico, tratamento e profilaxia dessa infecção, a hepatite B mantém-se como um grave problema de saúde pública. Estima-se que mais de 2 bilhões de indivíduos estão infectados pelo vírus da hepatite B, onde cerca de 350 milhões padecem de infecção crônica (WHO, 2000), com desfecho aproximado a um milhão de óbitos por ano (CASTELO *et al.*, 2005).

Os pacientes cronicamente infectados pelo VHB tem maior risco de desenvolver cirrose hepática podendo evoluir para uma descompensação e carcinoma hepatocelular (CHC). A cirrose é, por definição, uma desorganização difusa da estrutura hepática por extensa fibrose associada a nódulos degenerativos. Podendo ser reversível quando se consegue identificar e eliminar o agente causador. Todavia, a cirrose em estágio avançado resulta em alterações significativas do leito vascular hepático passando a ser irreversível. Esta condição leva a manifestações clínicas severas, sobretudo à insuficiência hepática e a hipertensão portal.

Para avaliação da cirrose descompensada, o prognóstico poderá ser estimado pela classificação de Child-Pugh ou pelo score de MELD. As variáveis incluídas no score Child Pugh refletem as funções hepáticas de síntese de albumina, tempo de protrombina e excreção

de bilirrubina, bem como complicações: ascite e encefalopatia. Em contraste, o escore MELD inclui apenas variáveis numéricas que refletem a função hepática: tempo de atividade de protrombina (TAP), dosagem de bilirrubina e creatinina sérica (função renal). A principal vantagem do escore MELD é ser baseada em variáveis quantitativas que influenciam o prognóstico, pontuando os indivíduos com maior precisão.

Em casos de pacientes com cirrose associada à infecção pelo VHB, a Lamivudina parece ser um agente antiviral seguro e efetivo, capaz de melhorar ou estabilizar a doença hepática em pacientes com cirrose em estágio avançado e replicativo do VHB. Entretanto, o tratamento prolongado pode levar ao desenvolvimento de resistência à Lamivudina. O Adefovir, a Telbivudina, o Entecavir e o Tenofovir são outros agentes antivirais que apresentam atividades contra as formas selvagens e Lamivudina-resistente do VHB.

## **1.2 Vírus da hepatite B**

O vírus da hepatite B (VHB) é o maior causador de hepatite aguda e crônica em todo o mundo, onde o risco de desenvolvimento de doença crônica varia inversamente à idade do indivíduo ao adquirir a infecção.

O VHB é transmitido por exposição de mucosas a fluidos infecciosos, contudo, apesar de muitos fluidos corporais apresentarem o antígeno de superfície do VHB (HBsAg), apenas soro, sêmen, leite materno e saliva demonstraram ser infecciosos. A transmissão também pode ocorrer por via percutânea, tais como por transfusão sanguínea, compartilhamento de agulhas durante o uso de drogas injetáveis, hemodiálise e acupuntura.

As transmissões sexual e vertical são possíveis, desde que haja exposição das mucosas, sangue ou fluidos corporais infectados (MCMAHON *et al.*, 1985; BOND *et al.*, 1981; ALTER *et al.*, 1977; BANCROFT *et al.*, 1977).

### ***1.2.1 Aspectos Históricos***

A hepatite B tem recebido uma série de denominações adquirida ao longo de sua história: hepatite do soro ou hepatite sérica, hepatite de inoculação, hepatite pós-transfusão, hepatite do antígeno Austrália, etc. (CARREIRA; LOFF, 1991). O termo hepatite B surgiu por oposição à hepatite A. Essa hepatite tomou ainda a designação de hepatite sérica para distingui-la da hepatite infecciosa, hepatite A (RIBEIRO, 1997).

Em 1964, Blumberg havia identificado o antígeno de superfície deste vírus, o qual chamou de antígeno Austrália, atualmente é denominado HBsAg (DANE *et al.*, 1970; CARREIRA; LOFF, 1991). Em 1970, Dane conseguiu identificar as partículas do vírus da hepatite B (VHB) no soro de um paciente. Kaplan confirmou a natureza viral destas partículas, detectando um DNA endógeno dependente de uma DNA polimerase que se encontrava no interior do vírus (KAPLAN *et al.*, 1973). A descoberta desta polimerase permitiu a caracterização do genoma do VHB por Robinson (ROBINSON *et al.*, 1974).

O indivíduo ao ser infectado com VHB irá evoluir para uma fase aguda da doença e se não houver cura total, a progressão será perigosa. Os sintomas podem ser mascarados e não se manifestarem durante anos, onde o fígado vai sendo infectado e a evolução desencadeia em cirrose hepática (CH) ou mesmo carcinoma hepatocelular (CHC) (CARREIRA; LOFF, 1991).

O CHC é um das principais neoplasia, e um dos agentes etiológico é a infecção crônica viral. Onde o mecanismo pelo qual o VHB transforma os hepatócitos requer maiores fundamentações científicas.

O primeiro surto de hepatite B ocorreu em 1883, num grupo de trabalhadores de um estaleiro nos Estados Unidos da América, E.U.A., que foram vacinados contra a varíola com linfa de origem humana. Depois, verificou-se uma incidência aumentada naqueles doentes que frequentavam clínicas de doenças venéreas, de diabetes e outros locais onde se administravam injeções com agulhas e seringas inadequadamente esterilizadas, contaminadas com sangue do portador. O maior surto de hepatite B ocorreu em 1942, com 28.585 casos de hepatite B em militares norte-americanos, após lhes ter sido administrada uma vacina contra a febre-amarela que continha soro humano contaminado (RIBEIRO, 1997).

Define-se portador crônico o indivíduo que apresenta antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) por um período superior a 6 meses. Verificou-se, inclusive, uma correlação geográfica significativa entre o número de portadores crônicos num determinado país e a incidência anual de carcinoma hepatocelular, demonstrando a existência de risco em apresentar esse tipo de câncer devido ser 200 vezes superior nos portadores crônicos do vírus, comparados aos não portadores (CARREIRA; LOFF, 1991).

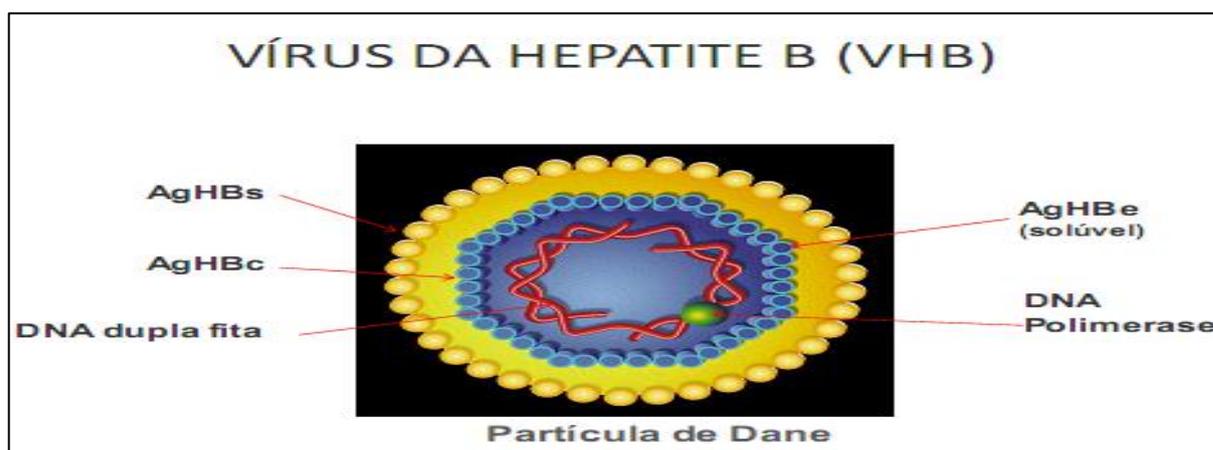
Na década de 1940, os estudos até então realizados permitiram concluir que se tratava de uma doença infecciosa por inoculação. Não se considerava que essa doença fosse transmitida por via oral. Atualmente, os estudos realizados permitem afirmar que o VHB se encontra presente no sangue, saliva, leite materno, fluidos vaginais, sêmen e outros líquidos corporais (RIBEIRO, 1997).

O avanço das investigações permitiu identificar as regiões onde essa doença é mais prevalente e os grupos de risco, sabendo-se que a mesma é mais comum nos homens que nas mulheres, particularmente em jovens adultos que habitam em meios urbanos, especialmente consumidores de droga e homossexuais masculinos (CARREIRA; LOFF, 1991).

### 1.2.2 Morfologia e Estrutura

O VHB é um vírus envelopado, hepatotrópico, não citopático que pode causar hepatite aguda e crônica. O VHB é uma partícula viral cujo DNA é uma estrutura helicoidal em fita dupla onde os grupos fosfatos não estão expostos. VHB é um vírus de DNA de cadeia dupla parcial e tem um genoma de 3.200 pares de bases, divididos em quatro janelas de leitura abertas. (Figura 01).

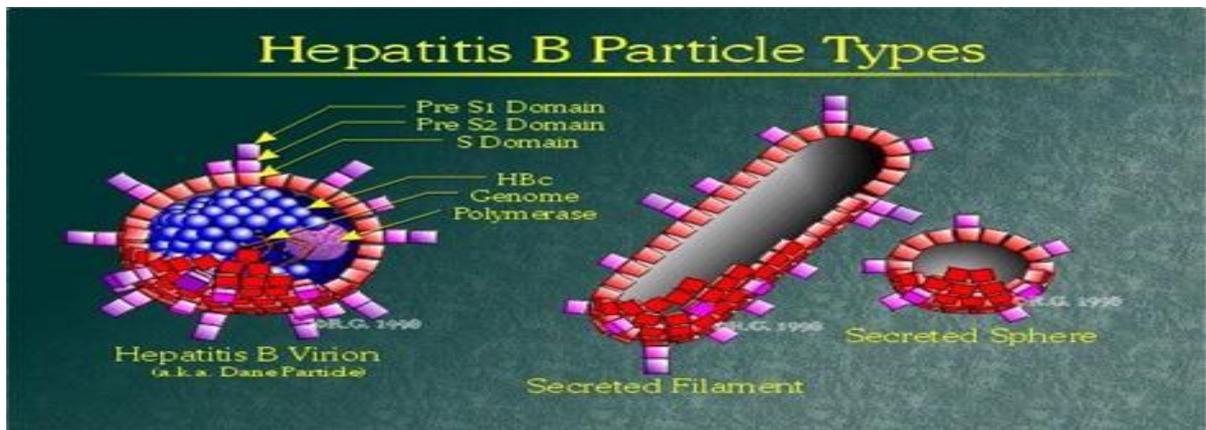
**Figura 01** – A estrutura do VHB



O VHB pertence ao grupo de vírus da família *hepadnaviridae*.

Com fita dupla incompleta de DNA, contendo 3.200 pares de bases, o VHB é o menor vírus DNA conhecido. Através da microscopia eletrônica são observados três tipos de partículas: a partícula de dane, que corresponde ao vírion completo, e outras duas partículas, não infectantes, desprovidas de material genético. (Figura 02).

**Figura 02** - Vírion e partículas subvirais do VHB



A partícula vírica infecciosa ou vírion do VHB, denominada partícula de Dane, revela uma estrutura interna ou “core” (AgHBc), e um invólucro externo (AgHBs), com um diâmetro de 42 nm (NASSAL *et al.*, 1993). Os vírions purificados possuem a proteína HBc. Eles se agregam dando origem à estrutura interna ou “core”.

É no core que se encontram o antígeno do core (HBcAg), o antígeno HBe (HbeAg), o VHB-DNA e a DNA-polimerase. O HBcAg não é secretado, por isso sua visualização no sangue circulante não é comum, entretanto, o mesmo é encontrado no tecido hepático em abundância. O HbeAg, diferentemente do antígeno do core, é secretado e podendo ser detectado no soro.

### 1.2.3 Genoma e proteínas virais

O genoma do VHB devido à sua natureza compacta possui “frames” de leitura sobrepostos, sendo dependente da transcrição reversa.

O VHB é um vírus de DNA da família Hepadnaviridae, que pertence ao gênero Hepadnavírus (vírus hepatotrópico de DNA). O seu genoma é constituído por 3.200 nucleotídeos, em cadeia dupla, com uma longa e uma curta, tendo esta última um comprimento variável (AREIAS, 1996; CASTRO, 1999).

O genoma viral codifica quatro unidades principais de transcrição: S, P, C e X.

O gene S é dividido em três sítios de iniciação, o que leva à formação de três diferentes proteínas de superfície: a proteína p25 (de cadeia curta ou S), a p33 (de cadeia média ou pré-S2) e a p39 (de cadeia longa ou pré-S1). A p25 aparece em maior número e

representa o HBsAg.

As proteínas codificadas pelas regiões pré-S1 e pré-S2 são elementos de ligação à membrana do hepatócito durante a adsorção do vírus nesta célula. O gene C e a região pré-core codificam o HBcAg e o HBeAg. O HBcAg induz à formação de anticorpos específicos (anti-HBc) pelos indivíduos infectados. O anti-HBc aparece no soro logo após o surgimento do HBsAg.

Via de regra, o anticorpo anti-HBc IgM indica infecção aguda, e o anticorpo anti-HBc IgG permite inferir que se trata de infecção progressiva ou crônica. O HBeAg surge no soro em estágios precoces da infecção, pode induzir a formação de anticorpos específicos Anti-HBe (soro conversão), e se associa à infectividade viral. O gene X codifica a proteína X, que é transativadora da transcrição viral. Tal proteína está associada à etapa de transcrição do DNA do VHB. O gene P codifica a DNA polimerase, enzima que duplica o DNA e que possui atividade de transcriptase reversa. Possibilita a produção de DNA a partir de RNA precursor.

#### ***1.2.4 Replicação Viral***

A replicação viral ocorre predominantemente nos hepatócitos. O vírus se liga à célula por meio do peptídeo p39, perde seu envoltório, e é inoculado. O DNA do VHB vai até o núcleo, onde perde a disposição circular pela ação da DNA polimerase, convertendo-se em DNA super helicoidal (ccc-DNA). O ccc-DNA serve como molde para o RNAm, que é copiado várias vezes. No citoplasma o RNAm codifica as proteínas do core, ao mesmo tempo em que ocorre a transcrição reversa do pré-genoma em DNA. As proteínas do core vão encapsular o RNAm e a DNA polimerase, que são envolvidos pelo envelope externo. Esta partícula viral completa deixa a célula e vai infectar uma nova célula.

A classificação genômica do VHB foi inicialmente relatada a partir de diferenças nas sequências de aminoácidos do antígeno HBs. Nesse antígeno há o determinante de grupo denominado “a”, comum a todos os sorotipos, e quatro determinantes de subtipos: “d, y, w, r”. Esses determinantes aparecem combinados, formando 9 subtipos diferentes: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ e adrq-.

Posteriormente, uma nova classificação foi desenvolvida, baseada na comparação de toda a sequência genética do vírus e não somente relacionada ao HBsAg. Essa variabilidade genética se traduz na presença dos diferentes genótipos e mutações espontâneas ou induzidas por tratamento. Atualmente são conhecidos dez genótipos, denominados de A a

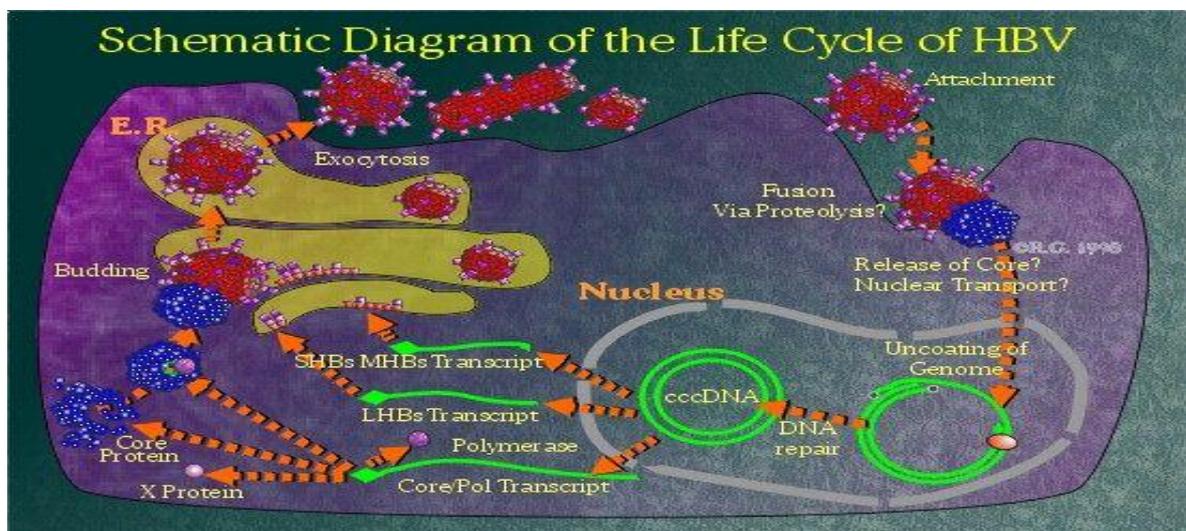
J, com base em variações maiores que 8% dos nucleotídeos presentes no genoma viral.

### 1.2.5 Resposta Imune à Infecção pelo VHB

A eliminação do VHB na infecção aguda está associada a uma resposta policlonal e multiespecífica dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ aos epítomos do VHB. Na resposta aguda a maior parte dos vírions do VHB são eliminados na fase de incubação sem a destruição de células hepáticas devido à ação de citocinas antivirais TNF e IFN $\gamma$  produzidas pela resposta inata e adaptativa por mecanismo não citolítico mediado por células não T. (BARONE; VISO, 2006).

Na infecção pelo VHB, as respostas iniciais (após a primeira semana da infecção) não são específicas (imunidade inata), sendo mediadas pelas células imunes que reconhecem as células infectadas e respondem com a produção de interferon tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ) e tipo II (IFN $\gamma$ ), que mediam a síntese viral por indução de diversas proteínas. Além disso, IFN $\alpha/\beta$  e IFN $\gamma$  recrutam e ativam macrófagos (incluindo as células de Kupffer), que secretam citocinas como TNF e IL-12, sendo que essa última ativa as células natural killer (NK), são ativadas após reconhecerem que o complexo de histocompatibilidade classe I (MHC-I) está expresso fracamente (ou não está expresso), agindo na destruição das células infectadas diretamente (através de lise celular) ou mediada pela produção de TNF e IFN $\gamma$ . As células de Kupffer são importantes na inibição da replicação do VHB através da produção de IFN $\alpha/\beta$ , TNF e IFN $\gamma$ , além do recrutamento de linfócitos T e células NK (BARONE; VISO, 2006).

**Figura 03** - Ciclo de vida do vírus da Hepatite B



A resposta celular contra o VHB é mediada por linfócitos T, que são responsáveis pela lesão hepática tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. A resposta imune adaptativa ao VHB é detectada semanas após a inoculação sendo iniciada com o aumento da replicação viral, podendo, nesse período, serem detectados linfócitos T específicos, tanto CD4+ como CD8+.

Estudos sugerem que os hepatócitos requerem altas doses de antígenos do VHB para induzir a produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T CD8+ ativados, na presença de pequenas quantidades de antígenos AgHBs ou AgHBe os hepatócitos preferencialmente estimulam a degranulação dos linfócitos CD8+ com reduzida expansão clonal e apoptose. Linfócitos T CD4+ reconhecem os antígenos peptídicos exógenos através de moléculas de complexo de histocompatibilidade classe II(MHC-II) de células apresentadoras de antígeno (APC). Por outro lado, são linfócitos T CD8+ que reconhecem e direcionam as células novas que exibem antígenos virais sintetizados endogenamente apresentados por moléculas de MHC-I (BARONE; VISO, 2006; CHANG, 2010).

Um estudo realizado por You *et al* (2009) demonstrou que a composição de subpopulações de linfócitos T em sangue periférico é diferente entre os diversos estágios clínicos da hepatite B crônica, indicando que pacientes na fase imunotolerante apresentaram o maior número de células T CD8+ e o menor número de células T CD4+ quando comparados com pacientes nas outras duas fases.

Durante a infecção crônica há uma diminuição no equilíbrio das subpopulações de linfócitos T, que está relacionado com um aumento no número de linfócitos T CD8+ e um decréscimo de linfócitos T CD4+. Foi demonstrado que uma insuficiência de células T estava associada ao nível de replicação do vírus, indicando que a carga viral é um forte fator preditivo para subpopulações de linfócitos T. O papel fundamental dos linfócitos T CD8+ no clareamento e na patogenia da hepatite B tem sido demonstrado em experimentos com chipanzés, nos quais a depleção de células T CD8+ (mas não de células T CD4+) alteraram o curso clínico e virológico, embora células inflamatórias não específicas possam contribuir para danos hepáticos. Apesar de linfócitos T CD8+ contribuírem para tais danos, essas interações resultam na síntese de citocinas antivirais que podem curar os hepatócitos infectados, levando a uma resolução da infecção (CHANG, 2010).

Os pacientes cronicamente infectados que adquirem VHB na idade adulta, geralmente apresentam um defeito na resposta específica dos linfócitos T. A ativação prolongada de linfócitos T causada por altos níveis de antígenos virais pode resultar no esgotamento de células T e deleção clonal. A extensão dessas vias imunes inibitórias pode

definir o curso da hepatite crônica de estado imunotolerante a imunoativo. A persistência do VHB tem sido associada com a indução de células T regulatórias que suprimem células T efetoras específicas para VHB. A frequência de células T regulatórias aumentada no sangue periférico e no fígado de pacientes infectados com VHB correlaciona-se com altos títulos de carga viral. Em paciente com carcinoma hepatocelular associado ao VHB, a frequência de células T regulatórias circulantes também foi correlacionada com a progressão da doença e mortalidade (BARONE; VISO, 2006; CHANG, 2010).

### ***1.2.6 Aspectos Clínicos e Patológicos***

O VHB é responsável por quadros de hepatite aguda, muitas vezes anictéricos. Em cerca de 90 a 95% dos casos, a infecção aguda regride com o desaparecimento do antígeno de superfície (HBsAg). Em cerca de 1% dos casos a infecção aguda pode ter uma evolução fulminante. E, em cinco a dez por cento das infecções, adquiridas na idade adulta, evoluem para a cronicidade com o risco de evoluir para cirrose, carcinoma hepatocelular se não for detectado e tratado adequadamente.

A presença de marcadores sorológicos da infecção (HBsAg e anti-HBc) em indivíduos sem quadro clínico progressivo detectado indica que episódios subclínicos podem ser frequentes. Fatores relacionados ao hospedeiro e ao VHB influenciam a forma de apresentação e progressão da doença. A idade avançada no momento da infecção, o gênero masculino, o consumo abusivo de álcool e a co-infecção com vírus da hepatite C ou D, ou com o HIV são fatores relacionados com a evolução para cirrose e insuficiência hepatocelular.

O VHB não apresenta efeito citopático direto, sendo a lesão hepática mediada pelo sistema imune, enquanto que a gravidade da doença está relacionada à intensidade desta resposta. Na história da infecção crônica por vírus B são estabelecidos três estágios.

O primeiro estágio, caracterizado pela tolerância imune, pode durar apenas duas semanas em adultos saudáveis, mas pode levar várias décadas, em especial, quando a infecção ocorre no período neonatal ou na infância. Durante esta fase, há replicação viral ativa, evidenciada pela presença do antígeno HBe e por elevadas taxas do ácido nucléico do (VHB-DNA) no soro, sem que haja sintomas ou alterações significativas das aminotransferases (AST e ALT). A segunda fase é caracterizada pela presença da resposta imune, levando à inflamação e necrose dos hepatócitos. Nessa fase, permanecem detectáveis no soro o HBeAg e o VHB-DNA, elevando-se as taxas das aminotransferases particularmente da ALT.

Essa fase da infecção pode durar 10 ou mais anos, culminando com a presença de

cirrose hepática e complicações. A terceira fase é caracterizada pela parada da replicação viral, resolução do processo necroinflamatório, negatificação do HBeAg e o surgimento do anticorpo anti-HBe (soro conversão parcial). Observa-se a redução dos níveis de VHB-DNA no soro e a ALT retorna a níveis normais. Cerca de 50% dos indivíduos alcançam a soro conversão do HBe em 5 anos, enquanto 70% em 10 anos.

Neste estado, chamado de portador inativo, o HBsAg está presente no soro e o VHB-DNA permanece detectável em níveis reduzidos. Os portadores inativos podem permanecer neste estado pelo resto da vida, entretanto, em alguns casos, pode haver reativação da fase de replicação induzida por imunossupressão, raramente de forma espontânea. A resolução completa com soro conversão HBsAg/anti-HBs é rara em pacientes com infecção crônica pelo VHB, girando em torno de 0,5% ao ano. Em determinados casos, a hepatite crônica permanece ativa apesar do soro conversão do HBeAg, com a ALT elevada de forma intermitente ou persistente, e com atividade necro-inflamatória no tecido hepático.

Resumidamente, a hepatite crônica HBeAg positivo caracteriza-se pela presença do antígeno e, elevação persistente ou intermitente da ALT, carga viral do VHB maior ou igual a  $10^5$  cópias por mililitros (cp/ml) e a presença de atividade necro-inflamatória moderada ou grave no tecido hepático. A hepatite crônica HBeAg negativo esta presente quando há ausência do antígeno no soro, carga viral do VHB maior ou igual a  $10^4$  cp/ml e biopsia hepática normal ou com alterações mínimas.

Pacientes com hepatite crônica pelo VHB apresentam incidência cumulativa de progressão para cirrose da ordem de 8 a 20% a cada cinco anos. Sem tratamento, a cirrose descompensada evolui com complicações como ascite, hemorragia digestiva e encefalopatia hepática.

A carga viral do VHB parece estar relacionada com a progressão da doença hepática, enquanto alguns estudos relacionam a viremia com o surgimento do CHC. Estudos também relatam a influencia da variabilidade genética do vírus na evolução e progressão da doença. O desenvolvimento do CHC em indivíduos com doença avançada ou cirrose, via de regra, tem como desfecho o transplante hepático.

### ***1.2.7 Transmissão***

O VHB esta presente no sangue, leite materno, saliva, sêmen, secreções vaginais de indivíduos contaminados sendo transmitido pelo contato desses fluidos corporais. É frequente, residentes no mesmo domicílio se infectar com VHB. Vários artigos relatam a

transmissão intrafamiliar do VHB em diferentes áreas geográficas.

As transmissões vertical e perinatal são as principais formas de contágio no mundo (21). A transmissão parenteral continua a ser importante no grupo dos toxicod dependentes com uso de drogas endovenosas. Tem maior risco de contaminação os recém-nascidos de mães portadoras, os contactantes portadores do VHB, os profissionais de saúde, as pessoas com parceiros sexuais múltiplos e os presidiários. (CASTRO, 1999).

No Brasil, a soro prevalência em indivíduos a partir dos 16 anos de idade, sugere que a transmissão perinatal não é a principal via de infecção. São descritos casos esporádicos e maior prevalência em algumas famílias de portadores sem que as vias de transmissão sejam conhecidas. É possível que nestes casos a transmissão percutânea inaparente desempenhe algum papel (CASTRO, 1999).

O risco de infecção em poli transfundidos e hemodialisados foi reduzido devido a alterações nos protocolos de biossegurança dos respectivos procedimentos. A rejeição de doadores de sangue com sorologia positiva para o VHB (Testes de Ácidos Nucléicos – NAT) e daqueles com alterações das aminotransferases reduziu de forma significativa a incidência de casos de hepatite pós-transfusional. A inativação do vírus pelo calor nos derivados de sangue, a adoção de medidas de higiene, utilização de agulhas e outros materiais descartáveis bem como a esterilização de instrumentos médicos permitiram redução acentuada de casos adquiridos de hepatite B (CASTRO, 1999).

### ***1.2.8 Epidemiologia***

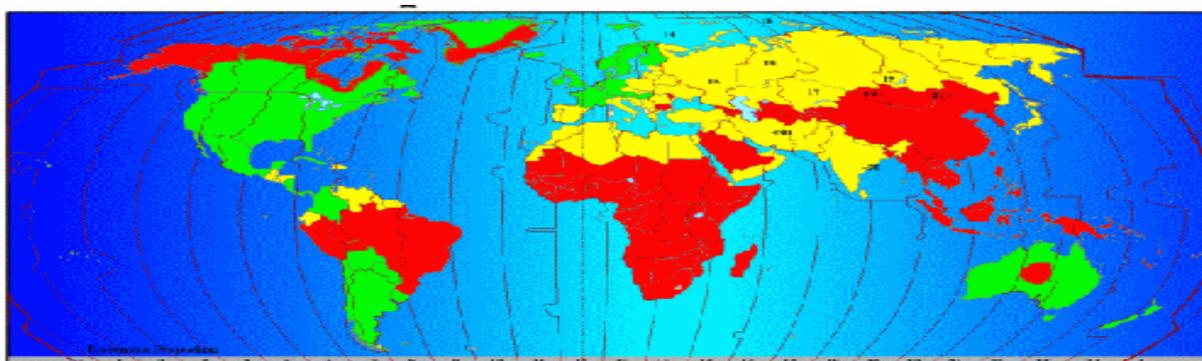
O vírus da hepatite B encontra-se globalmente distribuído. Apesar de existirem indivíduos infectados em todo o mundo, a prevalência do vírus está decrescendo nos países desenvolvidos, por conta da vacinação e pesquisas que têm permitido um conhecimento crescente dos mecanismos de replicação do vírus.

A OMS estimava, em 1992, que mais de um terço da humanidade apresentava marcadores da infecção pelo VHB e existiriam cerca de 350 milhões de portadores crônicos do vírus, dos quais cerca de 65 milhões faleceriam em consequência da infecção (CASTRO, 1999).

De acordo com o grau de endemicidade, as diferentes regiões do mundo podem ser classificadas como de baixa, media e alto prevalência. Nas regiões de baixa prevalência, o risco de adquirir a infecção não é significativo, onde a percentagem de indivíduos cronicamente infectados é inferior a 2%. Nas regiões consideradas de prevalência

intermediária a presença da infecção crônica varia entre 2 a 8%. Nestas regiões a presença de marcadores sorológicos que indicam infecção progressiva é de 20 a 50%. Nas áreas de alta prevalência o risco de adquirir infecção pela VHB é superior a 60%, e a prevalência da infecção crônica é superior a 8% podendo chegar a 25% (11, 12, 13). A distribuição geográfica do vírus varia em três níveis de endemia de acordo com a taxa de prevalência do HBsAg (Figura 04).

**Figura 04** - Distribuição geográfica da infecção crônica por VHB. Alto em vermelho (>8%), intermediário em amarelo (2-7%) e baixo em verde (<2%).



Endemias elevadas são encontradas na África, Sudoeste Asiático, Sul da China, Bacia Amazônica, Alasca e Groelândia com prevalência variando entre 8 a 20% da população. Onde 70 a 90% portadoras da infecção tiveram contato com o vírus. A transmissão vertical do VHB assume nessas regiões uma importância primordial em consequência, o grupo etário predominante é o de crianças. Nas regiões de endemia média, como: Europa Oriental, Próximo Oriente e Bacia Mediterrânea varia de 2 a 7% da população em portadoras do vírus, enquanto que nas regiões de baixa endemia como Europa Ocidental, América do Norte e Austrália a prevalência de portadoras é inferior a 2%. Nas regiões de média e baixa endemia a infecção predomina em adolescentes e adultos jovens (CASTRO, 1999).

O território brasileiro pode ser dividido em regiões de variadas prevalências da infecção pelo VHB. Sendo a Amazônia uma região de alta prevalência. O restante do país apresenta prevalência intermediária (13). Entre 1996 e 1997 foi realizado estudo epidemiológico populacional envolvendo vários países da América latina. Neste trabalho pesquisou-se a presença do anti-HBc IgG. Demonstrou-se soro prevalência de 7,9% no Brasil, excluindo a região amazônica (14).

Foram classificados oito genótipos com o sequenciamento das bases nitrogenadas do genoma do vírus da hepatite B nas regiões pré S, ou gene S, que é classificada por uma diferença de pelo menos 8% na sequência de nucleotídeos. Foram identificados por as letras A, B, C, D, E, F, G e H e a maioria deles mostra distribuição geográfica distinta (2,3).

Foram descritos posteriormente mais dois genótipos. O genótipo I, encontrado em populações do Vietnã e Laos e o genótipo J nas ilhas de Kyukiu e no Japão (referencia). Observou-se que esses genótipos possuem uma distribuição geográfica variável com predominância em determinadas regiões, sugerindo associação com o perfil epidemiológico de cada população.

Está caracterizado que o genótipo A é encontrado com maior prevalência na América do Norte e Europa Setentrional; genótipos B e C na Ásia Oriental, incluindo a China; genótipo D na Europa Meridional Oriente Médio e Índia; genótipo E na África Ocidental e África do Sul; genótipo F na América do Sul e Central; genótipo G nos Estados Unidos e Europa e genótipo H na América Central e na Califórnia (PARANA; ALMEIDA, 2005; OKANOUE; MINAMI, 2006). (Quadro 01)

**Quadro 01** – Prevalência mundial dos genótipos do VHB

GENÓTIPOS	REGIÃO/PAÍS
A	África, América do Norte e Europa Setentrional
B	Ásia
C	Ásia
D	Europa Meridional, Oriente Médio e Índia
E	África Ocidental e América do Sul
F	América do Sul e América Central
G	EUA e Europa
H	América Central e na Califórnia
I	Vietnã e Laos
J	ilhas de Kyukiu e no Japão

### ***1.2.9 Diagnóstico***

#### **1.2.9.1 Diagnóstico Sorológico e Molecular**

O diagnóstico das formas clínicas da hepatite B realiza-se através de técnicas sorológicas e moleculares. Tais técnicas revelam-se fundamentais não apenas para o diagnóstico, mas também são úteis no seguimento da infecção viral, na avaliação do estado clínico do paciente e na monitorização da terapêutica específica (18,19). As descobertas realizadas nas áreas da virologia e da biologia molecular desses vírus, foram progressivamente incorporados à rotina dos laboratórios, permitindo aos clínicos acesso a técnicas capazes de avaliar a carga viral circulante, o índice de replicação do agente infeccioso e a eficiência de novas medicações utilizadas no tratamento dessa virose (25).

A fase aguda da hepatite B caracteriza-se pela elevada replicação viral e ocorre nas formas sintomáticas, ictéricas, anictéricas e oligossintomáticas da doença. O período de incubação varia de 2 a 6 meses. Considera-se que 6 semanas após a contaminação, o HBsAg encontra-se no soro, podendo permanecer positivo nos casos agudos até 180 dias quando vai dando lugar ao surgimento do anticorpo anti-HBs. O aparecimento do anticorpo anti-HBs indica resolução do processo, conferindo imunidade duradoura à infecção pelo VHB. Cerca de 5% a 10% dos pacientes persistem com o HBsAg no soro após 6 meses, tornando-se portadores crônicos do vírus (19).

Os anticorpos dirigidos contra o HBcAg (antígeno core do vírus B) são inicialmente a fração IgM (anti-HBc IgM) que é um marcador considerado no diagnóstico de fase aguda da hepatite B. Algumas vezes encontrados em indivíduos na fase crônica da doença ou nos períodos de reativação. O anticorpo IgG presente na vigência da infecção crônica, aumenta progressivamente seus títulos no soro, permanecendo positivo em valores mais baixos, na maioria dos indivíduos, pelo resto da vida mesmo após a cura da virose. O anti-HBc IgG é considerado o marcador clínico e epidemiológico mais importante da infecção pelo VHB.

Detecta-se o antígeno HBe (HBeAg) desde a fase inicial da infecção, antes do surgimento do quadro clínico da doença aguda, constituindo-se um marcador indicativo de replicação viral. Sua duração nessa fase revela-se efêmera, desaparecendo em poucas semanas e dando lugar ao surgimento do anti-HBe. Sua persistência, além de 3 meses no sangue, pode indicar evolução para a cronicidade. Embora estando presentes na vigência da fase aguda, o DNA do VHB e a atividade da DNA polimerase não são marcadores utilizados nessa fase. A

detecção do HBsAg, anti-HBc (IgM e IgG) e HBeAg/anti-HBe é feita utilizando técnicas imunoenzimáticas (ELISA), eletroquimioluminescência (EQL) e, raramente, radioimunoensaio (RIA). Detecta-se o DNA-viral por PCR e a atividade da DNA polimerase, hoje pouco utilizada, através da incorporação de ATP marcado com  $^3\text{H}$  (18 19 23 50).

O perfil sorológico do indivíduo com hepatite B que apresenta sorologia positiva para o HBsAg (IgG) e replicação viral HBeAg soro reagente (SR), ou alguma das referidas situações: a) [HBsAg (+) e DNA-VHB (+)]; b) [anti-HBe (+) e DNA-VHB (-)]; c) HBeAg (-) e anti-HBe (+) ou anti-HBe (+) e DNA-VHB (+), demonstram infecção com mutante pré-core o qual se revela importante na indicação terapêutica, uma vez que tal variante do vírus responde mal à terapia com interferon (39).

Co-infecções com outros vírus podem ser detectados sorologicamente: (1) vírus da hepatite D, (2) o anti-delta (anti-HD) total, conjuntamente com o RNA do vírus detectado por PCR, (3) na co-infecção com o vírus C, o anti-VHC (ELISA de 3ª geração), com confirmação da positividade por PCR para detecção do RNA do VHC, o que constitui o método adequado para este diagnóstico (26).

A biópsia hepática é indicada na avaliação dos pacientes cronicamente infectados pelo VHB e com ela pode-se avaliar a magnitude do processo inflamatório e da fibrose. Através de técnicas de imunohistoquímica pode-se detectar a presença de antígenos S e Core do VHB no tecido hepático. Na co-infecção pelo vírus D, a imunohistoquímica pode revelar o antígeno da hepatite D (AgHD) no núcleo dos hepatócitos.

#### 1.2.9.2 Genotipagem Viral e Mutações associadas aos antivirais Genótipos e Subtipos

Os genótipos do VHB, nos últimos anos, têm sido relacionados à progressão da doença hepática, assim como a resposta às terapias antivirais [55, 69, 85, 90, 113].

O curso da infecção pelo VHB depende de muitos fatores que podem influenciar a interação vírus-hospedeiro, sendo provavelmente de relevância, a variabilidade genética do vírus, incluindo genótipos e subtipos, os quais podem influenciar a expressão dos antígenos virais [54, 59, 69, 115].

Análises do genoma revelaram 10 genótipos (A-J) do VHB, com distribuição geográfica mundial distinta [82, 85, 131]. Os genótipos A e D são mais prevalentes no Brasil, Europa, América do Norte, Índia e África; o genótipo B e o C são encontrados com maior frequência no Sudeste da Ásia, China e Japão; o genótipo E é restrito à África; o genótipo F é encontrado na população nativa da América do Sul e Central; o genótipo G foi descrito na

França, Estados Unidos, México e o genótipo H foi encontrado na América Central [7, 69, 71, 85, 104].

Além dos genótipos há 4 principais subtipos sorológicos do VHB (adw, ayw, adr e ayr) ou 9 subtipos secundários: adw (adw2, adw4); ayw (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4). O determinante “a” é comum à maioria dos vírus e é atribuído a um epítipo descontínuo, ao qual são dirigidos anticorpos neutralizantes anti-HBs. O determinante “a” faz parte da região hidrofílica principal do HBsAg e sua estrutura terciária é importante para sua antigenicidade [22, 141].

Esses subtipos dependem da variabilidade dos aminoácidos do HBsAg. Na posição 122, a Lisina determina a especificidade *d*, enquanto a Arginina determina a *y*. A posição 160 determina a especificidade *w* na presença de uma Lisina e *r* na presença da Arginina. Na posição 127 uma Prolina determina as especificidades *w1* e *w2*, a Treonina determina a *w3* e a Leucina ou Isoleucina determina a *w4*. A presença de uma Alanina na posição 159 determina o subtipo *adrq+* e uma Glicina na mesma posição determina *adrq-* [47, 93, 106].

A divergência das sequências do genoma completo em um mesmo subtipo é de aproximadamente 8%, semelhante à encontrada entre diferentes subtipos. Assim, a subtipagem não reflete uma variação genotípica nas sequências codificadoras da proteína S [110].

A distribuição geográfica dos genótipos pode mudar devido à migração e ao comportamento de risco populacional. O VHB diverge entre os genótipos de acordo com a distribuição populacional nos diferentes continentes. Entretanto, esses estudos não são completos em algumas partes do mundo, inclusive a América do Sul [102, 108, 135].

A distribuição genotípica do VHB e sua correlação com o curso clínico da doença hepática não estão claros [39, 62]. A maioria dos estudos indica que a gravidade da hepatite crônica é maior em pacientes com genótipo C comparado ao genótipo B [66, 85]. Estudo com pacientes de Taiwan mostraram que a cirrose e o CHC são mais frequentes em portadores do genótipo C do que B [85]. O genótipo C é mais prevalente em pacientes HBeAg positivos do que o genótipo B [31]. A literatura mostra que o risco de CHC está relacionado com o aumento da carga viral associado ao genótipo do VHB. O genótipo D está associado com a gravidade da doença hepática quando comparado ao genótipo A e pode favorecer a ocorrência de CHC em pacientes jovens (69). Na Europa, a maioria dos pacientes com o genótipo A tem hepatite crônica, e a dos pacientes com o genótipo D têm hepatite aguda (95).

### 1.2.9.3 Mutações do VHB

As mutações do VHB em pacientes com hepatite crônica são frequentes, sendo maiores naqueles imunossuprimidos, como pacientes em hemodiálise [34, 87, 109], em quimioterapia, diabéticos [109, 116] e nos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) [4, 56, 109]. Diversas são as mutações existentes, entretanto a variante mais encontrada nas infecções crônicas do VHB é a mutação pré-core. Descrita na Itália [19], envolvia casos de pacientes com sorologia negativa para o HBeAg, entretanto positiva para o HBsAg, anti-HBc, anti-HBe, presença de DNA viral e HBcAg no fígado. A presença da sequência “selvagem” foi denominada M0 e da mutação no nucleotídeo 1896 de M1. Essa mutação ocorre com a troca de guanina (G) para adenina (A) no nucleotídeo 1896 (G1896A) e a presença das duas mutações (G1896A/G1899A) de M2 [5, 29, 79, 81]. Essa mutação traduz um impedimento da produção do HBeAg. Tais casos implicam numa gravidade da doença. Talvez devido à ausência do papel modulador da resposta imune desempenhado pelo HBeAg, podendo evoluir com hepatite crônica. [142]. Essas mutações estão associadas a uma progressão rápida da infecção pelo VHB, com maior frequência de evolução para cirrose e carcinoma [137].

A mutação na região pré-core é dependente do genótipo e encontrada com maior frequência em pacientes com genótipo D, sendo incomum em pacientes com o genótipo A [30, 52, 83, 112, 121]. Essa mutação é mais frequente no genótipo B em relação ao C onde foi relatado que não está relacionada com a soroconversão para o anti-HBe [132].

Outra mutação observada é a do Promotor Basal do Core (BCP), onde o HBeAg também é negativo e existe o padrão HBsAg, anti-HBe e DNA viral positivos. Nestes casos, no nucleotídeo 1762, ocorre troca de adenina (A) para timina (T) – (A1762T), e de guanina (G) para adenina (A) no nucleotídeo 1764 (G1764A). Essas duas mutações fazem com que haja uma diminuição da produção do HBeAg [28]. Na população americana tais mutações são comuns nos genótipos C e D [72]. Alguns estudos revelam que mutações na região do core aumentam a taxa de replicação viral do VHB [30] e estes nucleotídeos acarretam hepatite crônica com maior atividade, doença mais grave após transplante de fígado, CHC e hepatites fulminantes [9]. Essas mutações ocorrem com maior frequência no genótipo C do que no B, independente do estado do HBeAg [30]. A mutação do gene X no BCP pode aumentar o risco de CHC [26, 73].

### ***1.2.10 Prevenção e Tratamento***

A partir da década de 90, estratégias de prevenção e controle da hepatite B vem sendo implementadas em diversos países. Têm sido recomendados, desde então, os programas de vacinação em massa, a seleção em bancos de sangue e o controle da transmissão sexual e perinatal (2). Embora tais medidas tenham propiciado a diminuição na incidência dos casos da hepatite B, ainda permanece grande o número de indivíduos infectados no mundo (2, 3, 12,13).

No Brasil, o Ministério da Saúde estima, atualmente, que cerca de 2 milhões de indivíduos tenham sido infectados pelo VHB. A vacina contra hepatite B faz parte do calendário vacinal nacional, sendo oferecida aos menores de 49 anos de idade e a indivíduos em situações de risco (22).

O objetivo do tratamento para hepatite B crônica é a supressão sustentada da replicação viral, com a remissão da atividade necroinflamatória no tecido hepático, visando à prevenção da cirrose hepática e do carcinoma hepatocelular (27). Atualmente não há consenso quanto à forma de tratamento.

O primeiro agente terapêutico utilizado no tratamento da infecção pelo VHB foi o interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), seguindo-se o interferon de longa ação (interferon peguilado), os análogos nucleosídeos e nucleotídeos. Embora se tenha conseguido elevada frequência na supressão de replicação viral, tais drogas mostram baixas taxas de resposta sustentada e, por vezes, efeitos adversos (9).

Quanto ao tratamento, pacientes com genótipos C e D parecem ter menores taxas de resposta ao uso do interferon do que os infectados com genótipos B e A respectivamente (32,33). Há tentativas de correlacionar a presença dos genótipos A ou D com o risco de mutantes resistentes ao tratamento com Lamivudina. Zollner e colaboradores reportaram incidência maior da mutação YMDD em pacientes infectados com genótipo A, quando comparados com portadores dos genótipos D (34).

Em que pese o fato de apenas uma parcela dos indivíduos responder ao tratamento em virtude das mutações associadas à resistência, estudos de seguimento comprovaram que medicamentos diminuem a atividade inflamatória hepática e deprimem a replicação viral aumentando a taxa de soro conversão do antígeno “e” (HBeAg) para o anticorpo correspondente (anti-HBe), diminuindo a carga viral (10, 22, 28, 30).

Apesar de discreta superioridade dos resultados do interferon alfa sobre os da Lamivudina (14), a toxicidade do primeiro, elevado índice de efeitos colaterais e necessidade

de aplicação parenteral fizeram com que a Lamivudina, de uso oral e com baixa frequência de efeitos adversos, passasse a ser administrada em todo o mundo, inclusive em pacientes com insuficiência hepática, coisa impossível com o interferon alfa.

Alguns pacientes com insuficiência hepática grave deixaram de necessitar de transplante hepático, graças à Lamivudina (28). Embora, a Lamivudina possa reduzir a carga viral do VHB o tratamento prolongado pode ser necessário visando atingir os desfechos esperados (12). Isso trouxe como complicação, o surgimento de cepas resistentes à Lamivudina (mutantes YMDD), que pode atingir 60% dos pacientes após três anos de tratamento (5 15). Estas mutações que conferem resistência à Lamivudina podem recrudescer a hepatite B crônica, trazendo de volta o risco das complicações e, por vezes, produzindo graves “*flares*” de atividade necro-inflamatória hepática (7).

Novos análogos nucleot(s) ídicos, como o Adefovir dipivoxil, e principalmente o Entecavir e Tenofovir, foram desenvolvidos e aprovados para uso clínico (3 16). Tais medicações têm demonstrado menores índices de cepas resistentes e a mesma segurança que a Lamivudina. No entanto, essas novas drogas devem ser utilizadas durante longo tempo, sendo o Entecavir e o Tenofovir as drogas que apresentam maior potência e maior barreira genética sendo, portanto as drogas de escolha no tratamento da hepatite crônica e cirrose pelo vírus B. (23).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Conhecer a prevalência dos genótipos do VHB e as respectivas mutações de resistência associadas aos antivirais em pacientes com hepatite B crônica atendidos nos Serviços de Referência do Estado do Ceará.

### **2.2 Específicos:**

1. Mensurar a carga viral dos pacientes com hepatite B crônica por PCR em tempo real;
2. Verificar a distribuição genotípica prevalente na população em estudo;
3. Identificar mutações associadas aos antivirais do VHB
4. Relacionar as mutações encontradas com os genótipos prevalentes na população;
5. Construir uma árvore filogenética representativa dos genótipos encontrados no estado do Ceará.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento experimental**

Esse é um estudo de seguimento aberto que foi iniciado em 2012 através da coleta de soro e realização de quantificação da carga viral-VHB de 142 pacientes encaminhados com hepatite B crônica ao Laboratório Central do Ceará (LACEN-CE). O sequenciamento das amostras de sangue para genotipagem do VHB e identificação de mutações associadas à resistência aos antivirais foram realizados em parceria com a Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

#### **3.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos no estudo pacientes com hepatite B crônica, encaminhadas dos hospitais de referência do Estado do Ceará, Hospital de doenças infecciosas (HSJ), Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Hospital Geral de Fortaleza (HGF) em Fortaleza e serviços especializados (SAE) que funcionam nos demais municípios do Estado do Ceará. Foram observados critérios clínicos e laboratoriais rotineiros para o diagnóstico de hepatite B crônica, sendo considerado imperativo para o estudo a soro positividade de HBsAg por mais de 6 (seis) meses.

O protocolo foi submetido e aprovado pelo o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand – CEP/MEAC/UFC, de N° 084/09 como parte da pesquisa financiada pela FUNCAP.

Foi aplicada uma ficha epidemio-investigatória (Anexo A) constando de dados pessoais, procedência, causa provável da infecção, tratamento, HBeAg e Anti-HBe positivo ou negativo (SR ou SNR).

##### **3.2.1 Critérios de inclusão**

Foram convidados a participar do estudo pacientes com hepatite B crônica, HBsAg SR a mais de 6 (seis) meses. Foi lido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e os pacientes que concordaram em participar foram incluídos no estudo após assinar o TCLE. No trabalho foi tido como critério para a seleção às amostras que o paciente tivesse

uma carga viral acima de 2.000UI/mL para ser realizadas pesquisas de mutações e genotipagem, por sequenciamento.

### **3.2.2 Critérios de exclusão**

No estudo epidemiológico por corte transversal foram utilizados os seguintes critérios de exclusão foram:

- a) Pacientes que se negaram a assinar o TCLE
- b) Pacientes com HBsAg negativo
- c) Pacientes com carga viral abaixo do limite de detecção.

### **3.3 Coleta e separação do plasma**

Foram coletados 5 mL de sangue com anticoagulante (EDTA) de cada paciente que concordou em participar do estudo. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 1300 x g por 15 minutos e em seguida o plasma foi separadas em tubos livres de RNAses e DNAses em alíquotas de 1,2 mL. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da realização dos testes moleculares.

### **3.4 Quantificação da carga viral do VHB**

Foi realizada a carga viral do VHB de cada paciente no prazo máximo de 5 (cinco) dias após a realização da coleta. O método utilizado foi “Real Time VHB”, laboratório Abbott, no LACEN-CE. As amostras de sangue foram colhidas e processadas para obtenção do plasma na presença de EDTA de acordo com a padronização do Ministério da Saúde (MS).

#### **3.4.1 PCR em tempo real**

Para realização da pesquisa utilizou-se ensaio automatizado. Foi necessário construir uma curva de calibração para determinar a concentração do DNA-alvo das amostras e dos controles, antes de cada rotina. Foram utilizados dois calibradores, dosados em triplicata para gerar uma curva de calibração, a qual foi armazenada na memória do equipamento (m2000rt).

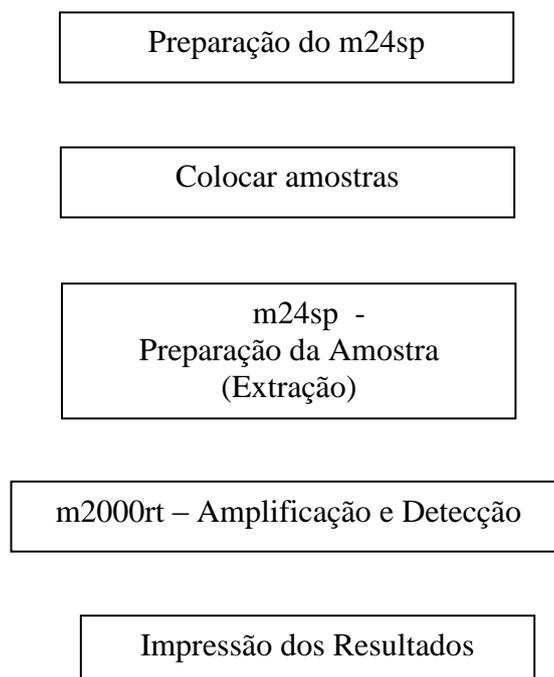
A concentração de DNA em uma amostra foi calculada a partir de ciclos de amplificação (threshold cycle, Ct) e da curva de calibração. Os resultados gerados foram automaticamente apresentados na estação de trabalho do equipamento.

A extração de DNA foi iniciada com a utilização de um tampão de lise que contém isotiocianato de guanidina (sal caotrópico) para romper as pontes de hidrogênio e expor o DNA sem quebrar as proteínas, além de ter propriedades específicas para inibir as DNAses e RNAses. Em seguida foi utilizado um tampão de lavagem (H<sub>2</sub>O + 3.4.1.1 Extração (m24sp) etanol) para retirar impurezas das amostras, interferentes na reação e precipitar o ácido nucleico purificado. Por fim, utilizou-se um tampão de eluição, uma solução surfactante não iônica, que dissolve os lipídeos e direciona o DNA para as partículas magnéticas. As partículas magnéticas (SiO<sub>2</sub>) captura o DNA formando pontes hidrofílicas.

#### 3.4.1.1 Amplificação e detecção (m2000rt)

Após a extração é adicionado uma enzima a proteinase K para liberar o ácido nucleico das partículas magnéticas e uma solução formada por nucleotídeos, *primers*, enzima Taq polimerase, cloreto de Mg<sup>++</sup> e sondas alvo.

Na parte interna do equipamento ocorrem as reações de anelamento iniciando com os *primers* e os nucleotídeos/BN que se aproximam das sequências complementares da amostra a uma temperatura ideal. Catalisada pelo Mg<sup>++</sup>, a enzima Taq polimerase fará a extensão da fita. Elevou-se a temperatura para abertura das fitas formadas que já se estavam ligadas as sondas-alvo fluorescentes que emitem sinais que foram captados e mostrados a cada ciclo da reação.

**Figura 05** - Fluxograma de trabalho para quantificação da carga viral no LACEN-CE

### 3.5 Genotipagem e Mutações do VHB

A pesquisa de mutações e genótipos foi realizada pelo sequenciamento de Sanger, da região da polimerase do VHB, no Laboratório de Hepatites Virais da FIOCRUZ-RJ.

As etapas para o sequenciamento do DNA constaram de:

Etapa 1 – Extração de DNA: nesta etapa foi utilizado o High Pure Viral Nucleic Acid Kit (marca Roche), conforme protocolo do fabricante.

Etapa 2 – Reação de amplificação (PCR), Iniciadores utilizados:

VHB 1F (5'-TAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGG-3')

VHB 4R (5'-GAAAGGCCTTGTAAGTTGGCG-3').

Etapa 3 – Eletroforese em gel de agarose: após a reação de PCR, 5 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) dos produtos obtidos foram aplicados em gel de agarose a 1%, juntamente com o marcador de pares de base, e submetidos à corrida de eletroforese para confirmar a amplificação e detectar o fragmento pesquisado.

Etapa 4 – Purificação do produto de PCR: os produtos de PCR foram purificados com o High Pure PCR Product Purification Kit (marca Roche) conforme protocolo do fabricante. A finalidade desta etapa foi purificar o DNA amplificado, eliminando possíveis nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR.

Etapa 5 – Quantificação de DNA: a fim de estimar a concentração de DNA (em

nanogramas - ngs) de cada produto de PCR purificado e estabelecer a quantidade de DNA a ser utilizada na reação de sequenciamento, 4  $\mu\text{L}$  de cada produto respectivo, e 4  $\mu\text{L}$  do marcador de peso molecular Low Mass (marca Invitrogen), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Ao final da corrida eletroforética, a intensidade das bandas do marcador (que correspondem a diferentes quantidades de DNA) foi comparada com a intensidade da banda de cada produto purificado. Foi estabelecido que seria utilizado de 5 a 20 ngs de DNA para cada reação de sequenciamento, já que deve haver proporcionalidade entre o tamanho do fragmento de interesse (neste caso em torno de 800 pares de base), e a quantidade de DNA para a reação de sequenciamento, conforme o quadro abaixo.

**Quadro 02** – Quantidade de DNA proporcional ao tamanho do fragmento

Tamanho do fragmento de DNA em pares de base (pb)	Quantidade de DNA em nanogramas (ng) a ser utilizada na reação de sequenciamento
De 100 a 200 pb	Usar de 1 a 3 ng de DNA
De 200 a 500 pb	Usar de 3 a 10 ng de DNA
De 500 a 1000 pb	Usar de 5 a 20 ng de DNA
De 1000 a 2000 pb	Usar de 10 a 40 ng de DNA
> 2000 pb	Usar de 40 a 100 ng de DNA

A quantificação de DNA foi realizada através da utilização do marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen).

Etapa 6 – Reação de sequenciamento: foram realizadas quatro reações de sequenciamento, e, portanto, quatro mixes contendo: 1 $\mu\text{L}$  do respectivo iniciador (na concentração de 3,2 picomol/reação – tabela 01); 1,5 $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento (tampão 5X) (marca Applied Biosystems); 1 $\mu\text{L}$  de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (marca Applied Biosystems) e água ultrapura livre de DNase para um volume final 10  $\mu\text{L}$ .

**Tabela 01** – PRIMERS do VHB - Gene S e Gene da polimerase

iniciador	Sequência 5'→3'	Reação	Posição*	Referência
VHB_1F	TAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGG	PCR	180-203	Mallory et al., 2011
VHB_4R	GAAAGGCCTTGTAAGTTGGCG	PCR	1120-1100	Mallory et al., 2011
VHB_2F	CATCCTGCTGCTATGCCTCATC	sequenciamento	409-430	Mallory et al., 2011
VHB_3R	GATGGGATGGGAATACAGGTGC	sequenciamento	615-594	Mallory et al., 2011

\*Posição do iniciador na sequência referência VHB-A do VHB (nº de acesso Genbank: KC510657)

A seguir, os mixes foram distribuídos nas placas de 96 poços, os DNAs purificados foram adicionados na concentração previamente estabelecida (Etapa 5). A placa foi tampada com uma tampa de borracha apropriada para placa utilizada (denominada como septa), e em seguida colocada no termociclador programado para 40 ciclos, 94°C 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Etapa 7 – Precipitação da reação de sequenciamento: a precipitação foi realizada utilizando o BigDye XTerminator Purification Kit (marca Applied Biosystems) que é composto pelas soluções SAM Solution e BigDye XTerminator Solution. Inicialmente um mix foi preparado contendo estas duas soluções, ou seja, para cada 10 µL de reação de sequenciamento foram utilizados 45 µL de SAM Solution e 10 µL de Big Dye X Terminator Solution. Em seguida, 55 µL do mix foi distribuído nos poços da placa. A foi incubada a temperatura ambiente com agitação por 30 minutos e em seguida colocada no sequenciador (3500 Series Genetic Analyzer – Applied Biosystems).

### 3.6 Alinhamento de Sequencias e Filogenia

#### 3.6.1 Sequenciamento

O sequenciamento de um vírus pode ser entendido como uma pesquisa que busca a semelhança genética com o vírus padrão. As ferramentas de bioinformática são utilizadas para fazer comparações entre as bases nitrogenadas com o padrão do gene. O Chromas Lite foi o programa usado para fazer o gráfico (cromatograma) da sequência das bases nitrogenadas sequenciadas. Este programa permite retirar bases que apresentam um sinal muito fraco ou sobreposto a outros, analisando-se apenas as regiões que apresentam boa

qualidade para o alinhamento.

O BLAST “Basic Local Alignment Search Tool” disponibiliza opções de pesquisas em banco de dados, disponível no GenBank para o VHB. Nele foi feito alinhamento múltiplo sendo possível identificar o grau de semelhança entre as sequências em estudo e as disponíveis no GenBank.

### **3.6.2 Filogenia –Árvore filogenético**

Após o sequenciamento nucleotídico, um total de 129 sequencias foram editadas e alinhadas utilizando respectivamente os programas mega 6 (Molecular Evolutionary genetics analysis) e clustal x (v.1.83). Em seguida, a identificação dos genótipos foi realizada utilizando o site: <http://hivdb.stanford.edu/VHB/VHBseq/development/VHBseq.pl?action=showSequenceForm>

A determinação dos genótipos foi realizada por análise filogenética das sequencias obtidas. Para a análise filogenética as sequencias que eram em “duplicatas”, ou seja, sequencias das amostras de pacientes que coletaram mais de uma vez, em épocas diferentes, foram excluídas, restando cento e duas sequencias (uma sequência de cada paciente). Ao alinhamento dessas sequencias, foram adicionadas 66 sequencias padrões referência, de diferentes genótipos do VHB (A ao I), obtidas do Query Genbank do programa Mega 6. A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método Neighbor-joining, modelo Kimura 2-parâmetros e bootstrap de 1000 réplicas.

### **3.7 Análise estatística**

O estudo, estatístico foi realizado por corte transversal, muito embora pretendemos reavaliar essa mesma população, em um estudo posterior, portanto, poderá também ser aceito como “coorte transversal”. As análises descritivas realizadas foram à frequência de mutações e medicações e a caracterização dos grupos que foram descritas em percentuais. As análises comparativas foram feitas por ANOVA e aplicado o teste de Fisher e o teste CHI-quadrado para as comparações e confiabilidade dos dados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Descritiva

Foram analisados, 142 pacientes considerados portadores de HBsAg há mais de seis meses. Foram realizadas reações de eletroquimioluminescência para HBsAg, HBeAg e anti-HBe. Toda as amostras confirmaram soropositividade para HBsAg, 142 sororeagentes. Iniciando com uma repetição da triagem sorológica realizadas reações para HBeAg e anti-HBe por eletroquimioluminescência. As pesquisas de mutações e genotipagem por sequenciamento foi realizada em 88 amostras no laboratório das hepatites virais da FIOCRUZ-RJ. A análise quantitativa para o VHB-DNA por PCR em tempo real variou de 2.067UI/mL até 3.410.000.000UI/mL, com mediana de 70.403UI/mL. Os dados demográficos referentes à idade e sexo dos pacientes estudados encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 02** - Dados demográficos (sexo e idade) dos pacientes com Hepatite B crônica atendidos nos serviços de referência do Estado do Ceará.

IDADE anos	GÊNERO		Total (%)
	Masculino (%)	Feminino (%)	
16 - 29	13 (9,15)	10(7,04)	23
30 - 39	20 (14,08)	15(10,56)	35
40 - 49	24 (16,90)	09(6,34)	33
50 - 59	13 (9,15)	15(10,56)	28
60 - 69	10 (7,04)	07(4,93)	17
70 - 79	05 (3,5)	01(0,70)	06
Total	85 (59,86)	57(40,14)	

Dentre os 142 pacientes investigados 43 encontravam-se em tratamento, destes podemos destacar 30,2 % Lamivudina, 20,9 % que fazem uso do medicamento Entecavir, 20,9 % Tenofovir, 7,0 % Interferon, 2,3% Adefovir associado à Lamivudina, 2,2 % Lamivudina em associação com Entecavir e 18,6 % Desconhecido (Tabela 3). Dentre os pacientes em tratamento podemos destacar algumas informações relevantes onde um deles relatou histórico de pai portador do vírus B e aqueles em tratamento com Interferon apresentavam resistência à Lamivudina. Três pacientes relataram já terem feito tratamentos anteriormente, porém dois deles abandonaram, um em 2010 e outro em 2014, e outra interrompeu devido gravidez. Quatro dos pacientes relataram estar em tratamento contra o HIV e um deles também estava sendo tratado para tuberculose ganglionar.

**Tabela 03**– Frequência dos antivirais administrados aos pacientes com hepatite B crônica

		Resposta	
		N	Percentual
Medicações	Lamivudina	13	30,2%
	Entecavir	9	20,9%
	Tenofovir	9	20,9%
	Interferon	3	7,0%
	Adefovir	1	2,3%
	Desconhecido	8	18,6%
Total		43	100,0%

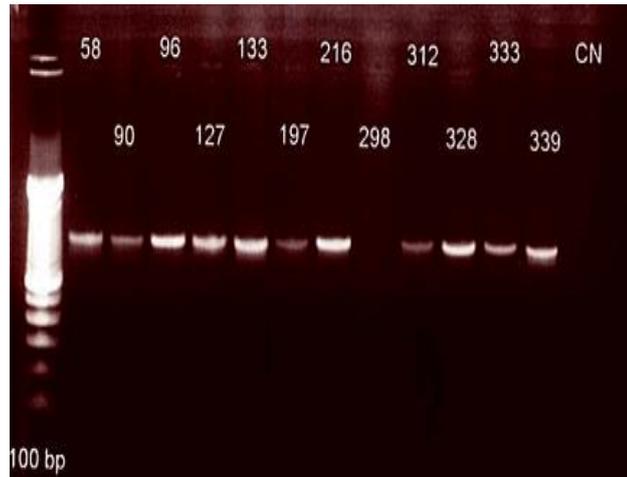
**Tabela 04** – Frequência das mutações detectadas em pacientes com hepatite B crônica

		Resposta	
		N	Percentual
Mutações	SEM MUTAÇÃO	75	74,3%
	L180M	10	9,9%
	M204V	8	7,9%
	G173L	1	1,0%
	T169L	1	1,0%
	M204I	4	4,0%
	T184I	1	1,0%
	L80V	1	1,0%
Total		101	100,0%

## 4.2 Amplificação

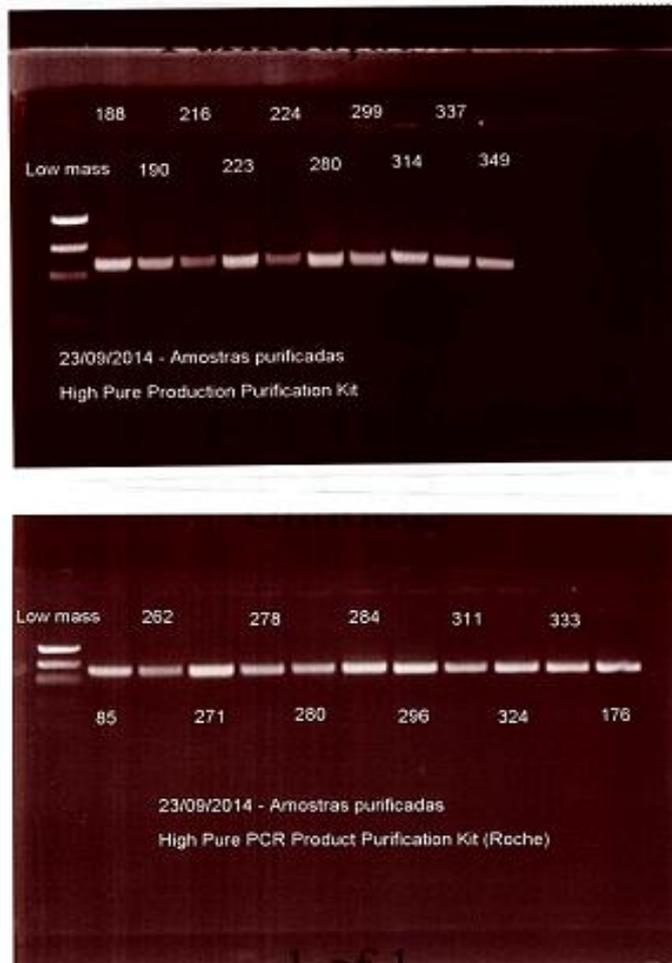
O resultado da amplificação do gene da polimerase que caracteriza mutação de resistência viral, foi demonstrado em eletroforese em gel de agarose apresentada na Figura 06. O primeiro poço à esquerda, corresponde ao marcador molecular de 100 pb, ao centro as amostras dos respectivos pacientes em que, apenas o correspondente ao número 298 não amplificou e à direita o CN (Controle Negativo). Aquelas amostras que apresentaram uma banda única de 1000 pb foram submetidas para posterior sequenciamento de mutações (96 %), sendo que em 4% foi observada ausência da banda, não podendo ser sequenciadas.

**Figura 06** – Gel de agarose dos produtos amplificados



A primeira linha corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). As linhas subsequentes correspondem as amostras dos pacientes. A última linha identificada como CN corresponde ao controle negativo da reação de amplificação.

**Figura 07** – Géis de quantificação dos produtos de PCR purificados



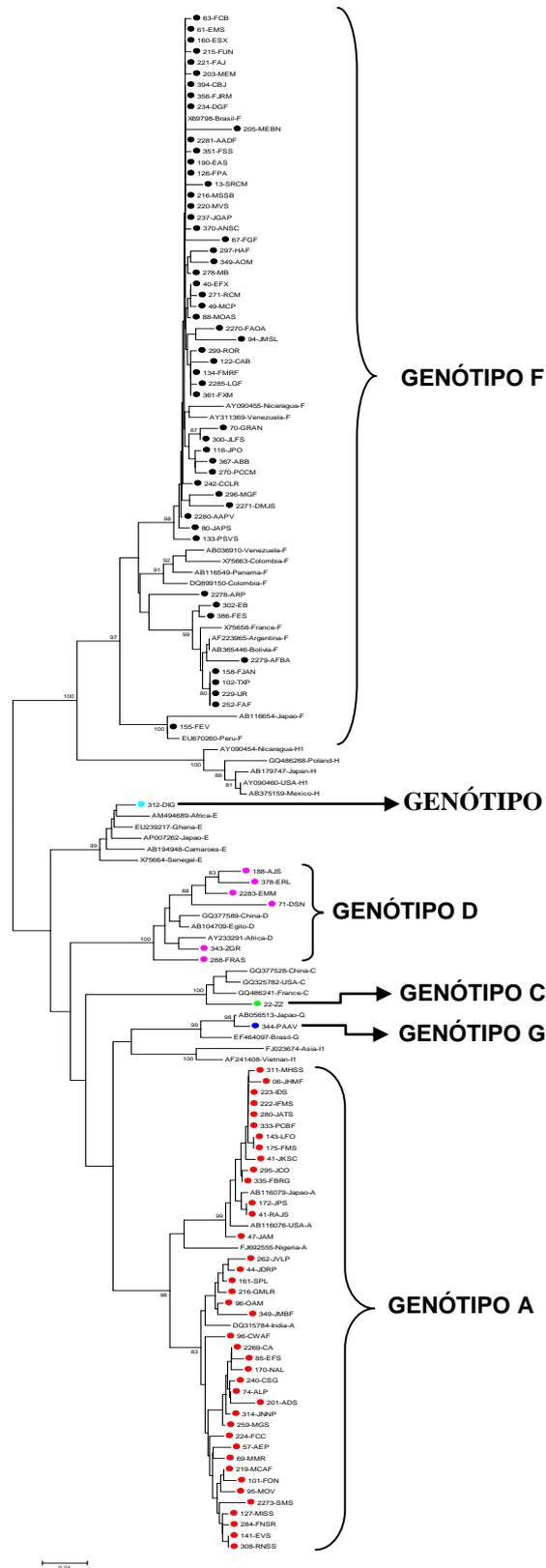
Na primeira linha à esquerda, o marcador de peso molecular Low Mass. As linhas subsequentes correspondem aos fragmentos das amostras dos pacientes.

### **4.3 Genótipos e Mutações de resistência**

#### **Análise das sequências de nucleotídeos**

As 88 sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X versão 1.83 em conjunto com sequências de referência para cada subtipo, disponíveis no banco de dados do Gen Bank. Após alinhamento, foi construída uma árvore filogenética, utilizando-se para o cálculo da distância o modelo de probabilidade máxima e o método *Neighbor-Joining* do programa Mega 4.0. Na figura 08, podemos observar que as sequências das amostras foram classificadas nos seus respectivos genótipos, com alto valor de *bootstrap* (>95%).

**Figura 08** - Grupamento genético de 88 amostras de soro de pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite B e cepas de referência (representadas pelo subtipo, país de origem e nº no Genbank). Apenas os valores de *bootstrap* acima de 75% foram apresentados.



Dentre os 88 (oitenta e oito) indivíduos testados, (47 - 53,4 %) pertenciam ao genótipo F, (34 - 38,6%) foram caracterizados como genótipo A. Os demais genótipos encontrados correspondem a (7 - 8%) dos pacientes, sendo que (1 - 1,1%) do genótipo G, (4 - 4,6%) do genótipo D e (2 - 2,3%) do genótipo E, como se encontra representado no Quadro 03.

**Quadro 03**– Distribuição dos genótipos da população estudada

		N	N %
GENÓTIPO	F	47	53,4%
	A	34	38,6%
	D	4	4,5%
	E	2	2,3%
	G	1	1,1%

- O estudo mostrou a frequência de cinco genótipos dos (10) dez descritos na literatura;
- O genótipo F seguido do genótipo A foram os mais prevalentes.

### Mutações de resistência

As mutações de cada indivíduo relacionando com o respectivo genótipo estão listadas na Tabela 05.

**Tabela 05** - Análise descritiva do tipo de Mutação por Genótipos na população estudada

<i>Iniciais</i>	<i>Tipo de Mutação</i>	<i>Genótipo</i>
<i>JPO</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>F</i>
<i>CCLR</i>	<i>T169L</i>	<i>F</i>
<i>JLFS</i>	<i>L180M, M204I, L80V</i>	<i>F</i>
<i>RAN</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>F</i>
<i>SMS</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>A</i>
<i>MISS</i>	<i>T184I, M204I</i>	<i>A</i>
<i>FCC</i>	<i>M204I</i>	<i>A</i>
<i>CWAF</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>A</i>
<i>JKSC</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>A</i>
<i>FAAV</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>G</i>
<i>AJS</i>	<i>V ou G1L, M204V, M204, M204V</i>	<i>D</i>

Das 88 amostras dos pacientes sequenciadas, apenas 69 responderam ao quesito relacionado ao tratamento. 47 disseram que não estavam tomando nenhum antiviral (AV) e 22 afirmaram que sim. Na pesquisa de mutações foram encontrados os seguintes resultados: (08/22); (02/45). Foram detectadas oito mutações nos pacientes medicados e duas nos que responderam não estar tomando nenhum tipo de antiviral. Quando se aplicou o teste de Fisher foi encontrado um \*valor de  $p < 0,001$ , indicando haver significância estatística, vide Quadro 04; Figura 09.

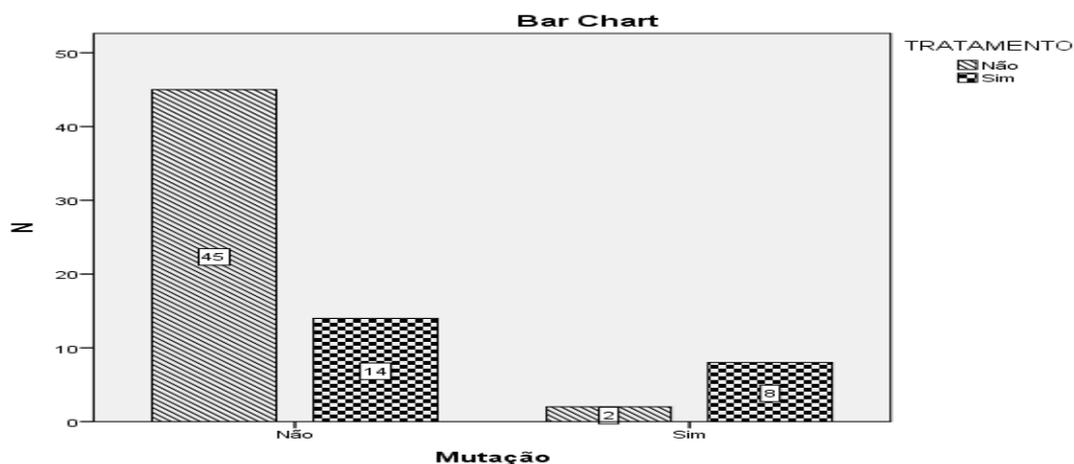
**Quadro 04** - Mutação vs Tratamento em pacientes com hepatite B crônica

		TRATAMENTO		Total
		Não	Sim	
Presença de mutação	Não	45	14	59
	95,7%	63,6%	85,5%	
Sim	Sim	2	8	10
	4,3%	36,4%	14,5%	
Total		47	22	69
		100,0%	100,0%	100,0%

\*valor de  $p < 0,001$

(teste exato de Fisher) OR 12,85 (2,44 – 67,72)

**Figura 09** – Mutação versus tratamento em pacientes com hepatite B crônica



Em relação às mutações detectadas nos diferentes genótipos, observou-se que todos os genótipos apresentaram as mutações L180M e M204V/I. Na análise individual foi constatado o genótipo F e as L80 e a T169L; o genótipo A foi o que apresentou o maior número de pacientes com mutações e além das mutações acima descritas apresentou a mutação T184I; o genótipo G, n=01, apresentou as mutações comuns a todos e o genótipo D, além das mutações comuns a todos, também apresentou a mutação V/G173L, conforme mostrado na Tabela 06.

**Tabela 06** – Mutações individuais dos pacientes com hepatite B crônica

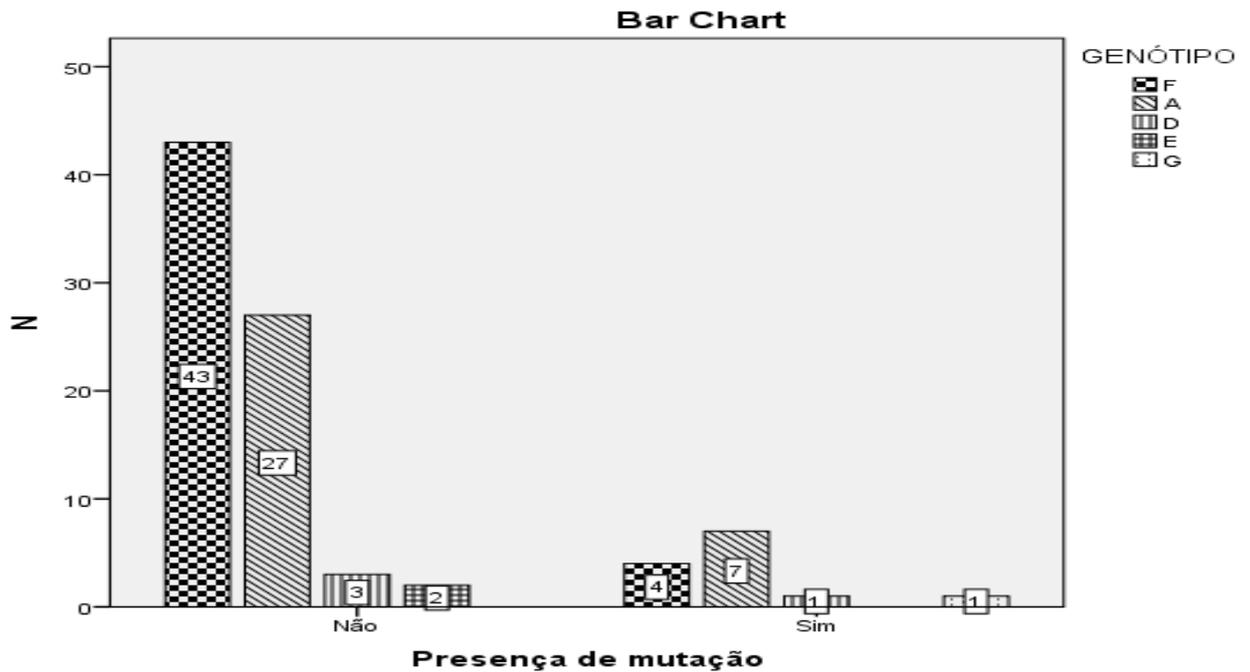
Identificação da amostra	Genótipo	Mutação de resistência
116-JPO	F	L180M, M204V
242-CCLR	F	T169L
58-JLFS	F	L80V, L180M, M204I
337-RAN	F	L180M, M204I
2273-SMS	A	L180M, M204V
127-MISS	A	T184I, M204I
224-FCC	A	M204I
90-CWAF	A	L180M, M204V
96-CWAF	A	L180M, M204V
176-JKSC	A	L180M, M204V
41-JKSC	A	L180M, M204V
81-FAAV	G	L180M, M204V
188-AJS	D	V/G173L, L180M, M204V

Quando relacionamos, quantitativamente, as mutações encontradas com os diferentes genótipos, o estudo não mostrou significância estatística, valor de \* ( $p < 0,066$ ); teste do chi quadrado conforme descrito na Tabela 07 e representado na Figura 10.

**Tabela 07** - Frequência das mutações em relação aos genótipos dos pacientes com hepatite B crônica

			GENÓTIPO					Total
			F	A	D	E	G	
Presença de Mutação	Não	n	43	27	3	2	0	75
		%	91,5%	79,4%	75,0%	100,0%	0,0%	85,2%
	Sim	n	4	7	1	0	1	13
		%	8,5%	20,6%	25,0%	0,0%	100,0%	14,8%
Total		n	47	34	4	2	1	88
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

\*Valor de  $p < 0,066$  (teste do chi quadrado)

**Figura 10**– Mutações versus genótipo dos pacientes com hepatite B crônica

#### 4.4 Mutações de acordo com o genótipo do VHB

##### 4.4.1 Genótipo “F”

O paciente 116-JPO apresentou mutação na posição 180 onde leucina, sequência original do vírus, foi substituída pela metionina e na posição 204 a metionina foi substituída pela valina. Este paciente faz uso de lamivudina. No paciente 242-CCLR foi revelada mutação na posição 169 com substituição da treonina, sequência normal do vírus, por leucina. O paciente 58-JLFS apresentou mutação na posição 80, a leucina foi substituída por a valina e na posição 180 a leucina também foi substituída pela metionina; na posição 204 a metionina foi substituída pela isoleucina, este paciente faz uso de tenofovir. O paciente 337-RAM, que faz uso de lamivudina, apresentou alterações na posição 180, onde a leucina foi substituída pela a metionina e na posição 204, onde a metionina foi substituída pela isoleucina.

#### **4.4.2 Genótipo “A”**

As mutações no paciente 2273-SMA foram à leucina sendo permutada pela metionina na posição 180 e metionina por valina na posição 204. O paciente 127-MISS, que faz uso de lamivudina, traz mutações na posição 184 com a substituição de treonina por isoleucina. Já na posição 204, a metionina foi substituída pela isoleucina.

O paciente 224-FCC faz uso de medicamento, mas não sabe informar se é anti-viral e apresentou mutação na posição 204 com a metionina sendo substituída pela isoleucina. Paciente 90-CWAF, em duas amostras diferentes, em momentos diferentes, cargas virais diferentes, sequenciado duas vezes apresentou o mesmo resultado: confirmou ser genótipo “A”, apresentou as mesmas mutações (leu/met180 e met/val204). O paciente faz uso de lamivudina/adefovir e fez uso lamivudina/entecavir.

Já o paciente (176-JKSC/41-JKSC) em duas amostras diferentes, em momentos diferentes, cargas virais diferentes, sequenciado duas vezes apresentou o mesmo resultado: confirmou ser genótipo “A”, apresentou as mesmas mutações (leu/met180 e met/val204).

Como excepcionalidades podemos citar os pacientes 149-PCBF/333-PCBF e PACIENTES 79-JPS/148-JPS. No primeiro, com duas amostras diferentes, em momentos diferentes, cargas virais diferentes, sequenciado duas vezes foram confirmadas o genótipo “A” e ausência de mutações, sendo que o mesmo sofre de anemia aplástica. No segundo, também com duas amostras diferentes, em momentos diferentes, cargas virais diferentes, sequenciado duas vezes determinou-se o genótipo “A” e ausência de mutações, sofre de anemia aplástica e faz uso de tenofovir, também é “HIV (sororeagente)” faz uso de anti-viral.

Ao analisarmos individualmente os genótipos dos pacientes encontramos os seguintes resultados:

#### **4.4.3 Genótipo “G” e “D”**

As mutações no paciente 81-FAAV do genótipo G foram à leucina sendo permutada pela metionina na posição 180 e metionina por valinana posição 204. O paciente faz uso de lamivudina.

Já no paciente 188-ajs do genótipo D apresentou na posição 173 substituição da valina ou glicina por leucina, na posição 180 houve substituição da leucina por metionina e na posição 204 houve substituição (mutação) da metionina pela a valina.

#### 4.5 Mutações e carga viral de acordo com o genótipo do VHB

##### Genótipo F

No quadro 05 é mostrado o perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo F fazendo uso de antiviral

**Quadro 05** - Perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo F fazendo uso de antiviral

<i>Num</i>	<i>ID</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Carga Viral (UI/mL)</i>	<i>Mutação</i>	<i>Medicação</i>
1	113 EFX	F	26.100.00 / log: 7,42	----	Entecavir
2	370 ANSC (HIV+)	F	11.691/ log: 4,10	----	Entecavir + Lamivudina
3	190 EAS	F	170.000.000/ log: 8,23	----	Lamivudina
4	63 FCB	F	55.000/ log: 4,74	----	Tenofovir
5	116 JPO	F	4.210.000/ log: 6,62	L180M, M204V	Lamivudina
6	299 ROR	F	30.157/ log: 4,48	----	Entecavir + Interferon
7	216 MSSB	F	11,714/ log: 4,07	----	Tenofovir
8	349 AOM	F	83.062/ log: 4,92	----	Lamivudina
9	58 JLFS	F	30.700/ log: 4,49	L80V, L180M, M204V	Tenofovir
10	337 RAM	F	1.590.000/ log: 6,20	L180M, M204V	Lamivudina
11	133 PSVS	F	12.9901.590.000/ log: 6,20	----	Sim, N.I
12	61 EMS	F	170.000.000/ log: 8,23	----	Entecavir
13	190 EAS	F	74,491/ log: 4,87	----	Lamivudina

\*Dos treze pacientes que relataram está fazendo uso de medicação, três apresentaram mutações.

\*02 (dois) que estavam tomando ou havia tomado lamivudina apresentaram as mutações: L180M e M204V. 01(hum) com carga viral de 1.590.000UI/mL/log6, 2 e outro com 4.210.000/log6, 62

\*01 (hum) paciente fazendo uso de tenofovir com carga viral de 30.700UI/mL/log4, 49

##### Genótipo A

No quadro 06 é mostrado o perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo S fazendo uso de antiviral.

**Quadro 06 - Perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo A fazendo uso de antiviral**

<i>Num</i>	<i>ID</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Carga Viral (UI/mL)</i>	<i>Mutação</i>	<i>Medicação</i>
1	127 MISS	A	3.740/ log: 3,57	T184I, M204I	Lamivudina
2	224 FCCL	A	13.183/ log: 4,12	----	Tenofovir
3	96 CWF	A	2.300 / log: 3,36	L180M, M204V	Lamivudina + Adefovir
4	216 GML	A	9.370/ log: 3,97	----	Tenofovir
5	79 JPS	A	83.300.000/ log: 7,90	----	Tenofovir
6	280 JATS	A	477.620.332/ log: 8,68	----	Peginterferon
7	41 JKSC	A	326.642/ log: 5,51	L180M, M204V	Entecavir

\*Dos 7 (sete) que estavam fazendo uso de medicação, 03(três) pacientes apresentaram mutações:

\*01 (hum) paciente estava tomando só lamivudina, carga viral de 3.470UI/mL/log3, 57, apresentou as mutações (T181I e M204I)

\*01 (hum) paciente estava tomando lamivudina+ adefovir, carga viral de 2.300UI/mL/log3,36 apresentou as mutações (L180M;M204V)

. 01 (hum) paciente estava tomando só entecavir, carga viral de 326.642UI/mL/log5,51 apresentou as mutações (L180M;M204V), vide quadro 06

**Genótipo G**

No quadro 07 é mostrado o perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo G fazendo uso de antiviral.

\*O paciente estava tomando lamivudina + tenofovir, carga viral de 220.000UI/mL/log5,34 e apresentou as mutações (L180M;M204V).

**Quadro 07- Perfil dos pacientes genótipo G fazendo uso de antiviral**

<i>Num</i>	<i>ID</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Carga Viral (UI/mL)</i>	<i>Mutação</i>	<i>Medicação</i>
1	81 FAAV	G	220.000/ log:5,34	L180M, M204V	3TC + TDF

**Genótipo D**

No quadro 08 é mostrado o perfil dos pacientes com hepatite B crônica genótipo D fazendo uso de antiviral.

\*O paciente estava tomando lamivudina + AZT, carga viral de 1.465.393.899UI/mL/ log<sub>9,17</sub> apresentou as mutações(L180M;M204V), vide: quadro 08

**Quadro 08** - Perfil dos pacientes genótipo D fazendo uso de antiviral

<i>Num</i>	<i>ID</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Carga Viral (UI/mL)</i>	<i>Mutação</i>	<i>Medicação</i>
<i>1</i>	<i>188 AJS</i>	<i>D</i>	<i>1.465.393.899/ log: 9,17</i>	<i>L180M, M204V</i>	<i>AZT + 3TC</i>

## 5 DISCUSSÃO

Estratégias para combater a infecção pelo VHB compreendem o tratamento de pacientes infectados cronicamente, interromper a via de transmissão e a imunização de indivíduos susceptíveis. Entre eles, a vacinação é o mais eficaz, impedindo que indivíduos possam contrair infecção por VHB [21]. Isto foi demonstrado muito cedo em uma estratégia de controle global para a hepatite B, quando vacinas derivadas do plasma foram utilizadas há mais de 30 anos [22,23]. O componente da vacina, as partículas subvirais que expressam HBsAg, foi mais tarde substituído por antígeno produzido em leveduras [24]. De qualquer forma a vacina é altamente eficaz e segura.

Os principais efeitos da vacinação em massa foram a redução dos portadores de HBsAg, redução da doença causada pela infecção aguda e crônica pelo VHB, redução dos casos de hepatocarcinoma celular.

O curso da infecção de VHB depende de vários fatores que podem alterar a resposta imunitária contra o VHB, incluindo fatores genéticos (WRIGHT; LAU, 1993). Além disso, também depende da variabilidade genética do vírus, o que influencia a expressão de antígeno viral.

A progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular é muito lenta em pacientes no estado de portador inativo (<1% ao ano), já nas fases reativas e de reativação imunológica a progressão para cirrose pode ocorrer a uma taxa de 2-10% ao ano, enquanto que a progressão da cirrose para CHC é de aproximadamente 2-4% de pacientes por ano. A incidência de cirrose parece ser duas vezes maior em HBeAg negativo em comparação com pacientes HBeAg positivo. Em pacientes cirróticos o risco cumulativo com CHC ocorre numa taxa de taxa de 10% na Europa Ocidental e nos EUA, chegando 17% no Leste da Ásia em aproximadamente 5 anos com óbitos em igual período, 5 anos, de 14% no Leste da Ásia e 15% na Europa [6].

As taxas de progressão são determinados principalmente pela idade, tempo de infecção, sexo, grau de replicação do VHB, diferentes genótipos do VHB e variantes, a co-infecção com HCV, HDV ou HIV, o álcool, a exposição à aflatoxina B1, fatores genéticos e, provavelmente, comorbidades, incluindo síndrome metabólica, diabetes, obesidade e fumo.

Estudos da Ásia sugerem uma progressão mais rápida para cirrose e carcinoma hepatocelular se infectados com o genótipo C em comparação com o genótipo B. Estudos na Europa e América do Norte revelam que o genótipo D, hepatite B crônica tem uma progressão superior para cirrose e carcinoma hepatocelular do que o genótipo A [6,8,10,11].

Apesar da disponibilidade de medicamentos antivirais potentes, tais como análogos de nucleos(t)idos (por exemplo, entecavir ou tenofovir) e interferon- $\alpha$  peguilado (PEG-IFN) para o tratamento de infecção crônica por VHB, a resposta virológica sustentada (SVR) em termos de perda de HBsAg e aparecimento de anti-HBs (anticorpo de superfície do VHB) é raramente alcançado.

O maior dilema com o tratamento da hepatite B é quando começar. Diretrizes internacionais recomendam o tratamento antiviral em pacientes com doença hepática com risco de vida: insuficiência hepática aguda, exacerbações graves da HBC, cirrose descompensada, e condições médicas necessitando de terapia imunossupressora que estão associados a risco de reativação de VHB [59,60,65]. Para os pacientes não cirróticos, indicações de tratamento são baseados em níveis séricos de VHB DNA e ALT e quando disponível histologia hepática. Estas diretrizes recomendam cortes mais baixos de VHB DNA e os níveis de ALT para iniciar o tratamento antiviral em pacientes com cirrose compensada, aqueles que são mais velhos (infectados por mais tempo), e aqueles com história familiar de HCC. Há pequenas variações nos níveis de corte VHB DNA e ALT e na importância da biópsia do fígado ou avaliação não invasiva da fibrose do fígado para iniciar tratamento entre as orientações.

Testes clínicos de fase 3 demonstraram que o tratamento de 1 ano de pegIFN com ou sem lamivudina em pacientes HBeAg positivo resultou em 29% a 32% de seroconversão de HBeAg e 3% a 7% de perda de HbsAg, 24 semanas após o término do tratamento [67]. Para os pacientes de HBeAg-negativos, dados de ensaios clínicos de fase 3 mostraram que o tratamento de 1 ano de pegIFN com ou sem lamivudina resultou em uma resposta sustentada, definida como a normalização do nível de ALT e supressão do nível de DNA VHB para  $<10.000$  UI / ml, em aproximadamente 25% dos pacientes, e perda de HBsAg em 9% aos 3 anos após a conclusão do tratamento [67].

Elevados níveis séricos de ALT, baixa carga viral, genótipos A e B, e alto índice de atividade histológica são indicadores da resposta ao pré-tratamento em pacientes de HBeAg-positivo. Não foram identificados fatores preditivos de resposta consistentes para os pacientes de HBeAg-negativos. Os ensaios de fase 3 mostraram que a administração concomitante de lamivudina não melhorou as taxas de resposta em comparação com monoterapia de pegIFN.

De forma análoga ao do HIV, a polimerase de VHB é também um bom alvo para a inibição da replicação viral. Vários análogos de nucleosídeos, tais como a lamivudina (1, 3TC, uma citosina L-nucleosídeo analógico) Dienstag *et al.* (1995), adefovir (2, ADV, um

análogo de adenosina), entecavir (3, ETV, um análogo de guanosina carbocíclico) De Man *et al.*, (2001) e telbivudina (4, LdT, um análogo da timidina-L-nucleosídeo), Laiet *et al.*, (2004) tenham sido aprovados por os EUA-FDA para o tratamento de infecção crônica por VHB. Anteriormente, sintetizaram um certo número de L-nucleosídeos. Entre as quais clevidine (5, L-FMAU, um análogo nucleosídico da timidina) foi descoberto como um agente anti-VHB potente. (CHU *et al.*, 1995; MARCELLIN *et al.*, 2004; YOO *et al.*, 2007).

Os análogos de nucleosídeos (NUCs) tornaram-se o pilar do tratamento da hepatite B, porque eles podem ser administrados por via oral e têm uma potente atividade antiviral e poucos efeitos colaterais. Uma grande desvantagem com NUCs primeiros foi a elevada taxa de resistência às drogas antivirais, mas as taxas de resistência às drogas antivirais após 5 anos de tratamento em pacientes NUC-nativos têm sido referidos como sendo de apenas 1,2% e 0%, respectivamente, para o entecavir e tenofovir [67]. Combinação de dois NUCs sem resistência cruzada tinha sido proposto para prevenir o desenvolvimento de resistência ao fármaco, mas isto não é necessário quando NUCs, com elevado poder de barrar a resistência, como tenofovir ou entecavir são utilizados. De fato, estudos recentes mostraram que a monoterapia de tenofovir é tão eficaz como o tenofovir associado à emtricitabina na supressão do VHB que é resistente a lamivudina ou adefovir. NUCs aprovados para VHB são geralmente seguros. Toxicidade mitocondrial é um efeito colateral potencial do tratamento NUC, contribuindo para a acidose láctica fatal em um estudo com fialuridina no início de 1990 e à descontinuação do desenvolvimento da clevidine uma década depois. Miopatia e neuropatia têm sido relatados em pacientes que receberam a telbivudina e nefrotoxicidade e disfunção tubular renal têm sido relatados em pacientes que receberam adefovir ou tenofovir.

Entecavir (ETV) e tenofovir (TDF) são considerados como nova geração de agentes antivirais. Entecavir exibe uma supressão mais potente do nível de DNA VHB do que a lamivudina e adefovir (DIENSTAG *et al.*, 2007). As mutações responsáveis pela resistência a ETV são mapeados para os domínios B, C e E da polimerase de VHB. As mutações de resistência a ETV, pertencentes ao domínio B são rtI169T, rtL180M, e rtS184G, enquanto as mutações rtS202I e rtM204V estão relacionados com domínio C (TENNEY *et al.*, 2004; SHAW *et al.*, 2006).

A única mutação associada à ETV-resistência sob domínio E é rtM250V. Tem sido observado que três mutações no VHB região polimerase, ou seja, rtL180M + rtM204V e tanto rtT184G/S ou rtS202I/G ou rtM250V, são obrigatórios para o desenvolvimento de resistência ETV (SUZUKI *et al.*, 2007). Mutações de resistência entecavir tendem a ocorrer

na presença da mutação preexistente rtM204V/I relacionada com a resistência à lamivudina (LMV)\* (TENNY *et al.*, 2009).

Como mostrado anteriormente, o genótipo do VHB mais comum nos nossos experimentos foi o F. Esse estudo mostrou importância em mensurar a carga viral, não somente para monitoramento ao tratamento dos pacientes, mas também como de significativa importância na técnica de sequenciamento. Pois, foi confirmado que amostras com uma carga viral abaixo de 2.000UI/mL apesar da reação de amplificação (PCR) e nested de PCR, também se verificou dificuldades no sequenciamento.

Por ser o primeiro estudo nessa população do estado do Ceará, buscamos justificar os achados da alta prevalência do genótipo F recorrendo à literatura, que apesar de escassa, algumas publicações poderão ser citadas (VIVEKANANDAN *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005; SAMI *et al.*, 2013). Outros estudos relatam a predominância do genótipo F em populações indígenas, como foi descrito por Bertolini em pesquisas realizadas em aldeias da região Amazônica. No entanto, com grupo de pacientes não permite concluir acerca do real impacto desse traço étnico como fator determinante para ser o genótipo F o mais prevalente em nosso estado. Apesar de também ter sido encontrado um percentual significativo de genótipo A, 38,6%, encontrado em nosso estudo e, conforme literatura, predominante na raça negra que poderá ser relacionado com a nossa população pela migração de escravos na era da colonização. Fazem-se necessários mais estudos para posterior elucidação.

Em relação às mutações foram detectadas: a L180M (n=10 / 9,9%), a M204V (n=8 / 7,9%), a M204I (n=4 / 4%), a G173L (n=1 / 1%), a T169L (n=1 / 1%), a T184I (n=1 / 1%), e a L80V (n=1 / 1%), que poderão estar associadas à resistência aos antivirais. E, apesar dos sucessos significativos na descoberta de agentes anti-VHB, a questão crucial é o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e resistência cruzada contra terapêuticas disponíveis (FERIR *et al.*, 2008; PALUMBO, 2008).

Diversos grupos têm estado envolvidos na compreensão do problema de resistência aos medicamentos anti VHB até mesmo por modelagem molecular (CHONG; CHU, 2002; YADAV; CHU, 2004). Os processos de transcrição e de tradução, o VHB tem semelhante processo de transcrição reversa ao HIV. Esse processo é mediado por uma única enzima que catalisa RNA-dependente de ADN e ADN-polimerase, ARNase H e as atividades de iniciação de síntese de proteína (SEEGER; MASON, 2000).

As mutações detectadas na região de interdomínio A-B não desempenham um papel importante na função RT e não são responsáveis por resistência antiviral (SVICHER *et al.*, 2009; ECHEVARRÍA; AVELLÓN, 2006).

Até o momento, não existe mutação estabelecida que confira resistência ao TDF (PASTOR *et al*, 2009; SHELDON *et al*, 2005; DELANEY *et al*, 2006; KITRINOS *et al*, 2014). Foi relatada que a existência de mutações de resistência a adefovir (ADV) (rtA181T/V e rtN236T) resulta em eficácia reduzida (aproximadamente 50%) da TDF contra o VHB, quando os pacientes são comutadas para TDF do ADV (VAN BOMMEL *et al.*, 2010).

Cada uma destas abordagens terapêuticas também tem desvantagens adicionais. Para a terapia antiviral oral, a duração ideal ainda está indefinida e a terapia a longo prazo é necessária. Um grande problema com o tratamento antiviral a longo prazo é o potencial desenvolvimento de resistência ao fármaco. O tratamento com PEG-IFN- $\alpha$  tem a vantagem de uma duração finita de tratamento. No entanto, efeitos colaterais significativos e baixa tolerabilidade devem ser considerados.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo, dado associação dos genótipos e mutações à gravidade da doença, objetivou investigar a distribuição genotípica em pacientes com hepatite B crônica, bem como as mutações relacionadas com resistência aos antivirais.

Os nossos experimentos mostraram que o genótipo F foi o mais prevalente, 53,4%, seguido do genótipo A observado em 38,6%, D em 5,4%, E e G mais raramente, 2,3% e 1,1%, respectivamente.

A despeito da pesquisa de mutações relacionadas ao tratamento o estudo mostrou uma significância estatística com um valor de  $p=0,001$ . As seguintes mutações foram detectadas: L180M (n=10 / 9,9%), M204V (n=8 / 7,9%), M204I (n=4 / 4%), G173L (n=1 / 1%), T169L (n=1 / 1%), T184I (n=1 / 1%) e L80V (n=1 / 1%), que estão associadas à resistência aos antivirais.

Os dados obtidos evidenciaram ser de grande importância à avaliação de mutações de resistência às drogas utilizadas pelos pacientes contribuindo para fornecer informações que possam subsidiar a tomada de decisões clínicas/ terapêuticas.

Estes dados da prevalência dos genótipos contribuem com informações epidemiológicas de grande valia para definição do perfil dos vírus circulantes no estado do Ceará auxiliando nas ações estratégicas do Ministério da Saúde.

## REFERÊNCIAS

- COFFIN, C.S.; MULROONEY-COUSINS, P.M.; PETERS, M.G.; VAN, M.G.; ROBERTS, J.P.; MICHALAK, T.I.; TERRAULT, N.A. Molecular characterization of intrahepatic and extrahepatic hepatitis B virus (VHB) reservoirs in patients on suppressive antiviral therapy. **J. Viral Hepat.**, v.18, p. 415–423, 2011.
- COX, N.; TILLMANN, H. Emerging pipeline drugs for hepatitis B infection. *Expert. Opin. Emerg. Drugs.*, v.16, p.713–729, 2011.
- CHANG, L.J.; HIRSCH, R.C.; GANEM, D.; VARMUS, H. E. Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase. **J. Virol.**, v. 64, p.5553–5558, 1990.
- DELANEY, I.V.; W.E., RAY, A.S.; YANG, H.; QI, X.; XIONG, S.; ZHU, Y.; MILLER, M.D. Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, p.2471–2477, 2006.
- DIENSTAG, J.L.; WEI, L.J.; XU, D.; KRETER, B. Cross-study analysis of the relative efficacies of oral antiviral therapies for chronic hepatitis B infection in nucleoside-naïve patients. **Clin. Drug Investig.**, v. 27, p.35–49, 2007.
- ECHEVARRÍA, J.M.; AVELLÓN, A., Hepatitis B virus genetic diversity. **J. Med. Virol.**, v78, p.36–42, 2006.
- EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER, EASL. Clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. **J. Hepatol.**, v. 50, p.227–242, 2009.
- FARES, M.A.; HOLMES, E.C. A revised evolutionary history of hepatitis B virus (VHB). **J. Mol. Evol.**, v. 54, p.807–814, 2002.
- GHANY, M.; LIANG, T.J. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v. 132, p.1574–1585, 2007.
- ISMAIL, A.M.; SAMUEL, P.; EAPEN, C.E.; KANNANGAI, R.; ABRAHAM, P. Antiviral resistance mutations and genotype-associated amino acid substitutions in treatment-naïve hepatitis B virus-infected individuals from the Indian subcontinent. **Intervirology.**, v. 55, p.36–44, 2012.
- KANE, M. Global programme for control of hepatitis B infection. **Vaccine**, v.13, n.1, p.47–49, 1995.
- KITRINOS, K.M.; CORSA, A.; LIU, Y.; FLAHERTY, J.; SNOW-LAMPART, A.; MARCELLIN, P.; BORROTO-ESODA, K. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. **Hepatology**, v.59, p.434–442, 2014.
- KUMAR, A.; KUMAR, S.I.; PANDEY, R.; NAIK, S.; AGGARWAL, R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. **Indian J. Gastroenterol**, v. 24, p.19–22, 2005.

KWON, H.; LOK, A.S. Hepatitis B therapy. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v.8, p.275–284, 2011.

LOCARNINI, S.; HATZAKIS, A.; CHEN, D.S.; LOK, A. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol.*, v. 62, p.76-86, 2015.

MADDREY, W.C. Hepatitis B: an important public health issue. *Clin Lab*, v. 47, p.51-55, 2001.

MICHAILIDIS, E.; KIRBY, K.A.; HACHIYA, A.; YOO, W.; HONG, S.P.; KIM, S.O.; FOLK, W.R.; SARAFIANOS, S.G. Antiviral therapies: focus on hepatitis B reverse transcriptase. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 44, p.1060-1071, 2012.

MONTO, A.; SCHOOLEY, R.T.; LAI, J.C.; SULKOWSKI, M.S.; CHUNG, R.T.; PAWLOTSKY, J.M.; MCHUTCHISON, J.G.; JACOBSON, I.M. Lessons from HIV therapy applied to viral hepatitis therapy: summary of a workshop. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 105, p.989– 1004, 2010.

PASTOR, R.; HABERSETZER, F.; FAFI-KREMER, S.; DOFFOEL, M.; BAUMERT, T.F.; GUT, J.P.; STOLL-KELLER, F. Hepatitis B virus mutations potentially conferring adefovir/tenofovir resistance in treatment-naïve patients. *World J. Gastroenterol.*, v. 15, p.753–755, 2009.

RADZIWILL, G.; TUCKER, W.; SCHALLER, H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J. Virol.*, v.64, p.613–620, 1990.

SAMI, H.; RIZVI, M.; AZAM, M.; MUKHERJEE, R.M.; SHUKLA, I.; AJMAL, M.R.; MALIK, A. Emergence of hepatitis B virus genotype F in Aligarh region of north India. *Adv. Virol.*, v. 2013, p.846-849, 2013.

SHAW, T.; BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. VHB drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J. Hepatol.*, v. 44, p.593–606, 2006.

SHELDON, J.; CAMINO, N.; RODES, B.; BARTHOLOMEUSZ, A.; KUIPER, M.; TACKE, F.; NÚÑEZ, M. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir. Ther.*, v. 10, p.727–734, 2005.

SINGLA, B.; BHATTACHARYYA, R.; CHAKRABORTI, A.; SHARMA, B.K.; KAPIL, S.; CHAWLA, Y.K.; ARORA, S.K.; DAS, A.; DHIMAN, R.K.; DUSEJA, A. Response to potent anti-VHB agents in chronic hepatitis B and combined effect of VHB reverse transcriptase mutations. *Gene.*, v. 1, p. 22-30, 2015.

SUMMERS, J.; MASON, W.S. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.*, v. 29, p.403–415, 1982.

SUZUKI, F.; AKUTA, N.; SUZUKI, Y.; YATSUJI, H.; SEZAKI, H.; ARASE, Y.; KAWAMURA, Y. Selection of a virus strain resistant to entecavir in a nucleoside-naïve patient with hepatitis B of genotype H. *J. Clin. Virol.*, v. 39, p.149–152, 2007.

SVICHER, V.; GORI, C.; TRIGNETTI, M.; VISCA, M.; MICHELI, V.; BERNASSOLA, M.; SALPINI, R. The profile of mutational clusters associated with lamivudine resistance can be constrained by VHB genotypes. **J. Hepatol.**, v. 50, p.461–470, 2009.

TAVIS, J.E.; BADTKE, M.P. Hepadnaviral Genomic Replication. In: CAMERON, C.E.; GÖTTE, M.; RANEY, K.D. (Eds.). **Viral Genome Replication**. New York: Springer Science Business, 2009. P. 129–143.

TAVIS, J.E.; LOMONOSOVA, E. The hepatitis B virus ribonuclease H as a drug target. **Antiviral Res.**, v.118, p.132-138, 2015.

TENNEY, D.J.; LEVINE, S.M.; ROSE, R.E.; WALSH, A.W.; WEINHEIMER, S.P.; DISCOTTO, L.; PLYM, M. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p.3498–3507, 2004.

TENNY, D.J.; ROSE, R.E.; BALDICK, C.J.; POKORNOWSKI, K.A.; EGGERS, B.J.; FANG, J.; WICHROSKI, M.J. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. **Hepatology.**, v. 49, p.1503–1514, 2009.

VAN BOMMEL, F.; DE MAN, R.A.; WEDEMEYER, H.; DETERDING, K.; PETERSEN, J.; BUGGISCH, P.; ERHARDT, A. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. **Hepatology.**, v. 51, p.73–80, 2010.

VIVEKANANDAN, P.; ABRAHAM, P.; SRIDHARAN, G.; CHANDY, G.; DANIEL, D.; RAGHURAMAN, S.; DANIEL, H.D. Distribution of hepatitis B virus genotypes in blood donors and chronically infected patients in a tertiary care hospital in southern India. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, p.81–86, 2004.

WRIGHT, T.L.; LAU, J.Y. Clinical aspects of hepatitis B virus infection. **Lancet.**, v.342, p.1340–1344, 1993.

WOO, G.; TOMLINSON, G.; NISHIKAWA, Y.; KOWGIER, M.; SHERMAN, M.; WONG, D.K.; PHAM, B.; UNGAR, W.J.; EINARSON, T.R.; HEATHCOTE, E.J.; KRAHN, M. Tenofovir and entecavir are the most effective antiviral agents for chronic hepatitis B: a systematic review and Bayesian meta-analyses. **Gastroenterology.**, v. 139, p.1218–1229, 2010.

ZOULIM, F.; LOCARNINI, S. Hepatitis B virus resistance to nucleoside analogues. **Gastroenterology.**, v. 137, p.1593–1608, 2009.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ALESTIG, E.; HANNOUN, C.; HORAL, P.; LINDH, M. Hepatitis B virus genotypes in Mongols and Australian Aborigines. **Archives of Virology**, v. 146, p. 2321-2329, 2001.

ARAUZ-RUIZ, P.; NORDER, H.; VISONÁ, K.A.; MAGNIUS, L.O. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of small s gene. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 851-858, 1997.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 2.0**: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Brasília, 2000.

BANCROFT, W.H.; MUNDON, F.K.; RUSSELL, P.K. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. **J Immunol.**, v.109, p.842-848, 1972.

BARBERA, C.; CALVO, P.; COSCIA, A.; PERUGINI, L.; DASTOLI, G.; RANDONE, A.; BONINO, F.; BRUNETTO, M. Precore mutant hepatitis B virus and outcome of chronic infection and hepatitis in hepatitis B e antigen-positive children. **Pediatric Research**, v. 36, p.347-350, 1994.

BASTANI, J.; CAMPOS, M.A. **Turco pobre, sírio remediado, libanês rico**: a trajetória do imigrante libanês no Espírito Santo. Vitória: Instituto Jones Santos, 1987.

BEASLEY, R.P.; LIN, C.C.; HWANG, L.L.; CHIEN CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B. A prospective study of 22.707 men in Taiwan. **The Lancet**, v. 21, p.1129-1133, 1981.

BENSABATH, G.; LEÃO, R.N.Q. Epidemiologia na Amazônia brasileira *In*: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 1-26.

BERTOLINI, D.A.; MOREIRA, R.C.; SOARES, M.C.P.; BENSABATH, G.; LEMOS, M.F.; MELLO, I.M.V.G.C. *et al.* Genotyping of hepatitis B virus in indigenous populations from Amazon region, Brazil [abstract]. **Virus: Reviews and Research**, v.5, p. 101, 2000.

BLITZ, L.; PUJOL, F.H.; SWENSON, P.D.; PORTO, L.; ATENCIO, R.; ARAUJO, M. *et al.* Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. **J Clin Microbiol**, v. 36, p.648-651, 1998.

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. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 34, p.349-355, 2001.

BRAGA, W.S.M.; SILVA, E.B.; SOUZA, R.A.B.; TOSTA, C.E. Soroprevalência da infecção pelo vírus da hepatite B e pelo plasmódio em Lábrea, Amazonas: estimativa da ocorrência de prováveis coinfeções. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.38, p.218-223, 2005.

BRAGA, W.S.M. Infecção pelos vírus das hepatites B e D entre grupos indígenas da Amazônia Brasileira: aspectos epidemiológicos. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 37, p.9-13, 2004.

CAMPOS, R.H.; MBAYED, V.A.; PINEIRO, Y.L.F.G. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. **J Clin Virol**, v.34, p.8-13, 2005.

CARMAN, W.F.; HADZIYANNIS, S.; MCGARVEY, M.J.; JACYNA, M.R.; KARAYIANNIS, P.; MAKRIS, A.; THOMAS, H.C. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. **Lancet**, v. 2, p.588-591, 1989.

CARRILHO, F.J.; MORAES, C.R.; PINHO, J.R.R.; MELLO, I.M.V.G.C.; BERTOLINI, D.A.; LEMOS, M.F. *et al.* Hepatitis B vírus infection in hemodialysis centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. **BMC Public Health**, v.4, p.13, 2004.

CASTRO, L.D.; NIEL, C.; GOMES, S.A. Low frequency of mutations in the core promoter and precore regions of hepatitis B virus in anti-HBe positive Brazilian carriers. **BMC Microbiology**, v. 1, p. 10, 2001.

CHAN, H.L.Y.; HUSSAIN, M.; LOK, A.S.F. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. **Hepatology**, v. 29, p.976-984, 1999.

CHU, C.J.; KEEFFE, E.B.; HAN, S.H.; PERRILLO, R.P.; MIN, A.D.; PICO, C.S. *et al.* Prevalence of VHB precore/core promoter variants in the United States. **Hepatology**, v.38, p.619-628, 2003.

CHU, C.M.; KARAYIANNIS, P.; FOWLER, M.J.F.; MONJARDINO, J.; LIAW, Y.F.; THOMAS, H.C. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan: studies on hepatitis B virus DNA in serum. **Hepatology**, v. 5, p.431-434, 1985.

CONDE, S.R.S.S.; MÓIA, L.J.P.; BARBOSA, M.S.B.; AMARAL, I.S.A.; MIRANDA, E.C.B.M.; SOARES, M.C.P. *et al.* Prevalência de genótipos e de mutantes pré-core A-1896 do vírus da hepatite B e suas implicações na hepatite crônica, em uma população da Amazônia oriental. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.37, p.33-39, 2004.

DAVEY, S. **State of the world's vaccines and immunization**. Geneva : World Health Organization. 1996. p.76-82.

DON, G. *Hepadnaviridae* and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.(eds) **Fields Virology**. Lippincott-Ravew, Philadelphia. p.2701-2738, 1996.

EHATA, T.; CHUNG, W.L.; OMATA, M. Mutations of hepatitis B virus liver disease. **Gastroenterology Japonica**, v. 28 (sup 4), p.7-11, 1993.

FERREIRA, R.C.; TELES, A.S.; DIAS, M.A.; TAVARES, V.R.; SILVA, A.S.; GOMES, A.S. *et al.* Hepatitis B virus infection profile in haemodialysis patients in Central Brazil: prevalence, risk factors, and genotypes. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , v. 101, p.689-692, 2006.

FRIAS, F.R.; BUTI, M.; JARDI, R.; COTRINA, M.; VILADOMIU, L.; ESTEBAN, R.; GUARDIA, J. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes

and core mutations. **Hepatology**, v. 22, p.1641-1647, 1995.

FUJIWARA, K.; YOKOSUKA, O.; EHATA, T.; CHUANG, W.L.; IMEZEKI, F.; SAISHO, H.; OMATA, M. The two different states of hepatitis B virus DNA in asymptomatic carriers HBe-antigen-positive versus anti-HBe-positive asymptomatic carriers. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, p. 368-376, 1998.

BRASIL. Governo do Amazonas. **Biblioteca virtual-BV** [Internet]. Governo do Amazonas 2009 - [cited 2011 Jan 5]. Disponível em: <<http://www.bv.am.gov.br/portal/conteúdo/municípios/labrea.php>>.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser.**, v. 41, p.95-98, 1999.

HAMASAKI, K.; NAKATA, K.; NAGAYAMA, Y.; OHTSURU, A.; DAIKOKU, M.; TANIGUCHI, K.; TSUTSUMI, T.; SATO, Y.; KATO, Y.; NAGATAKI, S. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. **Hepatology**, v. 20, p.8-14, 1994.

HASEGAWA, K.; HUANG, J.; WANDS, J.R.; OBATA, H.; LIANG, T. J. Association of hepatitis B viral precore mutations with fulminant hepatitis B in Japan. **Virology**, v. 185, p. 460-463, 1991.

HOOFNAGLE, J.H.; SEEFF, L.B. Natural history of chronic type B hepatitis. *In*: POPPER, H.; SCHAFFNER, F. (eds). **Progress in Liver Diseases**. New York: Grune and Stratton, 1982, p. 469-479.

KANEKO, S.; FEINSTONE, S.M.; MILLER, R.H. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using polymerase chain reaction technique. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p.1930-1933, 1989.

KAO, J.H.; CHEN, P.J.; LAI, M.Y.; CHEN, D.S. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1207-1209, 2002.

KAO, J.H.; CHEN, P.J.; LAI, M.Y.; CHEN, D.S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. **Gastroenterology**, v. 118, p.554-559, 2000.

KARASAWA, T.; SHIRASAWA, T.; OKAWA, Y.; KURAMOTO, A.; SHIMADA, N.; AIZAWA, Y.; ZENIYA, M.; TODA, G. Association between frequency of amino acid changes in core region of hepatitis B virus (VHB) and the presence of precore mutation in Japanese VHB carriers. **Journal of Gastroenterology**, v. 32, p. 611-622, 1997.

KASPAR, R.T.; KLEIN, A.; AHARONSON, S. Hepatitis B virus precore mutants are identical in carriers from various ethnic origins and are associated with a range of disease severity. **Hepatology**, v. 16, p.1338-1342, 1992.

KIDD-LJUNGGREN, K.; MIYAKAWA, Y.; KIDD, A.H. Genetic variability in hepatitis B viruses. **J Gen Virol**, v. 83, p.1267-1280, 2002.

KIESSLICH, D.; CRISPIM, M.A.; SANTO, C.; FERREIRA, F.L.; FRAJJI, N.A.; KOMONINAKIS, S.V. *et al.* Influence of hepatitis B virus (VHB) genotype on the clinical course of diseases in patients coinfecting with VHB and hepatitis Delta virus. **The J Infect Dis.**, v. 199, p.1608-1611, 2009.

KIM, W.H.; KIM, K.H.; CHUNG, J.P.; KANG, J.K.; PARK, I.S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver diseases. **Yonsei Medical Journal**, v. 34, p.158-165, 1993.

KWOK, R.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, p.237-238, 1989.

LIAW, Y.F.; TAI, D.I.; CHU, C.M.; LIN, D.Y.; SHEEN, I.S.; CHEN, I.J.; PAO, C.C. Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic B hepatitis. A prospective study. **Gastroenterology**, v. 90, p. 263-267, 1986.

LINDH, M.; ANDERSSON, A.S.; GUSDAL, A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus - large-scale analysis using a new genotyping method. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p.1285-1293, 1997.

LINDH, M.; HANNOUN, C.; DHILLON, A.P.; NORKRANS, G.; HORAL, G. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in east asian hepatitis B virus carriers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p.775-782, 1999.

MANGIA, A.; CHUNG, Y.H.; HOOFNAGLE, J.H.; BIRKENMEYER, L.; MUSHAWAR, I.; DI BISCEGLIE, A. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum HBeAg. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, p.2447-2452, 1996.

MBAYED, V.A.; LOPEZ, J.L.; TELENTA, P.F.S.; PALACIOS, G.; BADIA, I.; FERRO, A.; GALOPPO, C.; CAMPOS, R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.3362-3365, 1998.

MELLO, F.C.A.; SOUTO, F.J.D.; NABUCO, L.C.; VILLELA-NOGUEIRA, C.A.; COELHO, H.S.; FRANZ, H.C. *et al.* Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. **BMC Microbiol**, v. 7, p.103, 2007.

MORAES, M.T.B.; NIEL, C.; GOMES, S.A. A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p.45-49, 1999.

NIITSUMA, H.; ISHII, M.; SAITO, Y.; MIURA, M.; KOBAYASHI, K.; OHORI H.; TOYOTO, T. Prevalence of precore defective mutant of hepatitis B virus in VHB carriers. **Journal of Medical Virology**, v. 46, p.397-402, 1995.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A.M.; COURSAGET, P.; ECHEVARRI, J.M.; LEE, S.D.; MUSHAWAR, I.K. *et al.* Genetic Diversity of Hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. **Intervirology**, v.47, p.289-309, 2004.

NORDER, H.; COUROUCÉ, A.M.; MAGNIUS, L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. **Virology**, v. 198, p. 489-503, 1994.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H.; SASTROEWIGNJO, R.I.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y. *et al.* Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **J Gen Virol.**, v. 69: 2575-2583, 1988.

OKAMOTO, H.; TSUDA, F.; SAKUGAWA, H.; SASTROSOEWGNJO, R.I.; MITSUNOBU, I.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. **Journal General of Virology**, v. 69, p.2575-2583, 1988.

OKAMOTO, H.; YOTSUMOTO, S.; AKAHANE, T.Y.; MIYAZAKI, Y.; SUGAI, Y.; TSUDA, F.; TANAKA, T.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infect hosts along seroconversion to the antibody against e antigen. **Journal of Virology**, v.64, p. 1298-1303, 1990.

OLIVEIRA, C.M.; FARIAS, I.P.; FONSECA, J.C.F.; BRASIL, L.M.; SOUZA, R.; ASTOLFI-FILHO, A. Phylogeny and molecular genetic parameters of different stages of hepatitis B virus infection in patients from the Brazilian Amazon. **Arch Virol**, v. 12, p.27-37, 2008.

PARANÁ, R.; VITVITSKI, L.; PEREIRA, J.E. Hepatotropic Viruses in the Brazilian Amazon: A Health Threat. **Braz J Infect Dis.**, v. 12, p.253-256, 2008.

RAIMONDO, G.; GIANMICHELE, M.; SARDO, M.A.; RODINO, G.; SALVATORE, C.; VECCHI, M.; PERNICE, M.; RUMI, G.; TATARELLA, M.; FRANCHIS, R. Persistence of "wild-type" and "e-minus" hepatitis B virus infection in chronic healthy HBsAg/anti-HBe positive carriers. **Journal of Hepatology**, v. 20, p. 148-151, 1994.

RIBEIRO, C.L. **Os Estados Brasileiros** [Internet] 2009. Disponível em: <[http://www.carlosribeiro.caestamosnos.org/HistoriaBrasil/Estado\\_Acre.html](http://www.carlosribeiro.caestamosnos.org/HistoriaBrasil/Estado_Acre.html)>.

RIZZETTO, M. Hepatitis D: thirty years after. **J Hepatol**, v. 50, p.1043-1050, 2009.

SALÃO, T. A. BioEdit: um editor e análise programa de alinhamento de sequências biológicas user-friendly para Windows 95/98 / NT. **Nucl Acids Symp Ser**, v.41, p. 95-98, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p.54-63, 1997.

SANTATONIO, T.; JUNG, M.C.; MISKA, S.; PASTORE, G.; PAPE, G.R.; WILL, H. Prevalence and type of pre-C VHB mutants in anti-HBe positive carriers with chronic liver disease in highly endemic area. **Virology**, v. 183, p. 840-844, 1991.

SCHIEL, J. **Povos Indígenas no Brasil** [Internet]. 2005. Disponível em: <<http://pib.socioambiental.org/pt/povo/apurina/print.>>.

SCHRÖDER, P. **Povos Indígenas no Brasil** [Internet]. 2002 . Disponível em: <<http://pib.socioambiental.org/pt/povo/paumari/print.>>.

SHARMA, S.K.; SAINI, N.; CHWLA, Y. Hepatitis B virus: inactive carriers. **Viol J.**, v.2, p.82-86, 2005.

SITNIK, R.; PINHO JR, R.; SILVA, L.C.; FONSECA, L.E.P.; CARRILHO, F.J.; BERNARDINI, A.P. Genótipos do vírus da hepatite B e mutações na região pré-core (VHB) em pacientes brasileiros com hepatite crônica B. *In: Resumo na Gastroenterologia Endoscopia Digestiva*, v. 18 (supl 1), p. S25, 1999.

SOUTO, F.J.D. Distribuição da hepatite B no Brasil: atualização do mapa epidemiológico e proposições para seu controle. **Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**, v. 18, p.143-150, 1999.

STUYVER, L.; GENDT, S.; GEYT, C.V.; ZOULIM, F.; FRIED, M.; SCHINAZI, R.; ROSSAU, R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 67-74, 2000.

TAKAHASHI, K.; AOYAMA, K.; OHNO, N.; IWATA, K.; AKAHANE, Y.; BABA, K.; YOSHIZAWA, H.; MISHIRO, S. The precore/core promoter mutant (T1762/A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and easy method for detection. **Journal of General Virology**, v. 76, p.3159-3164, 1995.

TAKAHASHI, K.; OHTA, Y.; KANAI, K.; AKAHANE, Y.; IWASA, Y.; HINO, K.; OHNO, N.; YOSHIZAWA, H.; MISHIRO, S. Clinical implications of mutations C-to-T1653 and T-to-C/ A/ G1753 of hepatitis B virus genotype C in chronic liver disease. **Archives of Virology**, v. 144, p.1299-1308, 1999.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.2. **Mol Biol Evol**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TELES, A.S.; MARTINS, R.M.B. Vanderborcht B, Stuyver L, Gaspar AMC, Yoshida CFT. Hepatitis B virus: Genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. **Artificial Organs**, v.23, p.1074-1078, 1999.

THAKUR, V.; GUPTAN, R.C.; KAZIN, S.N.; MALHOTRA, V.; SARIN, S.K. Profile, spectrum and significance of VHB genotypes in chronic liver diseases patients in the Indian subcontinent. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 165-170, 2002.

TILLMANN, H.; TRAUTWEIN, C.; WALKER, D.; MICHITAKA, K.; BÖKER, K.; MANN, M. Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. **Gut**, v. 37, p. 568-573, 1995.

TU, H.; XIONG, S.D.; TREPO, C.; WEN, Y.M. Frequency of hepatitis B virus e-minus mutants varies among patients from different areas of China. **Journal of Medical Virology**, v.51, p.85-89, 1997.

VIANA, S.; PARANA, R.; MOREIRA, R.C.; COMPRI, A.P.; MACEDO, V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, p.808-814, 2005.

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. **Braz J Infect Dis.**, v. 12, p.27-37, 2008.

WEBER, B. Diagnostic impact of the genetic variability of the hepatitis B virus surface antigen gene. **J Med Virol.**, v.78, p.59-65, 2006.

## ANEXO A



## SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ

## Laboratório Central de Saúde Pública

Av. Barão de Studart, 2405 – Aldeota

Fone: 3101-1496 – CEP: 60.120-002

Fortaleza – Ceará

## FICHA SIMPLIFICADA LABORATORIAL EM HEPATITES VIRAIS

Nº do LACEN \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Data do nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ data: : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Procedência: \_\_\_\_\_

Paciente assintomático: ( ) Sim ( ) Não

## Manifestações Clínicas

Data do início dos sintomas: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Febre: \_\_\_\_\_ Sim ( ) Não ( )

Icterícia: \_\_\_\_\_ Sim ( ) Não ( )

Urina escura (colúria) \_\_\_\_\_ Sim ( ) Não ( )

Fezes esbranquiçadas: (acolia fecal) \_\_\_\_\_ Sim ( ) Não ( )

Dor abdominal: \_\_\_\_\_ Sim ( ) Não ( )

Náuseas, vômitos: \_\_\_\_\_ Sim ( ) Não ( )

Outros sintomas: \_\_\_\_\_

Realizou algum exame laboratorial recente: (Ex: AST, ALT, Bilirrubina)

Sim ( ) Não ( )

Qual: \_\_\_\_\_

Provável fonte de infecção:

Sexual	( )	Transfusional	( )
Acidente de trabalho	( )	Vertical	( )
Ignorado	( )	uso de drogas	( )

Paciente vacinado?

Hepatite B ( ) Sim ( ) Não ( )

Obs: PCR para Hepatite C só será realizado com comprovante do exame de anti – HCV

Profissional responsável pela coleta e/ou informações: \_\_\_\_\_

ANEXO DO POP N° 01.24510.003 – lacen (elaborado pelo o autor)

## ANEXO B



Ministério da Saúde  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Hepatites Virais – PVG  
 Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais

**PROTÓCOLO DE PCR  
 VHB – DNA (Regiões de**

resistência a antivirais)

Data: ?/09/2014

Responsável: Napoleão Cruz / Dra. Márcia

Registro de amostra	Método de extração / kit	Registro de amostra	Método de extração / kit
1. 47	High pure viral nucleic acid	1. 241	High pure viral nucleic acid
2. 78	High pure viral nucleic acid	2. 242	High pure viral nucleic acid
3. 85	High pure viral nucleic acid	3. 262	High pure viral nucleic acid
4. 90	High pure viral nucleic acid	4. 271	High pure viral nucleic acid
5. 96	High pure viral nucleic acid	5. 278	High pure viral nucleic acid
6. 97	High pure viral nucleic acid	6. 280	High pure viral nucleic acid
7. 189	High pure viral nucleic acid	7. 284	High pure viral nucleic acid
8. 192	High pure viral nucleic acid	8. 289	High pure viral nucleic acid
9. 195	High pure viral nucleic acid	9. 296	High pure viral nucleic acid
10. 205	High pure viral nucleic acid	10. 311	High pure viral nucleic acid
11. 215	High pure viral nucleic acid	11. 324	High pure viral nucleic acid
12. 219	High pure viral nucleic acid	12. 333	High pure viral nucleic acid

## ANEXO C



Ministério da Saúde  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Hepatites Virais – PVG  
 Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais

Mix  
 Márcia

Data: 09/2014

Responsável: Napoleão Cruz / Dra.

Tampão 10x (1x / reação) lote marca:	5 µL	x 26	= 130 µL
dNTP 10 mM (0,2 mM / reação) diluído em:	1 µL	x 26	= 26 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (1,5 / reação) lote/marca:	1,5 µL	x 26	= 39 µL
Primer senso VHB 1F 10 µM (0,5 µM / reação) diluído em:	2,5 µL	x 26	= 65 µL
Primer senso VHB 4R 10 µM (0,5 µM / reação) diluído em:	2,5 µL	x 26	= 65 µL
Platinum Tag DNA polymerase 5U / µL (2,5 / reação) diluído em:	0,5 µL	x 26	= 13 µL
Água destilada DNaseRNasefree aberta em:	27 µL	x 26	= 702 µL

Distribuir 40 µL do mix em cada tubo + 10 µL do DNA de cada amostra respectiva. A seguir:  
 GÉLO / SPIN / GELO.

Identificação do termociclador: \_\_\_\_\_

Nome ou número do ciclo no termociclador: programa 9 (Res PCR 1)

Ciclo: 95°C – 5 min.

95°C – 10 s }  
 58°C – 20 s } 45x  
 72°C – 40 s }  
 72°C – 5 min.

4°C - ∞ Tamanho do produto: ~ 10

## ANEXO D



Ministério da Saúde  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Hepatites Virais – PVG  
 Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais

**PROTOCOLO DE PCR VHB – DNA (Regiões de resistência a antivirais)**

Data: 16/09/2014 Responsável: Napoleão Cruz / Dra. Márcia

Registro amostra	de	Método de extração / kit	Registro amostra	de	Método de extração / kit
1.	58	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	1.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
2.	90	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	2.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
3.	96	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	3.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
4.	127	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	4.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
5.	133	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	5.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
6.	197	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	6.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
7.	216	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	7.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
8.	298	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	8.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
9.	312	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	9.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
10.	328	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	10.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
11.	333	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	11.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
12.	339	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	12.	CN	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE

Obs.:  
 Mix

Data 16/09/2014

Responsável: Napoleão Cruz / Dra.

Márcia

<b>Tampão 10x (1x / reação)</b> lote marca:	<b>5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>=70 <math>\mu</math>L</b>
<b>dNTP 10 mM (0,2 mM / reação)</b> diluído em:	<b>1 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>=14 <math>\mu</math>L</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 50 mM (1,5 / reação)</b> lote/marca:	<b>1,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>= 21 <math>\mu</math>L</b>
<b>Primer senso VHB 1F 10 <math>\mu</math>M (0,5 <math>\mu</math>M / reação)</b> diluído em:	<b>2,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>= 35<math>\mu</math>L</b>
<b>Primer senso VHB 4R 10 <math>\mu</math>M (0,5 <math>\mu</math>M / reação)</b> diluído em:	<b>2,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>=35 <math>\mu</math>L</b>
<b>Platinum Tag DNA polymerase 5U / <math>\mu</math>L (2,5 / reação)</b> diluído em:	<b>0,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>=7 <math>\mu</math>L</b>
<b>Água destilada DNaseRNasefree</b> aberta em:	<b>27 <math>\mu</math>L</b>	<b>x14</b>	<b>=378 <math>\mu</math>L</b>

Distribuir 40  $\mu$ L do mix em cada tubo + 10  $\mu$ L do DNA de cada amostra respectiva. A seguir:

Identificação do termociclador: \_\_\_\_\_

Nome ou número do ciclo no termociclador: programa 9 (Res PCR 1)

Ciclo: 95°C – 5 min.

## ANEXO E



Ministério da Saúde  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Hepatites Virais – PVG  
 Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais

**PROTOCOLO DE PCR VHB – DNA (Regiões de resistência a antivirais)**

Data: 17/09/2014

Responsável: Napoleão Cruz / Dra. Márcia

Registro de amostra	Método de extração / kit	Registro de amostra	Método de extração / kit
1. 30	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	1. 176	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
2. 41	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	2. 188	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
3. 49	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	3. 190	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
4. 63	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	4. 216	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
5. 68	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	5. 223	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
6. 79	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	6. 224	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
7. 81	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	7. 280	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
8. 113	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	8. 299	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
9. 116	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	9. 314	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
10. 143	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	10. 337	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
11. 148	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	11. 349	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE
12. 149	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE	12. 370	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID ROCHE

Obs.:  
 Mix

Data /09/2014

Responsável: Napoleão Cruz / Dra.

## Márcia

<b>Tampão 10x (1x / reação)</b> lote marca:	<b>5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 130 <math>\mu</math>L</b>
<b>dNTP 10 mM (0,2 mM / reação)</b> diluído em:	<b>1 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 26 <math>\mu</math>L</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> 50 mM (1,5 / reação)</b> lote/marca:	<b>1,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 39 <math>\mu</math>L</b>
<b>Primer senso VHB 1F 10 <math>\mu</math>M (0,5 <math>\mu</math>M / reação)</b> diluído em:	<b>2,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 65 <math>\mu</math>L</b>
<b>Primer senso VHB 4R 10 <math>\mu</math>M (0,5 <math>\mu</math>M / reação)</b> diluído em:	<b>2,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 65 <math>\mu</math>L</b>
<b>Platinum Tag DNA polymerase 5U / <math>\mu</math>L (2,5 / reação)</b> diluído em:	<b>0,5 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 13 <math>\mu</math>L</b>
<b>Água destilada DNaseRNasefree</b> aberta em:	<b>27 <math>\mu</math>L</b>	<b>x 26</b>	<b>= 702 <math>\mu</math>L</b>

Distribuir 40  $\mu$ L do mix em cada tubo + 10  $\mu$ L do DNA de cada amostra respectiva. A seguir:

**GÉLO / SPIN / GÉLO.**

Identificação do termociclador: \_\_\_\_\_

Nome ou número do ciclo no termociclador: programa 9 (Res PCR 1)

Tamanho do produto: ~ 1000 pb

## ANEXO F



Ministério da Saúde  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Hepatites Virais – PVG  
 Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais

**PROTOCOLO DE PCR VHB – DNA (Regiões de resistência a antivirais)**

**Data: 17/09/2014      Responsável: Napoleão Cruz / Dra. Márcia**

<b>Registro de amostra</b>	<b>Data de Extração</b>	<b>Método de extração / kit</b>
1. 262	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
2. 271	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
3. 278	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
4. 280	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
5. 284	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
6. 289	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
7. 296	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
8. 311	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
9. 324	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
10. 333	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE
11. CN	17/09/2014	HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID KIT ROCHE

## ANEXO G



Ministério da Saúde  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Hepatites Virais – PVG  
 Laboratório de Referência Nacional para Hepatites Virais

Mix  
 Márcia

Data 17/09/2014

Responsável: Napoleão Cruz / Dra.

Tampão 10x (1x / reação) lote marca:	5 µL	x 13	=65 µL
dNTP 10 mM (0,2 mM / reação) diluído em:	1 µL	x 13	=13 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (1,5 / reação) lote/marca:	1,5 µL	x 13	=19,5 µL
Primer senso VHB 1F 10 µM (0,5 µM / reação) diluído em:	2,5 µL	x 13	=32,5 µL
Primer senso VHB 4R 10 µM (0,5 µM / reação) diluído em:	2,5 µL	x 13	=32,5 µL
Platinum Tag DNA polymerase 5U / µL (2,5 / reação) diluído em:	0,5 µL	x 13	=6,5 µL
Água destilada DNaseRNasefree aberta em:	27 µL	x 13	=351 µL

Distribuir 40 µL do mix em cada tubo + 10 µL do DNA de cada amostra respectiva. A seguir:  
 GELO / SPIN / GELO.

Identificação do termociclador: \_\_\_\_\_

Nome ou número do ciclo no termociclador: programa 9 (Res PCR 1)

Ciclo: 95°C – 5 min.

95°C – 10 s

58°C – 20 s } 45x

72°C – 40 s

72°C – 5 min.

4°C - ∞

Tamanho do produto: ~ 1000 pb

## ANEXO H - Tabelas da Análise Estatística

### Tabela V - Mutações associadas aos antivirais

	MUTAÇÃO	Mutações															
		SEM		L180M		M204V		G173L		T169L		M204I		T184I		L80V	
		N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %
Medicações	Lamivudina	3	20,0%	4	57,1%	4	66,7%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Entecavir	4	26,7%	2	28,6%	2	33,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Atefovir	0	0,0%	1	14,3%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Tenofovir	4	26,7%	1	14,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	1	100,0%
	Interferon	2	13,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	Desconhecido	3	20,0%	1	14,3%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	0	0,0%

Valor de  $p < 0,402$

### Tabela VI- Mutações em relação a carga viral

	Mutações															
	SEM MUTAÇÃO		L180M		M204V		G173L		T169L		M204I		T184I		L80V	
	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	
Carga Viral (2000UI/ml)		47016	273321	326642	1465393899	1190000	13183	3740	30700							
LOG		5	6	6	9	6	4	4	4							

### Tabela VII – Tipos mutações versus tratamento

TRATAMENTO	MUTAÇÃO	Mutações															
		SEM		L180M		M204V		G173L		T169L		M204I		T184I		L80V	
		N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %
Não	45	76,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	100,0%	1	33,3%	1	100,0%	0	0,0%	
Sim	14	23,7%	7	100,0%	6	100,0%	1	100,0%	0	0,0%	2	66,7%	0	0,0%	1	100,0%	

Valor de  $p - 0,001$

### Tabela VIII – Mutações em coinfectados (HIV-VHB)

	MUTAÇÃO	Mutações															
		SEM MUTAÇÃO		L180M		M204V		G173L		T169L		M204I		T184I		L80V	
		N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %
HIV (+)	Não	39	100,0%	6	85,7%	5	83,3%	1	100,0%	1	100,0%	3	100,0%	1	100,0%	1	100,0%
	Sim	0	0,0%	1	14,3%	1	16,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Valor de p - 0,025

**Tabela IX** – Tipos de mutações em associadas aos genótipos

GENÓTIPO	Mutações															
	SEM MUTAÇÃO		L180M		M204V		G173L		T169L		M204I		T184I		L80V	
	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %	N	N %
F	43	57,3%	3	30,0%	1	12,5%	0	0,0%	1	100,0%	2	50,0%	0	0,0%	1	100,0%
A	27	36,0%	5	50,0%	5	62,5%	0	0,0%	0	0,0%	2	50,0%	1	100,0%	0	0,0%
D	3	4,0%	1	10,0%	1	12,5%	1	100,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
E	2	2,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
G	0	0,0%	1	10,0%	1	12,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Valor de p < 0,002

**Tabela XI** – Frequência das mutações em relação aos genótipos

		GENÓTIPO					Total	
		F	A	D	E	G		
Presença de Mutação	Não	Count	43	27	3	2	0	75
		% within GENÓTIPO	91,5%	79,4%	75,0%	100,0%	0,0%	85,2%
	Sim	Count	4	7	1	0	1	13
		% within GENÓTIPO	8,5%	20,6%	25,0%	0,0%	100,0%	14,8%
Total	Count	47	34	4	2	1	88	
	% within GENÓTIPO	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Valor de p < 0,066 (teste do chi quadrado)